



UNIL | Université de Lausanne

Unicentre

CH-1015 Lausanne

<http://serval.unil.ch>

Year: 2013

Étude des mécanismes de la calcification artérielle des membres inférieurs dans le diabète dans une perspective thérapeutique « Étude DIACART »

Carole Elodie AUBERT

Carole Elodie AUBERT, 2013, Étude des mécanismes de la calcification artérielle des membres inférieurs dans le diabète dans une perspective thérapeutique « Étude DIACART »

Originally published at: Thesis, University of Lausanne

Posted at the University of Lausanne Open Archive.
<http://serval.unil.ch>

Droits d'auteur

L'Université de Lausanne attire expressément l'attention des utilisateurs sur le fait que tous les documents publiés dans l'Archive SERVAL sont protégés par le droit d'auteur, conformément à la loi fédérale sur le droit d'auteur et les droits voisins (LDA). A ce titre, il est indispensable d'obtenir le consentement préalable de l'auteur et/ou de l'éditeur avant toute utilisation d'une oeuvre ou d'une partie d'une oeuvre ne relevant pas d'une utilisation à des fins personnelles au sens de la LDA (art. 19, al. 1 lettre a). A défaut, tout contrevenant s'expose aux sanctions prévues par cette loi. Nous déclinons toute responsabilité en la matière.

Copyright

The University of Lausanne expressly draws the attention of users to the fact that all documents published in the SERVAL Archive are protected by copyright in accordance with federal law on copyright and similar rights (LDA). Accordingly it is indispensable to obtain prior consent from the author and/or publisher before any use of a work or part of a work for purposes other than personal use within the meaning of LDA (art. 19, para. 1 letter a). Failure to do so will expose offenders to the sanctions laid down by this law. We accept no liability in this respect.



UNIL | Université de Lausanne

FACULTÉ DE BIOLOGIE ET DE MÉDECINE

Département de médecine interne du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois
Service d'endocrinologie, diabétologie et métabolisme

**Étude des mécanismes de la calcification artérielle des
membres inférieurs dans le diabète dans une perspective
thérapeutique « Étude DIACART »**

THÈSE DE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée à la

Faculté de Biologie et de Médecine
de l'Université de Lausanne

pour l'obtention du grade de

Docteur en Médecine

par

Carole Elodie AUBERT

Jury

Docteur Juan Ruiz, Directeur de thèse
Professeur Agnès Hartemann, Co-Directeur de thèse
Professeur Lucia Mazzolai, Expert
Professeur Stephanie Clarke, Directrice de l'École doctorale

LAUSANNE

2013

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE – FACULTÉ DE BIOLOGIE ET DE MÉDECINE

Département de médecine interne du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois
Service d'endocrinologie, diabétologie et métabolisme

**Étude des mécanismes de la calcification artérielle des membres inférieurs
dans le diabète dans une perspective thérapeutique
« Étude DIACART »**

THÈSE

préparée sous la direction du Docteur Juan Ruiz

avec la co-direction du Professeur Agnès Hartemann

avec la collaboration des Docteurs Olivier Bourron, Beny Charbit, Frédérique Lajat-Kiss, Josette Le Doeuff, Jacques Lajou, Michel Dadon, Romuald Mentaverri et Michèle Fonfrède, des Professeurs Philippe Gilléry, Ziad Massy, Philippe Cluzel et Alain Mallet, et des Internes Florence Morel, Salim Kemel et Antoine Pierucci

et présentée à la Faculté de biologie et de médecine de
l'Université de Lausanne pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

par

Carole Elodie AUBERT

Médecin diplômée de la Confédération Suisse
Originaire de Savagnier (Neuchâtel)

Lausanne

2013

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE – FACULTÉ DE BIOLOGIE ET DE MÉDECINE

Département de médecine interne du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois
Service d'endocrinologie, diabétologie et métabolisme

**Étude des mécanismes de la calcification artérielle des membres inférieurs
dans le diabète dans une perspective thérapeutique
« Étude DIACART »**

THÈSE

préparée sous la direction du Docteur Juan Ruiz

avec la co-direction du Professeur Agnès Hartemann

avec la collaboration des Docteurs Olivier Bourron, Beny Charbit, Frédérique Lajat-Kiss, Josette Le Doeuff, Jacques Lajou, Michel Dadon, Romuald Mentaverri et Michèle Fonfrède, des Professeurs Philippe Gilléry, Ziad Massy, Philippe Cluzel et Alain Mallet, et des Internes Florence Morel, Salim Kemel et Antoine Pierucci

et présentée à la Faculté de biologie et de médecine de
l'Université de Lausanne pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

par

Carole Elodie AUBERT

Médecin diplômée de la Confédération Suisse
Originaire de Savagnier (Neuchâtel)

Lausanne

2013

Imprimatur

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

Directeur de thèse *Monsieur le Docteur Juan Ruiz*
Co-Directeur de thèse *Madame* *Agnès Hartemann*
Expert *Madame le Professeur Lucia Mazzolai*
Directrice de l'Ecole *Madame le Professeur Stephanie Clarke*
doctorale

la Commission MD de l'Ecole doctorale autorise l'impression de la thèse de

Madame Carole Aubert

intitulée

***Etude des mécanismes de la calcification artérielle des
membres inférieurs dans le diabète dans une perspective
thérapeutique "Etude Diacart"***

Lausanne, le 14 juin 2013

*pour Le Doyen
de la Faculté de Biologie et de Médecine*



*Madame le Professeur Stephanie Clarke
Directrice de l'Ecole doctorale*

TABLE DES MATIÈRES

<u>A) Résumé</u>	6
1. Contexte	6
2. Objectifs	6
3. Méthodologie	6
4. Résultats et conclusion	6
<u>B) Première partie : données de la littérature</u>	7
1. Introduction	7
2. Données épidémiologiques : un problème de santé publique	7
3. Traitement actuel de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI)	7
4. Facteurs de risque de l'AOMI chez les patients diabétiques	8
4.1. Hyperglycémie	8
4.2. Hypertension artérielle (HTA)	9
4.3. Dyslipidémie	9
4.4. Tabagisme	9
4.5. Insuffisance rénale chronique (IRC)	10
5. Physiopathologie de l'AOMI chez les patients diabétiques	10
5.1. Athérosclérose	10
5.2. Artériosclérose ou médiocalcose	13
5.3. Calcification	14
5.3.1. Ossification	15
5.3.2. Calcification vasculaire	15
5.3.3. Le « paradoxe de la calcification »	18
5.3.4. Inflammation et insulin-like growth factor 1 (IGF-1)	19
5.4. Marqueurs du remodelage osseux	20
5.4.1. Voie ostéoprotégérine (OPG) / receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) / RANK	20
5.4.1.1. Voie OPG / RANKL / RANK et métabolisme osseux	20
5.4.1.2. Voie OPG / RANKL / RANK et calcification vasculaire	20
5.4.1.3. Voie OPG / RANKL / RANK : études chez l'homme	21
5.4.1.4. Voie OPG / RANKL / RANK et perspectives thérapeutiques	23
5.4.2. Fétuine A (α_2 -Heremans-Schmid glycoprotéine)	24
5.4.3. Fibroblast growth factor 23 (FGF-23)	26
5.5. Métabolisme phosphocalcique et risque cardiovasculaire (RCV)	27

5.5.1. Vitamine D	27
5.5.2. Hormone parathyroïdienne (PTH)	28
5.5.3. Produit phosphocalcique	29
5.5.3.1. Phosphatémie	29
5.5.3.2. Calcémie	30
5.6. Voie de la glycation	30
5.6.1. Produits de fin de glycation (advanced glycation end products, AGEs)	30
5.6.1.1. Effets indépendants d'un récepteur	31
5.6.1.2. Effets dépendants d'un récepteur	32
5.6.1.3. AGEs et complications vasculaires du diabète chez l'homme	33
5.6.2. Récepteur soluble aux AGEs (sRAGE)	33
5.6.3. Voie de la glycation et perspectives thérapeutiques	34
5.7. Adiponectine	35
6. Score de calcification	38
<u>C) Deuxième partie : étude DIACART</u>	39
1. Justification scientifique	39
2. Hypothèse de l'étude	39
3. Objectifs de l'étude	39
4. Méthodologie	39
4.1. Explications du déroulement et recueil du consentement par le médecin	40
4.2. Recueil des données biométriques	40
4.3. Prélèvements et dosages	40
4.4. Recueil des données cliniques par le médecin	41
4.4.1. Données anamnestiques	41
4.4.2. Examen artériel	42
4.4.3. Examen de la neuropathie périphérique	42
4.4.3.1. Test au monofilament	42
4.4.3.2. Neuropathy disability score (NDS)	42
4.4.3.3. Neuropad®	43
4.4.4. Examen de la neuropathie autonome cardiovasculaire (NAC)	44
4.4.4.1. Électrocardiogramme	44
4.4.4.2. Test d'hypotension orthostatique et mesure de la tension artérielle (TA)	44
4.4.4.3. Tests de variabilité de la fréquence cardiaque	45
4.4.4.3.1. Épreuve de respiration profonde	45

4.4.4.3.2. Épreuve d'orthostatisme	45
4.4.4.3.3. Épreuve de Valsalva	45
4.5. Recueil des données d'imagerie	45
4.5.1. Scanner des jambes : score calcique infra-poplité (SCIP)	46
4.5.2. Échographie-doppler artérielle des membres inférieurs (EDA)	46
4.6. Statistiques	47
4.6.1. Analyse descriptive	47
4.6.2. Analyse des facteurs associés aux lésions artérielles périphériques	48
4.6.2.1. Analyse univariée	48
4.6.2.2. Analyse multivariée	48
4.6.3. Analyse des facteurs associés à l'adiponectine	48
4.6.3.1. Analyse univariée	48
4.6.3.2. Analyse multivariée	48
4.6.4. Neuropad®	48
5. Résultats	49
5.1. Description de l'échantillon	49
5.2. Analyse prédictive du SCIP et de l'AOMI	50
5.2.1. Analyse univariée	50
5.2.2. Analyse multivariée	52
5.2.2.1. Modèle 1 : voie du métabolisme osseux	53
5.2.2.2. Modèles 2 et 2 bis : voie de la glycation	53
5.2.2.3. Modèle 3 : autres paramètres cliniques ou biologiques	53
5.2.2.4. Modèle 4 : examen artériel	53
5.2.2.5. Modèle 5 : analyse globale des modèles 1, 2 et 3	53
5.3. Adiponectine	55
5.3.1. Analyse univariée	55
5.3.2. Analyse multivariée	56
5.4. Neuropad®	57
6. Discussion	57
6.1. Marqueurs du remodelage osseux	57
6.1.1. Voie OPG/RANKL/RANK	57
6.1.2. Fétuine A(α_2 -Heremans-Schmid glycoprotéine)	58
6.1.3. FGF – 23	59
6.1.4. Métabolisme phosphocalcique	59
6.2. Glycémie et glycation	60

6.3. Adiponectine	61
6.4. Inflammation et IGF-1	62
6.5. Autres facteurs de risque cardiovasculaires (FRCV)	63
6.5.1. Âge et sexe	63
6.5.2. Type, durée et traitement du diabète	63
6.5.3. Tabagisme	63
6.5.4. HTA et dyslipidémie	64
6.5.5. Données biométriques	64
6.6. Traitement	65
6.7. Autres complications vasculaires	65
6.7.1. Neuropathie	65
6.7.1.1. Neuropathie périphérique	65
6.7.1.1.1. Neuropad® et AOMI	66
6.7.1.2. NAC	66
6.8. Examen artériel	67
7. Points forts et limites de l'étude DIACART	67
8. Suite de l'étude DIACART et objectifs du suivi	68
9. Conclusion de l'étude DIACART	68
<u>D) Remerciements</u>	69
<u>E) Annexes</u>	70
Annexe 1 : échographie-doppler artérielle des membres inférieurs (EDA), étude DIACART	70
Annexe 2 : liste des abréviations	71
<u>F) Références</u>	74
<u>G) Troisième partie : études ancillaires au protocole DIACART</u>	97
1. Résumé des articles et contribution scientifique	97
2. Influence of peripheral arterial occlusive disease on the Neuropad® test performance in patients with diabetes	98
3. Relationship between peripheral vascular calcification and accuracy of pulse palpation and ankle brachial index as screening methods for peripheral arterial occlusive disease in patients with diabetes – a cross-sectional study	105
4. Association of peripheral neuropathy with circulating advanced glycation end products, soluble receptor for advanced glycation end products and other risk factors in patients with type 2 diabetes	115

A) Résumé

1. Contexte

La physiopathologie de l'artériopathie diabétique a fait l'objet de nombreuses études qui ont révélé l'importance des voies de l'ostéogénèse et de la glycation. Ces nouvelles connaissances s'avèrent prometteuses, notamment dans une perspective thérapeutique. Mais peu d'études se sont intéressées à l'artériopathie des membres inférieurs en présence de diabète.

2. Objectifs

L'objectif principal est d'étudier l'association entre marqueurs de remodelage osseux, glycation avancée et calcification artérielle des membres inférieurs en présence de diabète afin de pouvoir par la suite et sur la base d'un bon niveau de preuves, mettre en place des protocoles à visée thérapeutique ciblant spécifiquement ces mécanismes physiopathologiques. Le processus ciblé est la calcification artérielle, particulièrement prévalente en présence de diabète, mais dont la localisation aux membres inférieurs est encore peu étudiée en clinique. Nous étudions également la relation de la calcification artérielle avec de nombreux autres paramètres, notamment des marqueurs inflammatoires, l'adiponectine, le métabolisme phosphocalcique et la neuropathie diabétique.

3. Méthodologie

Notre protocole est intitulé DIACART (« DIABète et Calcification ARTérielle »). Il s'agit d'une étude transversale et prospective menée par le groupe hospitalier universitaire Pitié-Salpêtrière (GHPS) à Paris, sous la direction du Professeur Agnès Hartemann, cheffe du service de diabétologie. J'ai été le médecin responsable des visites d'inclusion. Ma thèse se décline en 3 parties : la 1^{ère} partie s'intéresse aux données actuelles de la littérature sur l'artériopathie diabétique : épidémiologie, facteurs de risque, traitement, physiopathologie ; la 2^e partie décrit la mise en œuvre du protocole DIACART et présente les résultats de la partie transversale de cette étude. La 3^e partie présente les 3 études ancillaires au protocole DIACART, qui ont donné lieu à 3 articles dont l'un a été accepté pour publication le 3.02.2013, alors que les 2 autres ont été soumis en mars 2013 et sont en revue.

4. Résultats et conclusion

Les résultats transversaux de notre étude suggèrent que l'ostéoprotégérine (OPG), la fétuine A et la glycation avancée sont impliquées dans le processus de calcification des artères des membres inférieurs chez les patients diabétiques. Par ailleurs, nous observons une relation positive très forte entre adiponectine et artériopathie périphérique. Notre étude confirme également le lien connu entre calcification artérielle et différents marqueurs et/ou facteurs de risque cardiovasculaire (RCV) : âge, sexe, durée du diabète, tabagisme, neuropathie, néphropathie, rétinopathie. L'analyse prospective apportera des notions complémentaires quant aux liens dynamiques de ces variables avec la calcification artérielle, aidera à préciser leur rôle comme marqueurs et/ou facteurs de RCV, et permettra peut-être la mise en place d'essais thérapeutiques ciblant ces mécanismes.

B) Première partie : données de la littérature

1. Introduction

Le diabète de type 2 augmente le RCV d'un facteur 3 à 5 par rapport à la population non diabétique (1,2). Les complications cardiovasculaires comprennent les atteintes coronarienne, cérébrale et périphérique (membres inférieurs).

L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) est ainsi une complication majeure de la macroangiopathie diabétique. Sa prévalence et son taux de complications, notamment les amputations majeures, restent particulièrement élevés chez les patients diabétiques, d'une part en raison du caractère souvent silencieux de la pathologie dans cette population jusqu'à un stade critique, notamment du fait de la neuropathie sensitive souvent présente de façon concomitante à l'artériopathie, et d'autre part en raison du probable manque d'efficacité sur l'AOMI des traitements actuellement recommandés en prévention cardiovasculaire. Alors que la mortalité coronarienne a considérablement diminué ces dernières années grâce à une meilleure prise en charge, en particulier médicamenteuse, des facteurs de risque cardiovasculaires (FRCV), la population diabétique vieillit et se retrouve d'autant plus exposée aux complications de l'AOMI. En effet, la polymédication utilisée pour la maladie coronarienne ne semble pas montrer la même efficacité sur l'AOMI que sur les lésions des artères coronaires, et fait supposer que la physiopathologie de l'AOMI diffère, du moins partiellement, de celle de la maladie coronarienne.

Ainsi, il devient de plus en plus important d'améliorer la compréhension des mécanismes de l'AOMI, dans le but d'en réduire la prévalence et les complications, et de pouvoir développer de nouveaux traitements.

2. Données épidémiologiques : un problème de santé publique

L'AOMI concerne 50% des patients diabétiques de type 2 après 20 ans d'évolution du diabète ; par rapport à la population générale, ces patients ont un risque multiplié par 4 à 10 de développer une AOMI, par 4 de présenter une ischémie critique de membre, et par 10 à 20 d'amputation (4,5). L'AOMI représente par ailleurs le principal facteur de risque d'amputation majeure dans cette population (6). L'atteinte infra-poplitée, fortement associée au diabète, conduit d'ailleurs bien plus fréquemment à une amputation que l'atteinte supra-poplitée (7).

3. Traitement actuel de l'AOMI

Si la maladie coronarienne reste la première cause de décès des patients diabétiques de type 2, son issue mortelle a pu être considérablement diminuée ces dernières années grâce à l'amélioration de

la prise en charge, en particulier médicamenteuse (antiagrégant plaquettaire, statine, bloqueur du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), β -bloquant) (8,9). Ce traitement, bien prouvé et codifié pour la maladie coronarienne, n'a cependant pas démontré la même efficacité sur l'AOMI ; il existe en effet peu d'études de qualité sur le traitement de l'AOMI : si une méta-analyse et de petites études de faible niveau de preuve suggèrent une amélioration de la symptomatologie de claudication intermittente par les antiagrégants plaquettaires et la simvastatine (10–12), l'étude CAPRIE (13) montre, chez des patients diabétiques, une meilleure efficacité du clopidogrel par rapport à l'aspirine sur les événements coronariens et cérébraux, mais pas sur l'AOMI.

4. Facteurs de risque de l'AOMI chez les patients diabétiques

L'UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study), étude de référence du diabète de type 2 qui évalue l'effet d'un traitement intensif du diabète sur la morbi-mortalité, permet de renforcer les éléments de preuve du rôle des principaux F RCV chez les patients diabétiques (14–16).

4.1. Hyperglycémie

Le lien entre hyperglycémie et complications microvasculaires du diabète est clairement démontré par les grandes études thérapeutiques randomisées DCCT (Diabetes Control and Complications Trial), pour le diabète de type 1 (17,18), et UKPDS, pour le diabète de type 2 (15). L'hyperglycémie joue très probablement un rôle important dans les complications macrovasculaires également : l'UKPDS montre en effet que chaque augmentation de 1% de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) est associée à 28% d'AOMI en plus à 6 ans, de façon indépendante de l'âge, du tabagisme, du HDL et de la tension artérielle systolique (TAS) (14) ; plusieurs autres études associent fortement l'hyperglycémie au risque coronarien (19–23). Contrairement aux complications microvasculaires, inexistantes en-dessous d'un taux d'HbA1c de 6.2%, on n'observe pas d'effet seuil, mais au contraire une relation linéaire entre glycémie et complications macrovasculaires ; ainsi, plus l'HbA1c est basse, plus le RCV est faible. De plus, les pics glycémiques post-prandiaux semblent favoriser le stress oxydatif et augmenter ainsi le RCV (24). Malgré ces observations, on manque d'un degré de preuve suffisant démontrant que le contrôle strict de la glycémie prévienne de manière efficace les complications macrovasculaires du diabète, les études récentes s'avérant globalement négatives (25–27).

Plusieurs mécanismes expliquent le rôle pathogène de l'hyperglycémie dans la physiopathologie de l'artériopathie : glycation non enzymatique ; hyperagrégabilité plaquettaire par augmentation de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (voie des hexosamines) ; prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) ; activation de la protéine kinase C ; dysfonction endothéliale favorisant la vasoconstriction par baisse de la synthèse d'oxyde nitrique (NO) et par augmentation de l'endothéline-1 (28,29).

L'insuline semble également jouer un rôle dans la calcification artérielle ; mais les mécanismes sont complexes, car elle peut à la fois inhiber la calcification (par activation de la voie de la PI3-kinase) et la stimuler (par inhibition de l'OPG et augmentation du transport intracellulaire de phosphate) (30,31).

4.2. Hypertension artérielle (HTA)

L'UKPDS montre une relation linéaire entre TAS et complications macrovasculaires (16). Les patients sont randomisés en 2 groupes : contrôle « strict » (objectif de tension artérielle (TA) <150/85mmHg, TA obtenue 144/82mmHg) et contrôle moins « strict » (objectif TA <180/105mmHg, TA obtenue 154/87mmHg). Le premier groupe présente une réduction de 44% des accidents vasculaires cérébraux (AVC) et de 49% du taux d'AOMI (non significatif : $p=0.17$), alors que le risque d'AOMI augmente de 25% dans le second groupe. Les complications macrovasculaires sont plus fortement associées à la TAS qu'à l'hyperglycémie et le risque de complications est doublé lorsque la TAS passe de <120mmHg (médiane à 114mmHg) à >160mmHg (médiane à 168mmHg). Ces éléments suggèrent que la TAS contribue au risque d'AOMI.

4.3. Dyslipidémie

La dyslipidémie du diabète de type 2 associe des anomalies quantitatives avec baisse du HDL et hypertriglycéridémie, à des anomalies qualitatives avec particules LDL petites et denses, connues pour être particulièrement athérogènes en favorisant l'oxydation du LDL et la glycation des apolipoprotéines ; le taux de LDL est en revanche souvent normal ou légèrement augmenté (32). L'UKPDS montre une augmentation de 22% du risque d'AOMI par baisse du HDL de 0.1mmol/l (14). Si cette dyslipidémie correspond au spectre d'action des fibrates, les études de prévention cardiovasculaire par ces médicaments sont cependant décourageantes, bien que l'étude ACCORD suggère un bénéfice cardiovasculaire d'un traitement combiné de simvastatine et fénofibrate chez les hommes diabétiques avec triglycérides élevées et HDL bas (32). Néanmoins, les statines, dont l'efficacité en prévention cardiovasculaire est démontrée (33), restent le traitement de premier choix chez les patients diabétiques de type 2 en prévention primaire ou secondaire, quel que soit le taux de LDL (34).

4.4. Tabagisme

Alors que le LDL est le principal facteur de risque coronarien et l'hypertension artérielle (HTA) celui d'AVC, l'AOMI est connue pour être la « maladie du fumeur ». L'UKPDS montre un risque relatif de 2.90 (intervalle de confiance 95% : 1.46-5.73) d'AOMI chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs,

en analyse multivariée (14). Le tabagisme est donc un facteur de risque d'AOMI majeur chez les patients diabétiques de type 2 également, avec une association bien plus importante que celle retrouvée pour l'HbA1c, le HDL ou la TAS. Le RCV lié au tabagisme semble encore accru par l'insulino-résistance et les anomalies lipidiques associées au diabète de type 2 (35,36).

4.5. Insuffisance rénale chronique (IRC)

Le diabète est la première cause d'insuffisance rénale chronique (IRC) terminale (37). La mortalité élevée des patients en IRC terminale (5-10% par an) est d'origine cardiovasculaire dans plus de 50% des cas (38,39), et l'association entre complications cardiovasculaires et IRC est majorée en présence de diabète, d'un facteur 2 chez l'homme et d'un facteur 3 chez la femme (40). Si les FRCV classiques contribuent à expliquer cette surmortalité, d'autres éléments se surajoutent lors d'IRC : inflammation systémique chronique, augmentation du stress oxydatif, urémie avec anomalies du métabolisme phosphocalcique (41).

Quarante-huit pourcent des patients en IRC préterminale présentent une AOMI (42), et les complications de cette dernière (plaie avec risque d'amputation) sont accrues par les modifications hémodynamiques liées à la soustraction liquidienne en dialyse (40).

5. Physiopathologie de l'AOMI chez les patients diabétiques (40,43,44)

Alors que la physiopathologie de la maladie coronarienne est bien décrite, il existe peu d'études de bonne qualité sur l'AOMI spécifiquement. Or, les mécanismes impliqués sont probablement différents, du moins en partie. Si le tabagisme, principal facteur de risque d'AOMI, et les autres FRCV classiques provoquent principalement une atteinte des troncs artériels proximaux, le diabète est quant à lui associé à une atteinte distale infra-poplitée, des troncs jambiers essentiellement, alors que les artères des pieds sont souvent préservées (13,45,46). De plus, la calcification artérielle est plus précoce en présence de diabète (47,48), et plus fréquente lors d'atteinte infra-poplitée (45,46,49,50).

Deux pathologies artérielles coexistent en présence de diabète : l'athérosclérose et l'artériosclérose. Elles sont néanmoins étroitement liées et partagent de nombreux mécanismes, raison pour laquelle on parle parfois d'« artérioathérosclérose » (40). Les principales différences entre ces deux pathologies sont décrites ci-dessous et résumées dans le tableau 2.

5.1. Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique de l'intima des artères, de progression lente et en plusieurs stades (tableau 1) ; elle débute dans l'enfance et atteint principalement les

artères élastiques de gros et moyen calibres, avec des lésions focales (« patchy ») (51,52). Les facteurs de risque principaux sont bien connus : HTA, dyslipidémie (augmentation du LDL en particulier), diabète, tabagisme, âge, sexe masculin.

Tableau 1 : stades de développement de l'athérosclérose selon la classification de Stary (52).

Type	Terminologie	Description
I	Lésion initiale	Lipoprotéines dans l'intima, lipides dans les macrophages (lésions microscopiques)
II	Stries lipidiques	Lipoprotéines dans l'intima, lipides dans les macrophages et les CMLV (lésions macroscopiques)
III	Pré-athérome	II + dépôts lipidiques extracellulaires
IV	Athérome	III + noyau lipidique ; lésions structurales massives de l'intima
V	Fibro-athérome	IV + dépôts importants de collagène ; CMLV sur le noyau lipidique
VI	Lésion compliquée	IV ou V + thrombus et/ou hématome dans la plaque

La figure 1 schématise les mécanismes de développement de l'athérosclérose, développés dans le texte ci-dessous.

L'HTA, responsable d'un stress hémodynamique prédominant, pour des raisons mécaniques, aux bifurcations artérielles, provoque l'apoptose de cellules endothéliales, conduisant à une dysfonction de l'endothélium, point de départ de la lésion athérosclérotique. Les agressions répétées liées notamment au tabagisme, au diabète et aux radicaux libres, contribuent à cette dysfonction endothéliale qui favorise la vasoconstriction (par baisse du NO, inflammation locale et augmentation du stress oxydatif et de la réponse vasoconstrictrice à l'endothéline-1 et à l'angiotensine-II) et entraîne un déséquilibre entre pénétration et élimination des particules LDL qui s'accumulent et s'oxydent alors dans le sous-endothélium. Le LDL oxydé (LDLox) stimule la sécrétion de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, permettant le recrutement de monocytes et de lymphocytes T circulants responsables d'une réaction immuno-inflammatoire locale contre le LDLox, avec un rôle prépondérant du tumor necrosis factor α (TNF- α) et de l'interleukine 6 (IL-6) (51,53). Les macrophages, dérivés des monocytes sanguins, phagocytent le LDLox grâce à leurs récepteurs scavenger (« éboueur »), se transforment en cellules spumeuses et sécrètent des cytokines, du facteur tissulaire, des métalloprotéinases matricielles et des espèces réactives d'oxygène ; certaines de ces cellules, en réponse notamment au TNF- α et au TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL), meurent par apoptose, libérant des corps apoptotiques qui contribuent à former le corps nécrotique de l'athérome (54). D'autres cellules spumeuses activent les lymphocytes T qui les stimulent en retour par interactions cellulaires et par l'intermédiaire de l'interféron gamma (IFN- γ), engendrant

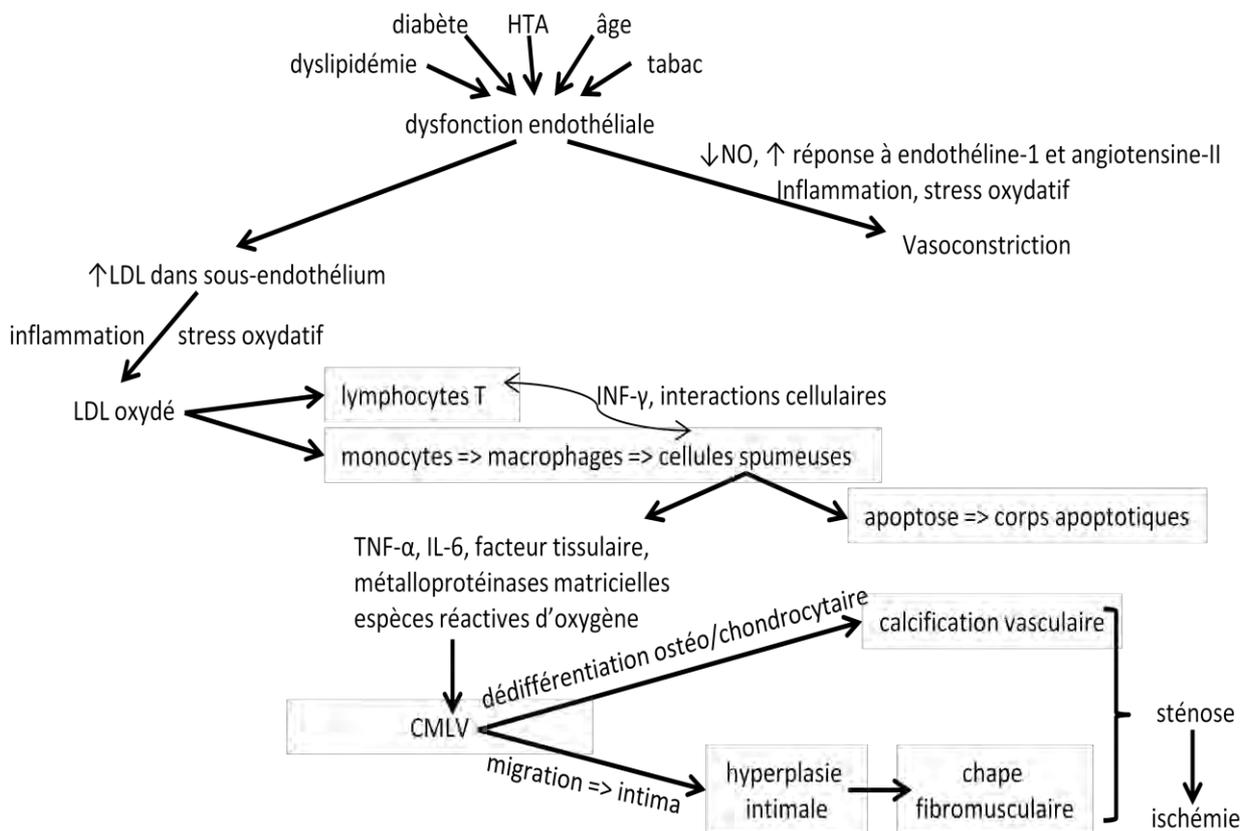
un véritable cercle vicieux d'auto-aggravation de l'athérome, auquel contribue la sécrétion de monocyte-colony stimulating factor (M-CSF) par les CMLV et les cellules endothéliales (51).

Les CMLV migrent de la média vers l'intima et sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire, conduisant à une hyperplasie intimale et à la formation d'une chape fibromusculaire, un mécanisme cicatriciel qui stabilise la plaque d'athérome.

Finalement, diverses cellules acquièrent un phénotype ostéoblastique ou chondrocytaire, et provoquent la calcification de l'intima par un mécanisme assimilé à une ossification surtout de type endochondral (53) ; ce phénomène est tardif et évident essentiellement dans les lésions de stades IV et V selon la classification de Stary (52).

La chape fibromusculaire, la calcification de la plaque et le remodelage vasculaire provoquent une sténose de la lumière artérielle, responsable d'une ischémie chronique.

Figure 1 : Mécanismes impliqués dans l'athérogenèse.



Par ailleurs, la plaque peut à tout moment devenir instable, c'est-à-dire se compliquer d'un thrombus responsable d'un accident ischémique aigu (syndrome coronarien aigu (SCA), AVC, ischémie aiguë de membre), dont la manifestation clinique dépend du degré d'occlusion artérielle (90% des cas sont infracliniques) (40). Le processus repasse ensuite à un mode d'évolution chronique lentement

progressif. L'instabilité de la plaque est augmentée par un contenu élevé en macrophages et en lipides dans l'athérome, de même que par les forces de cisaillement liées à l'HTA et à un débit sanguin élevé (55). La formation du thrombus peut être secondaire soit à une rupture de plaque (60-70% des cas), soit à une érosion endothéliale superficielle (30-40% des cas, phénomène plus fréquent chez les patients diabétiques) (40).

5.2. Artériosclérose ou médiocalcose

Il s'agit d'une augmentation de l'épaisseur et de la rigidité des artères par remodelage de la matrice extracellulaire, dysfonction endothéliale et calcification de la média, avec comme conséquence une perte d'élasticité et de compliance artérielles. La physiologie de Windkessel s'en retrouve perturbée (56,57) : en effet, en conditions normales, les variations pulsatiles du flux artériel sont transformées en flux continu, permettant un apport de sang homogène et régulier en périphérie. En revanche, dans les artères rigidifiées, le flux pulsatile ne peut plus être transformé en flux continu, provoquant une accélération de la propagation de l'onde de pouls en périphérie et un retour prématuré des ondes de réflexion, responsables d'une HTA systolique avec hypertrophie ventriculaire gauche secondaire et finalement insuffisance cardiaque.

La rigidification dilate les grosses artères avec baisse consécutive de la TA diastolique (TAD) qui, avec l'hypertrophie ventriculaire gauche, diminue la perfusion coronaire et favorise ainsi l'ischémie myocardique (57). Le RCV est accru par l'augmentation de la pression différentielle systolodiastolique ; par ailleurs, l'augmentation de la pression de pulsation est un fort facteur prédictif cardiovasculaire (56,58).

La calcification de la média ressemble à un mécanisme d'ossification membranaire par différenciation des CMLV en cellules à phénotype ostéoblastique avec perte de leur capacité contractile (40). Les CMLV prolifèrent et dégradent l'élastine, de sorte que le collagène devient le composant principal de la matrice extracellulaire, contribuant à la rigidification artérielle, ce d'autant plus lorsqu'il est glyqué (29).

La rigidification artérielle est un phénomène précoce lors d'anomalie du métabolisme glucidique ; elle survient en effet déjà dans les états prédiabétiques et précède les complications micro- et macrovasculaires cliniques (56).

Chez les patients diabétiques de type 2, la médiocalcose est associée à une augmentation de la morbi-mortalité cardiovasculaire et du risque d'amputation, multiplié par 5.5 (5,45,59-61). Elle constitue le meilleur facteur prédictif d'amputation (61) et, dans des cas sévères, peut se compliquer d'une ischémie critique de jambe ou d'une amputation même en l'absence d'athérosclérose (62).

Les facteurs de risque principaux de l'artériosclérose sont le diabète, l'âge, l'IRC, le sexe masculin et la neuropathie autonome (59,63).

Tableau 2 : différences principales entre athérosclérose et artériosclérose (63–65).

	Athérosclérose	Artériosclérose
Couche histologique	Intima	Média
Localisation	Artères élastiques de gros et moyen calibre. Surtout aux bifurcations et rétrécissements artériels.	Tous les types artériels ; artères coronaires en général épargnées sauf si IRC ou traitement par chélateurs du phosphate à base de calcium (66).
Lésions	Focales (« patchy »).	Continues, circonférentielles, étendues.
Mode de croissance	Excentrique et asymétrique.	Concentrique et symétrique.
Histopathologie	Plaques calcifiées sur noyau lipidique.	Calcification des produits de dégradation de la matrice extracellulaire.
Voies impliquées	Calcification endochondrale. RANKL, Runx2/Cbfa1, Sox9. Inflammation locale (TNF- α , IL-6). Activation macrophagique. LDLox, stress oxydatif.	Calcification membranaire. BMP-2, Wnt – β -caténine. Inflammation systémique de bas grade (TNF- α). Stress oxydatif.
Facteurs de risque	LDL, HTA, diabète, tabagisme, âge, sexe masculin.	Diabète, IRC, neuropathie autonome, âge, sexe masculin.
Répercussions	Sténoses artérielles => ischémie en aval => SCA, AVC, AOMI.	Sténoses artériolaires => ischémie en aval => SCA, AVC, AOMI distale. Rigidité artérielle => \downarrow compliance, dilatation, HTA systolique, hypertrophie ventriculaire gauche, insuffisance cardiaque.

5.3. Calcification

Longtemps considérée comme un phénomène passif et dégénératif, la calcification artérielle est maintenant reconnue comme un processus actif, régulé par de nombreux signaux métaboliques et inflammatoires, dont la physiopathologie partage de nombreuses similarités avec le développement et le métabolisme osseux (43,44,53,63,67), laissant entrevoir des perspectives thérapeutiques prometteuses.

Le rôle de la calcification artérielle sur la stabilité de l'athérome n'est cependant pas parfaitement clair : en effet, dans les stades tardifs de l'athérosclérose, l'inflammation locale est négligeable et la calcification semble contribuer à stabiliser la plaque (51), alors que dans les stades initiaux, les microcalcifications, instables dans une chape fibreuse fine et en-dessus de la plaque nécrotique, semblent à l'origine de phénomènes thrombotiques aigus (68). Cependant, on pense actuellement que, même dans les stades avancés, la calcification artérielle contribue activement au RCV en

diminuant l'élasticité et la compliance artérielles (69). On la considère comme un marqueur d'athérosclérose précoce (70), avec, chez les patients diabétiques, un rôle probablement prédominant dans la physiopathologie de l'AOMI, peut-être même plus important que celui joué par la plaque d'athérome. En effet, la calcification artérielle est plus fréquente dans l'AOMI infra-poplitée, atteinte typique du diabète (45,46,49,50), où elle constitue un facteur de risque indépendant d'amputation (61,71).

5.3.1. Ossification (44)

Il existe deux types d'ossification : membranaire (os plats), où les cellules mésenchymateuses sont directement transformées en ostéoblastes, et endochondrale (os longs), où le cartilage est envahi par des ostéoblastes qui le transforment en tissu osseux.

Les ostéoblastes produisent et sécrètent d'abord une matrice osseuse, l'ostéoïde, puis des vésicules prominéralisantes, les vésicules matricielles, qui, constituées d'ions et de phosphatases alcalines (PA) et délimitées par une membrane cellulaire trilamellaire, favorisent les concentrations locales en calcium et phosphate, constituant des niches pour le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite : c'est le début de la minéralisation ou calcification de la matrice osseuse.

L'os est un tissu vivant en constant renouvellement dont la calcification est régulée par de nombreux médiateurs – activateurs et inhibiteurs – qui contrôlent les interactions entre ostéoblastes et ostéoclastes et permettent un turnover osseux adéquat, avec enchaînement des 6 phases suivantes : repos, activation des ostéoclastes, résorption osseuse, activation des ostéoblastes, dépôt de matrice osseuse, calcification. Le pyrophosphate inorganique (PPi), l'ostéopontine, le receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), la matrix gla protein (MGP) et la fétuine A s'opposent à l'ossification, alors que les bone morphogenic proteins (BMP) 2 et 4, la PA osseuse, le phosphate inorganique (Pi), l'ostéocalcine, la sialoprotéine osseuse, l'OPG et divers facteurs de transcription osseux (Runx2/Cbfa1, Osterix, Sox9) stimulent la formation de l'os.

5.3.2. Calcification artérielle (28,43,44,53,63,65,67,69,72)

La processus de calcification artérielle est déclenché par l'inflammation et favorisé par un manque d'inhibition de l'ostéogénèse dans les artères (72). Il semble en effet qu'en situation physiologique, un certain taux d'inhibiteurs de la calcification soit nécessaire dans les tissus et la circulation pour éviter la survenue spontanée de calcifications ; par ailleurs, il semble que l'expression simultanée de collagène de type I et de PA suffise à la formation de calcifications ectopiques (70).

Le stress oxydatif et les cytokines inflammatoires, au centre de la physiopathologie de l'athérogénèse, semblent aussi à l'origine de la calcification artérielle par leurs effets stimulants sur les CMLV ; ces dernières sécrètent alors des vésicules matricielles, se différencient en cellules

vasculaires calcifiantes (CVC), ou meurent par apoptose avec formation consécutive de corps apoptotiques agissant comme des vésicules matricielles (53,69). Cette dédifférentiation, favorisée par le TNF- α et l' H_2O_2 , est inhibée par l'insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (70). L'apoptose est favorisée par le RANKL et le TRAIL, eux-mêmes inhibés par l'OPG (29). Les péricytes, les myofibroblastes de l'adventice, et peut-être des ostéoprogéniteurs médullaires, se dédifférentient aussi en CVC (43). La leptine, adipokine dont les taux sont augmentés dans le syndrome métabolique, accroît encore le stress oxydatif et l'inflammation en activant les cellules immunitaires (53).

En fonction de leur contenu, modulé par l'inflammation, en activateurs ou inhibiteurs de la calcification (MGP et fétuine A notamment), les vésicules matricielles peuvent stimuler ou bloquer la calcification (73,74). Les corps apoptotiques, chargés négativement, et les vésicules matricielles pauvres en inhibiteurs de la calcification, constituent des niches propices à la formation de cristaux d'hydroxyapatite.

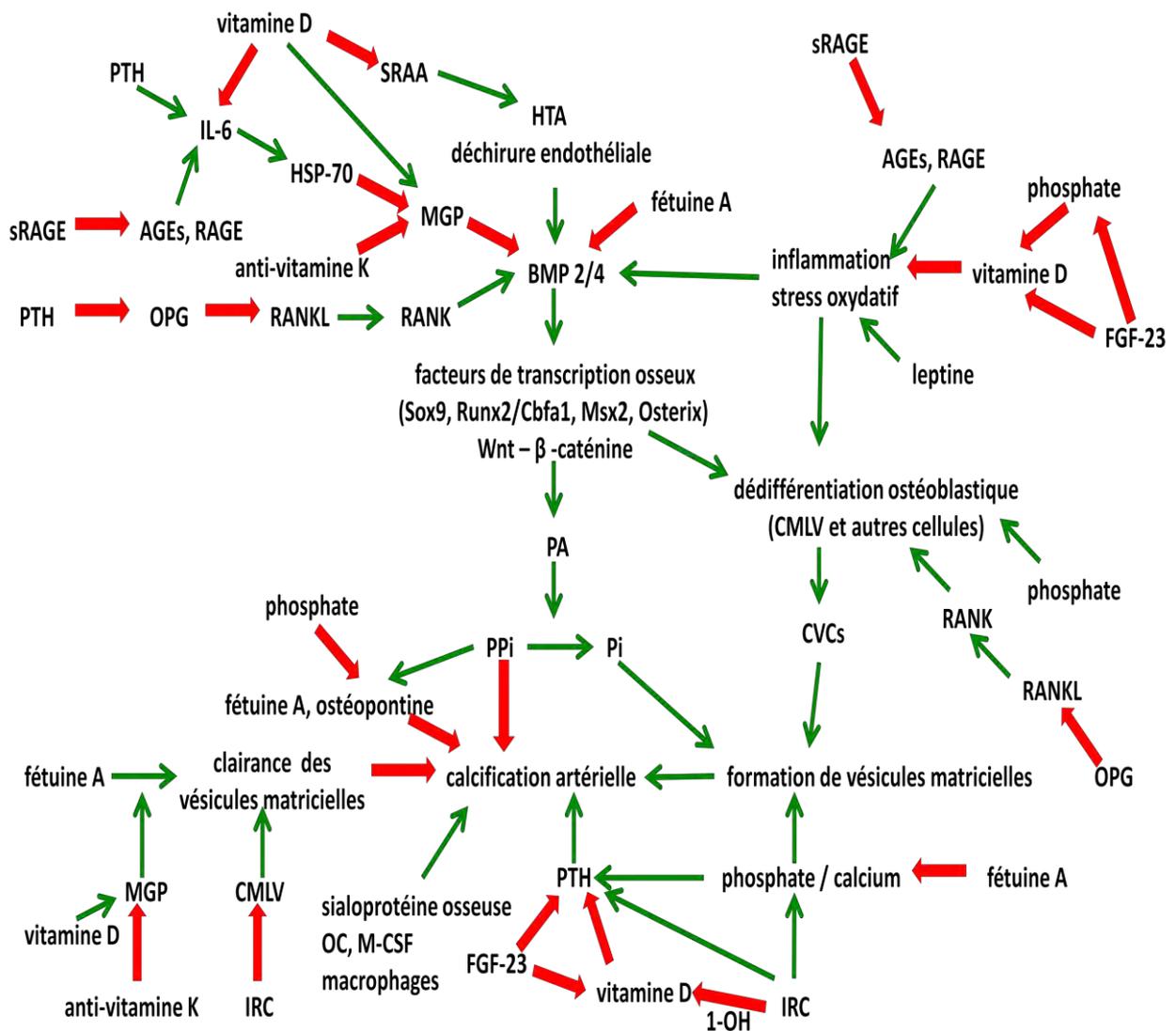
La calcification artérielle est ainsi activée par les cytokines inflammatoires, des facteurs de transcription ostéo-/chondrocytaires (Runx2/Cbfa1, Osterix, Msx2, Sox9) et des protéines osseuses procalcifiantes (PA, ostéocalcine, ostéonectine, and collagènes de type I et II) exprimés par les CVC (69,75). Une fois l'équilibre de la paroi artérielle modifié en faveur de la calcification, le processus s'accélère rapidement par rétrocontrôle positif ; en effet, les cristaux d'hydroxyapatite induisent une réponse inflammatoire des macrophages et l'apoptose de ces derniers et de CMLV, avec formation de nouvelles niches pour le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite (53,76). La calcification crée un « mur osseux » dans les artères et serait ainsi initialement un mécanisme de défense contre l'inflammation chronique, permettant d'isoler le corps du processus nocif (77).

L'évolution dépend ensuite de l'équilibre entre facteurs pro- et anticalcifiants (tableau 3 et figure 2). Les facteurs suivants sont procalcifiants dans les artères : cytokines pro-inflammatoires (notamment IL-6 et TNF- α), stress oxydatif, facteurs de transcription ostéogéniques, protéines du choc thermique (HSP70), RANKL, M-CSF, BMP-2 et 4 (activent la voie Wnt – β -caténine qui stimule la PA), Pi, ostéocalcine, sialoprotéine osseuse, stress mécanique (pression intravasculaire élevée, déchirure endothéliale), warfarine, IRC, dialyse. L'HTA systolique, caractéristique de la médiocalcose, contribue au processus calcifiant par induction du NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) et des BMP, voire par augmentation du RANKL en réponse au stress mécanique, de la même manière que les forces de cisaillement induisent l'expression du RANKL dans l'os (29). Les facteurs suivants ont au contraire un rôle anticalcifiant : MGP, OPG, fétuine A, ostéopontine, PPI.

Sur le plan thérapeutique, les statines semblent empêcher la progression de la calcification au stade initial en diminuant l'inflammation, réduisant ainsi le principal stimulus de l'ostéogenèse. En revanche, dans des stades plus avancés, le stimulus inflammatoire étant alors pratiquement nul, elles semblent inefficaces sur ce processus (72,81,82).

Par ailleurs, si le remodelage osseux squelettique est bien connu, il est fort probable que les calcifications artérielles puissent également régresser, grâce à l'action d'inhibiteurs de la calcification et de cellules de phénotype ostéoclastique. Plusieurs modèles murins montrent en effet que la restitution locale de MGP permet la régression des calcifications artérielles (83–86). De plus, des cellules de phénotype ostéoclastique sont présentes dans les plaques d'athérosclérose, mais en quantités relativement faibles car les stimuli qui activent les CMLV diminuent la différenciation ostéoclastique des macrophages, provoquant un déséquilibre en faveur du phénotype ostéoblastique et entravant ainsi la régression des calcifications artérielles (67). Finalement, les ostéoclastes seraient des régulateurs physiologiques de la calcification vasculaire de façon indépendante de l'athérosclérose (87).

Figure 2 : Calcification artérielle : régulation par les voies de l'inflammation et de l'ostéogénèse (44,63).



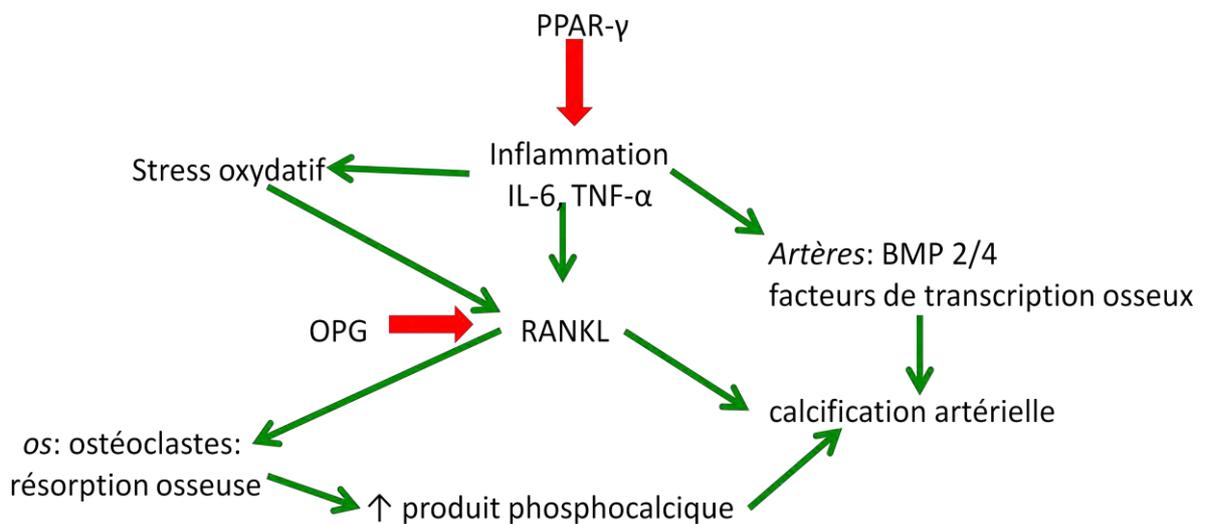
Légendes: flèche épaisse rouge: inhibition; flèche fine verte: activation.

Tableau 3 : principaux facteurs favorisant ou empêchant la calcification vasculaire.

Procalcifiants	Anticalcifiants
Cytokines pro-inflammatoires	Cytokines anti-inflammatoires
Stress oxydatif	
Facteurs de transcription ostéogéniques	
BMP-2 et 4, PA	
Macrophages, M-CSF	CMLV
HSP70, déficit en vitamine K, traitement par anti-vitamine K (inhibe MGP)	MGP
RANKL, RANK, TRAIL	OPG
Pi	PPi
ostéocalcine, sialoprotéine osseuse	Fétuine A, ostéopontine
AGEs / RAGE	sRAGE
Facteurs mécaniques : pression intravasculaire élevée, déchirure endothéliale	
IRC, dialyse, ↑ produit phosphocalcique	

5.3.3. Le « paradoxe de la calcification » (44,69)

Figure 3 : Le « paradoxe de la calcification » (44,69).



Légendes: flèche épaisse rouge: inhibition; flèche fine verte: activation

L'association entre ostéoporose, IRC, athérosclérose et calcification cardiovasculaire, appelée « paradoxe de la calcification », est connue depuis les années 1990 (88). Les mécanismes exacts ne sont pas parfaitement clairs, mais l'inflammation semble jouer un rôle prépondérant. En effet, les cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF-α en particulier) augmentent le stress oxydatif et l'expression du RANKL dans l'os comme dans les artères. Cependant, le RANKL stimule la calcification

dans les artères, alors qu'il augmente l'activité ostéoclastique dans l'os, avec comme résultat une augmentation de la résorption osseuse, une libération sérique de phosphate et de calcium, une augmentation du produit phosphocalcique sérique et donc une stimulation de la calcification artérielle. L'effet paradoxal du RANKL sur l'os et les artères est détaillé dans le chapitre spécifique. Dans les artères, le stimulus inflammatoire favorise également la calcification par augmentation des BMP et des facteurs de transcription osseux. La figure 3 illustre ce paradoxe.

5.3.4. Inflammation et insulin-like growth factor 1 (IGF-1)

L'inflammation, elle-même liée à la progression du diabète et à l'insulino-résistance, semble jouer un rôle d'autant plus important dans la physiopathologie artérielle en présence de diabète, en particulier par l'intermédiaire des peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), du TNF- α et de l'IL-6, principal activateur de la phase aiguë de l'inflammation et facteur prédictif de diabète (40,89). Le PPAR- γ , exprimé par les cellules spumeuses, protège contre l'athérosclérose par ses effets anti-inflammatoires (90), alors que l'IL-6 et le TNF- α favorisent le développement et la progression des lésions artérielles.

La protéine C-réactive ultrasensible (CRP_{us}) est associée au syndrome métabolique, au RCV et à la mortalité, mais pas toujours de façon indépendante des autres FRCV (91–96). Son rôle pathogène n'est pas clair et son augmentation, probablement secondaire à celle de l'IL-6, n'est peut-être qu'un épiphénomène.

Alors que la majorité des données cliniques concernent les atteintes des artères coronaires, une étude montre néanmoins une augmentation significative de l'IL-6 et de la CRP_{us} chez des patients diabétiques avec versus sans AOMI, mais sans association avec la sévérité de l'AOMI évaluée par l'ankle brachial index (ABI) (97). En revanche, les marqueurs inflammatoires ne semblent pas associés à la calcification vasculaire, que ce soit au niveau périphérique (98) ou coronaire (99), suggérant un rôle moindre de l'inflammation dans la pathogenèse de la calcification vasculaire par rapport à l'athérogenèse.

L'IGF-1, associé négativement à l'insulinorésistance et à l'insulinopénie, a des actions similaires à l'insuline et présente des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires bénéfiques contre l'athérosclérose (100,101). Ses effets prolifératifs et anti-apoptotiques sur les CMLV stabilisent les plaques d'athérome, mais peuvent néanmoins être néfastes dans des stades précoces d'athérosclérose, en favorisant l'hyperplasie néointimale (102–105). L'IGF-1 semble contrer la calcification vasculaire en inhibant la différenciation, la prolifération et la calcification des CVC (103). Si certaines études cliniques associent négativement IGF-1 et maladies cardiovasculaires, en accord avec les données de la recherche fondamentale, d'autres trouvent des résultats opposés ou l'absence de relation (102). Ces discordances peuvent provenir de l'hétérogénéité des critères

d'évaluation et/ou du fait que le dosage sérique de l'IGF-1 ne reflète probablement pas son activité biologique (102). De plus, comme l'IGF-1 diminue physiologiquement avec l'âge, un score standardisé doit être utilisé pour les analyses (106). Finalement, il est probable qu'il existe une courbe en « U » entre IGF-1 et RCV, avec des effets délétères à la fois pour des valeurs trop basses et pour des valeurs trop élevées d'IGF-1.

5.4. Marqueurs du remodelage osseux

Le lien entre ostéogenèse et artériopathie étant maintenant bien identifié, de nombreuses molécules sont en cours d'étude. Les trois voies analysées dans l'étude DIACART sont détaillées ci-dessous.

5.4.1. Voie ostéoprotégérine (OPG) / receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) / RANK

5.4.1.1. Voie OPG / RANKL / RANK et métabolisme osseux

Le RANKL est une protéine produite par les ostéoblastes, les cellules stromales de la moelle osseuse et les lymphocytes T activés (87) ; sa liaison à son récepteur principal (RANK) sur les ostéoclastes déclenche la voie du NF- κ B et induit, au niveau osseux, la formation, la différenciation, l'activation et la survie des ostéoclastes, conduisant à une augmentation de la résorption osseuse (107). Il existe deux formes du RANKL, l'une membranaire et l'autre soluble, cette dernière étant moins active (87). L'expression du RANKL est induite par de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, la vitamine D, la parathormone (PTH), les glucocorticoïdes, les forces de cisaillement et l'hyperlipidémie (28,87).

L'OPG est une glycoprotéine de la superfamille du TNF qui est produite dans de nombreux tissus (108). Son expression est induite par de nombreuses cytokines et par le 17 β -estradiol ; en revanche, les glucocorticoïdes, la ciclosporine A, la PTH, la vitamine D, la prostaglandine E₂ et l'insuline suppriment son expression (29,87,108). L'OPG est un récepteur « leurre » pour le RANKL, empêchant l'activation du RANK. Au niveau osseux, elle inhibe la différenciation des monocytes en ostéoclastes, de même que l'activation de ces derniers, contribuant à l'équilibre physiologique entre ostéolyse et ostéosynthèse (109).

5.4.1.2. Voie OPG / RANKL / RANK et calcification vasculaire

Dans les artères normales, on retrouve l'OPG, produite par les CMLV et par les cellules endothéliales, et le TRAIL, mais pas le RANKL. L'inflammation induit cependant l'expression de ce dernier dans les artères pathologiques (109,110). Par activation de son récepteur, le RANKL augmente l'expression du BMP-4, facteur ostéogénique qui stimule la calcification des CMLV. Il favorise également le chimiotactisme des monocytes humains, eux-mêmes au centre de la physiopathologie de l'athérogenèse (111), et stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF- α

qui active la voie Wnt – β -caténine, effet contré par l'inflximab (anticorps anti-TNF) (28,87). In vitro, la suppression du RANK, l'inhibition du NF- κ B ou l'induction de l'OPG empêchent la calcification artérielle induite par le RANKL (112). Les effets opposés du RANKL en fonction du type cellulaire (CMLV dans les vaisseaux ; monocytes / ostéoclastes dans l'os) expliquent en partie le « paradoxe de la calcification » discuté plus haut (44).

L'expression du TRAIL est élevée dans les lésions d'athérosclérose et son effet inducteur de l'apoptose est bien montré, mais son rôle dans la calcification n'est pas clair (113).

Alors que les souris transgéniques pour l'OPG et knockout pour le RANKL et le RANK développent une ostéopérose (114), la suppression de l'OPG provoque une ostéoporose due à un excès d'ostéoclastes, ainsi que d'importantes calcifications de l'intima et de la média, sans athérome, dans lesquelles on retrouve le RANKL et le RANK (110,115).

Chez la souris, un traitement par OPG diminue les calcifications et augmente la chape fibreuse de l'athérome, sans changer ni la taille ni le nombre de plaques, ni les concentrations vasculaires de cytokines, ni les taux plasmatiques de cholestérol (116). Ainsi, l'OPG semble stabiliser les plaques par augmentation de la chape fibreuse et diminution de la métalloprotéinase matricielle 12 (117). Elle pourrait néanmoins aussi avoir un effet néfaste par induction de la métalloprotéinase matricielle 9 qui augmente la formation d'anévrysmes et les hémorragies intra-plaques (118).

Une étude intéressante comparant des artères humaines tibiales avec médiacalcoses à des artères mammaires internes saines, montre que le RANKL est fortement exprimé uniquement dans les zones de médiacalcoses et qu'il induit la calcification des CMLV même en absence de milieu à haute concentration phosphocalcique ; ce mécanisme est atténué par l'OPG (119).

En résumé, le RANKL serait procalcifiant au niveau vasculaire, alors que l'OPG, surnommée « vasculoprotégérine », protégerait contre la calcification artérielle de plusieurs façons :

- 1) inhibition de l'activation ostéoclastique induite par le RANKL au niveau osseux avec diminution consécutive de la libération sérique de calcium et de phosphate (111) ;
- 2) inhibition locale de la calcification vasculaire induite par le RANKL dans les artères (111) ;
- 3) inhibition de la calcification vasculaire induite par la vitamine D et par la warfarine (120), par un effet similaire à celui des bisphosphonates (121) ;
- 4) inhibition de l'apoptose des CMLV induite par le TRAIL avec diminution consécutive de la formation de corps apoptotiques (29).

5.4.1.3. Voie OPG / RANKL / RANK : études chez l'homme

In vivo, les taux sériques d'OPG sont associés positivement au diabète, à ses complications microvasculaires, à l'ostéoporose, ainsi qu'à l'incidence, la prévalence, la progression et la sévérité des maladies cardiovasculaires (122–131). Chez les patients diabétiques, l'OPG est associée à

l'ischémie myocardique silencieuse (125,127) et au score calcique coronaire (SCC) dont elle serait un puissant facteur prédictif (99,132). Ainsi, elle pourrait devenir un nouveau marqueur de RCV, particulièrement utile lors de diabète de type 2 pour dépister les patients à risque d'ischémie myocardique silencieuse.

L'association positive, apparemment paradoxale, entre calcification artérielle, ostéoporose et OPG, reflète probablement un mécanisme incomplet de régulation contre le processus calcifiant et contre la déminéralisation osseuse ; l'échec de cette contre-régulation semble provenir, du moins en partie, d'une résistance à l'OPG, peut-être secondaire à l'augmentation locale du RANKL.

Les données sur le RANKL sont plus discordantes. Plusieurs études transvesales associent négativement le RANKL soluble (sRANKL) à la maladie coronarienne et à l'OPG (133–135). L'une d'entre elles, portant en particulier sur des patients avec IRC sévère, ne retrouve néanmoins pas d'association entre sRANKL et progression du SCC (135). La Framingham Study (3250 participants suivis 4.6 ans en moyenne) associe le sRANKL négativement et l'OPG positivement à différents FRCV, dont le diabète, sans trouver de lien entre sRANKL et événements cardiovasculaires (136). L'association négative entre sRANKL et diabète est retrouvée par d'autres auteurs (131).

Une étude prospective de 909 patients associe en revanche positivement le sRANKL à la survenue d'événements ischémiques aigus coronariens ou cérébraux, de façon très significative et indépendante de l'OPG et des principaux FRCV ($p < 0.001$) (137), relation pas retrouvée dans une grande étude cas-témoins ($n=25663$) (138). Une très petite étude ($n=27$) trouve des taux d'OPG significativement plus élevés chez des patients diabétiques versus témoins, et encore accrus en présence de neuroarthropathie de Charcot au stade aigu, alors que le sRANKL et le rapport sRANKL/OPG sont significativement augmentés uniquement dans le groupe de patients avec neuroarthropathie de Charcot (119). Une augmentation de l'OPG sérique et de l'expression du sRANKL par les lymphocytes T est retrouvée chez des patients avec angor instable versus patients avec angor stable ou témoins (139), suggérant un rôle du RANKL dans l'instabilité de plaque.

Il existe peu de données cliniques sur l'AOMI. Une étude associe la présence d'AOMI aux taux d'OPG et de TRAIL, et la sévérité de l'AOMI aux taux d'OPG, indépendamment du diabète, alors que les taux de sRANKL ne sont pas différents (97). Dans une petite étude très récente portant sur 58 diabétiques sans IRC, les meilleurs facteurs prédictifs de calcification fémorale et infra-poplitée (évaluée par scanner) à l'état initial sont l'âge, l'origine ethnique (blancs versus autre), la fonction rénale et la présence d'une neuropathie (R^2 0.74), tandis que l'association avec l'OPG devient significative uniquement après exclusion des facteurs démographiques (98). Les auteurs ne retrouvent en revanche aucune association avec la fétuine A ou le sRANKL.

Ces résultats discordants concernant le sRANKL suggèrent plusieurs hypothèses. L'association négative entre sRANKL et complications vasculaires, étonnante de prime abord d'après les données

in vitro et animales, pourrait s'expliquer par le fait que le sRANKL ne serait pas directement corrélé à l'expression locale de RANKL : une augmentation de son expression membranaire dans les lésions artérielles expliquerait une diminution de sa concentration sérique – le sRANKL étant moins actif que le RANKL membranaire (87). Par ailleurs, certains auteurs mesurent le sRANKL total, alors que d'autres ne dosent que sa forme libre, non complexée à l'OPG. De plus, le RANKL existe sous plusieurs isoformes en fonction des tissus. Il faut donc être prudent quant à l'interprétation de dosages effectués au niveau sérique. Par ailleurs, l'OPG et le sRANKL sont liés, et il est donc nécessaire d'évaluer non seulement ces deux marqueurs isolément, mais également le rapport sRANKL/OPG qui semble mieux refléter le métabolisme osseux et donc possiblement le lien avec la calcification vasculaire (44). Finalement, un rôle du sRANKL plutôt dans l'instabilité des plaques pourrait expliquer certaines discordances, notamment entre les 2 grandes études prospectives susmentionnées, l'une s'intéressant uniquement aux événements cardiovasculaires aigus, l'autre à la fois aux complications stables et instables (137,138).

Les rares études cliniques sur le TRAIL soluble (sTRAIL) ne l'associent pas à la calcification artérielle, mais ses taux semblent diminuer avec la gravité des lésions artérielles (113). Le sTRAIL reflèterait plutôt l'inflammation et la malnutrition (association négative) que la calcification dont il ne constituerait donc pas un bon marqueur (140).

En résumé, les études chez l'homme associent positivement l'OPG au RCV et à la calcification artérielle, alors que les données sur le RANKL sont discordantes et nécessitent de nouvelles investigations.

5.4.1.4. Voie OPG / RANKL / RANK et perspectives thérapeutiques

Le denosumab (Prolia®), anticorps humain monoclonal contre le RANKL, est déjà utilisé pour traiter l'ostéoporose chez les femmes post-ménopausiques à risque fracturaire élevé et chez les hommes sous traitement hormono-ablatif pour un cancer de la prostate (141).

Une étude évalue ce traitement chez des souris transgéniques pour une forme chimérique murine-humaine du RANKL (142). Les modèles sont traités par prednisolone versus placebo, puis par denosumab versus placebo. La prednisolone induit une augmentation de la calcification aortique. Dans les 2 groupes, le traitement par denosumab réduit le contenu calcique dans l'aorte et le cœur, avec diminution des dépôts minéraux dans l'aorte de 42%, surtout au niveau de la média. Par ailleurs, le TRAIL n'est pas inhibé par le denosumab, suggérant un rôle central du RANKL par rapport au TRAIL dans le processus de calcification artérielle. Ainsi, le denosumab semble être un traitement prometteur, mais ses effets sur l'os pourraient néanmoins en limiter l'utilisation dans la pathologie vasculaire, le diabète étant associé à l'ostéoporose et, en particulier lors d'IRC, à une ostéopathie adynamique dans laquelle le blocage osseux du RANKL peut être néfaste.

L'OPG serait donc une meilleure cible thérapeutique que le RANKL. Une forme recombinante d'OPG est actuellement à l'étude, en pathologie osseuse en particulier (143).

5.4.2. Fétuine A (α_2 -Heremans-Schmid glycoprotéine)

La fétuine A est une glycoprotéine sérique négative de la phase aiguë de l'inflammation, synthétisée par le foie (63). Ses taux sont abaissés lors de turnover osseux élevé (maladie de Paget par exemple) et augmentés lors de turnover osseux bas (ostéogénèse imparfaite par exemple) (144,145).

La fétuine A forme un complexe avec le calcium et le phosphate, responsable de 50% de la solubilisation sérique de ces ions. Ce complexe, composé de 18% de minéraux, 80% de fétuine A et 2% de MGP, est nommé « calciprotein particle », par analogie aux « lipoprotein particles », apolipoprotéines qui solubilisent les lipides (par exemple LDL, HDL, VHDL) (146,147).

Le rôle de la fétuine A dans l'artériopathie n'est pas parfaitement élucidé. Il semble en effet exister un effet biphasique, d'abord proathérogène, puis antiathérogène, en fonction du stade d'athérosclérose.

Les effets proathérogènes initiaux de la fétuine A sont liés à son inhibition du récepteur à l'insuline, avec insulino-résistance et dyslipidémie consécutives. Les souris knockout pour la fétuine A présentent en effet une augmentation de la clairance du glucose, une meilleure sensibilité à l'insuline, une résistance à la prise de poids et une diminution des acides gras libres et des triglycérides (148). La fétuine A est associée au syndrome métabolique chez l'homme également et prédit la survenue du diabète de type 2 (149,150). De plus, elle favorise la fibrose et la production de matrice extracellulaire (151).

Par la suite, la fétuine A semble antiathérogène par sa stimulation de l'expulsion des vésicules matricielles hors de l'athérome, par son effet anti-inflammatoire supprimant la sécrétion de TNF- α par les macrophages (152,153), et par son inhibition de la calcification artérielle par solubilisation du calcium et du phosphate et inhibition des BMP. Les souris knockout pour la fétuine A présentent en effet d'importantes calcifications des tissus mous (154). Ex vivo, les CMLV se calcifient de façon importante suite à une exposition à du calcium et à du phosphate, effet considérablement minimisé par l'adjonction de sérum contenant de la fétuine A (73). De même, l'incapacité d'empêcher la précipitation du calcium et du phosphate avec du sérum de patients hémodialysés, dont les concentrations en fétuine A sont abaissées, est restaurée par l'adjonction de fétuine A purifiée ramenant les taux sériques à la normale (155). Chez ces patients, la fétuine A est par ailleurs corrélée négativement aux calcifications des vaisseaux et des tissus mous et à la mortalité (cardiovasculaire et toutes causes confondues), soulignant le rôle anticalcifiant de cette glycoprotéine (155–158). La fétuine A pourrait ainsi être un nouveau marqueur de RCV dans cette population, malgré l'absence de relation avec la progression du SCC (135).

Chez les patients non dialysés, les données cliniques sont discordantes. Si trois études ne trouvent pas d'association significative entre fétuine A et calcification vasculaire (159–161), l'étude multiethnique sur l'athérosclérose corrèle inversement la fétuine A au SCC de façon transversale, mais ne retrouve d'association ni avec la progression ni avec l'incidence de la calcification coronaire (162). D'autres auteurs associent négativement fétuine A et athéromes calcifiés chez des patients diabétiques de type 2 sans néphropathie (163).

La fétuine A est associée négativement à l'AOMI définie par un ABI <0.9 (avec exclusion des patients avec ABI >1.4) chez des patients diabétiques (164) ; mais il faut noter que les patients avec atteinte coronaire sont exclus de cette étude, ce qui constitue un biais majeur, ces pathologies étant souvent concomitantes ; le fait que seulement 5% de la population étudiée présente un ABI <0.9 souligne ce biais ; ces résultats ne sont donc pas généralisables à l'ensemble des patients diabétiques.

Plusieurs auteurs trouvent au contraire une relation positive entre athérosclérose et fétuine A, avec une association au risque d'IM et d'AVC, après ajustement notamment pour le diabète (170), et au SCC chez des patients avec néphropathie non dialysée (165,166). Par ailleurs, la fétuine A semble corrélée positivement à la rigidité carotidienne (151), alors que l'association avec l'épaisseur intima-média n'est pas claire (151,167).

Une étude retrouve des taux de fétuine A plus élevés chez des patients diabétiques ou non avec AOMI peu sévère (stades III et IV de Fontaine exclus) par rapport à des patients diabétiques sans complication macrovasculaire, alors que la corrélation est négative avec la médiacalcosse, définie par un ABI >1.4 et un oscillographe pathologique (168).

Plusieurs éléments peuvent expliquer les résultats discordants entre ces différentes études : 1) l'absence de distinction entre l'atteinte de l'intima et de la média, et surtout entre les lésions artérielles calcifiées ou non ; 2) les effets à la fois pro- et antiathérogènes de la fétuine A, résultant en une courbe en « U » avec augmentation du RCV aussi bien avec des taux infranormaux (diminution des effets anticalcifians et anti-inflammatoires) qu'avec des taux supranormaux de fétuine A (induction d'insulino-résistance et dyslipidémie) (163) – des taux « normaux » semblant donc nécessaire pour balancer ces effets opposés ; 3) l'association positive avec le syndrome métabolique, qui peut biaiser l'association avec la calcification artérielle et rendre l'interprétation des dosages difficile, en particulier chez les patients diabétiques. Finalement, l'association positive pourrait être une contre-régulation positive, mais insuffisante, comme réaction de défense contre la calcification vasculaire.

En résumé, la fétuine A semble associée positivement au syndrome métabolique, à l'insulino-résistance et au diabète, et négativement à l'IRC dialysée, alors que l'association avec les atteintes macrovasculaires n'est pas claire.

En raison de la relation en « U » entre RCV et fétuine A, une normalisation de ses taux sériques pourrait représenter une nouvelle piste thérapeutique pour diminuer la calcification artérielle.

5.4.3. Fibroblast growth factor 23 (FGF-23)

Le FGF-23, produit dans l'os, régule le métabolisme phosphocalcique (44) : il inhibe la synthèse de PTH et la réabsorption de phosphate au niveau du tubule rénal proximal, et diminue les taux de vitamine D active par inhibition de la 1- α -hydroxylase rénale et activation de la 24-hydroxylase (169,170). Par ailleurs, l'effet phosphaturique diminuerait la dédifférentiation des CMLV en cellules de phénotype ostéoblastique (44).

Le corécepteur Klotho, protéine transmembranaire exprimée dans le rein, est nécessaire à l'activité du FGF-23 (171). L'inactivation du FGF-23 (172) ou de Klotho (171) chez la souris provoque un retard de croissance par diminution de la minéralisation de l'os cortical et du turnover osseux, un vieillissement prématuré, des calcifications vasculaires étendues de la média et de l'intima, une néphrosclérose, une absence de vasoréactivité à l'acétylcholine et à la noradrénaline, ainsi qu'une augmentation des taux sériques de 1-25-OH-vitamine D et de phosphate. Ces anomalies, normalisées par un régime pauvre en phosphate (173), soulignent l'importance de la régulation de la phosphatémie par le FGF-23 dans la modulation de la calcification vasculaire notamment.

Une mutation inactivatrice du FGF-23 ou de Klotho est associée à la calcinose tumorale familiale avec hyperphosphatémie (172,174). Au contraire, une surexpression du FGF-23 provoque ostéomalacie et rachitisme hypophosphatémique (175).

Lors d'IRC, les taux de FGF-23 augmentent avec l'altération de la filtration glomérulaire, ce qui pourrait être la conséquence de l'hyperparathyroïdisme secondaire et de l'hyperphosphatémie liées à l'IRC et représenter un mécanisme compensateur pour diminuer les taux de PTH et de phosphate (176). L'augmentation du FGF-23 prédit la progression de l'IRC, l'incidence de l'hémodialyse, la mortalité et la progression du SCC (177–179). Le FGF-23 est par ailleurs associé à l'hypertrophie ventriculaire gauche, peut-être suite à l'inhibition de l'hydroxylation de la vitamine D, puisque cette vitamine régule le SRAA et la prolifération des cardiomyocytes (180,181).

Le FGF-23 est associé à la rigidité artérielle lors d'IRC modérée, à des anomalies de vasoréactivité (182) et à un profil métabolique défavorable (adiposité, dyslipidémie athérogène) (183), mais les mécanismes d'action restent mal connus.

Les études sur le lien entre FGF-23 et athérosclérose en l'absence d'IRC sont encore rares. Une association positive avec la présence et/ou la sévérité de l'athérosclérose et avec les événements et/ou la mortalité cardiovasculaires est retrouvée par certains (161,176,184,185), alors que l'association avec la calcification vasculaire semble absente (159,186).

En résumé, l'association positive entre FGF-23 et complications vasculaires est bien démontrée chez les patients avec IRC, alors que les données restent éparpillées et discordantes en l'absence d'IRC.

5.5. Métabolisme phosphocalcique et risque cardiovasculaire (RCV)

L'élévation du produit phosphocalcique, l'hyperparathyroïdisme secondaire et le déficit en vitamine D sont associés à la calcification et aux maladies cardiovasculaires lors d'IRC (187). Il semble donc cohérent de supposer que ces mêmes anomalies soient associées au RCV chez les patients avec fonction rénale normale, mais les données de la littérature restent discordantes. Il s'agit par ailleurs d'une cible thérapeutique particulièrement intéressante, puisque des traitements sont d'ores et déjà utilisés couramment en clinique pour modifier les différents paramètres du métabolisme phosphocalcique.

5.5.1. Vitamine D

Le déficit en vitamine D, fréquent et facilement corrigé, est associé au diabète (types 1 et 2), à l'insulino-résistance, au syndrome métabolique et à la dysfonction des cellules β pancréatiques avec diminution de la production d'insuline (188–190). Un traitement substitutif quotidien de 1200mg de calcium et 800UI (20 μ g) de vitamine D diminue le risque de développer un diabète de type 2 de 33% par rapport à une substitution inférieure à 600mg de calcium et 400UI de vitamine D (10 μ g) (191).

La vitamine D est corrélée négativement au RCV, de façon indépendante et graduée (192–195). Par ailleurs, des études épidémiologiques associent les maladies cardiovasculaires à la situation de résidence (latitude élevée, altitude basse, environnement urbain) et à la saison hivernale (193,196), facteurs influençant l'exposition solaire et par conséquent les réserves en vitamine D. En effet, chez l'homme, l'exposition aux rayons ultraviolets B est responsable de 80 à 90% de l'apport en vitamine D, le reste provenant de l'alimentation (en particulier poissons gras, jaune d'œuf, produits laitiers, beurre, produits supplémentés en vitamine D) (197).

La vitamine D (cholécalférol) nécessite deux hydroxylations pour être active : la première dans le foie en position 25 et la seconde dans les reins en position 1, sous le contrôle de la PTH et de la 25-OH-vitamine D circulante (calcifédiol). La 25-OH-vitamine D sérique détermine l'état des réserves corporelles, stratifiées en déficit (<10ng/ml), insuffisance (10-30ng/ml), suffisance (30-100ng/ml) et toxicité (>100ng/ml) ; les normes indiquées ici correspondent à celles utilisées dans le laboratoire de biochimie endocrinienne du GHPS, car il n'existe pas de consensus sur ces valeurs (197).

En plus de son rôle essentiel dans le métabolisme phosphocalcique, la 1-25-OH-vitamine D (calcitriol) régule de nombreux autres processus et semble protéger contre la calcification vasculaire. Des récepteurs à la vitamine D sont en effet présents sur différentes cellules dont les cardiomyocytes et les CMLV, sur lesquels le calcitriol exerce un effet antiprolifératif (180,198–200). D'autre part, la

vitamine D augmente la synthèse de MGP, qui elle-même inhibe la calcification vasculaire (201), alors qu'un déficit en vitamine D augmente les taux de RANKL (29) et de PTH. Par ailleurs, elle a un effet favorable sur l'inflammation (202–204) et sur le métabolisme lipidique : baisse du VLDL et des triglycérides, augmentation du HDL et de l'activité de la lipoprotéine lipase dans le tissu adipeux (189,205). De plus, indépendamment du métabolisme phosphocalcique, la vitamine D régule de façon négative le SRAA (181) et est corrélée inversement à la TA (189).

Des études animales suggèrent cependant qu'un traitement par vitamine D favoriserait la calcification vasculaire (83,84,206), mais avec des doses très élevées, d'environ 10mg/j, alors que les apports recommandés chez l'homme sont de 15µg/j, soit presque mille fois moindres (207). Par ailleurs, ces calcifications sont réversibles à l'arrêt du traitement (83). Des doses allant jusqu'à 100µg/j ne provoquent ni hypercalcémie ni taux toxiques de vitamine D chez l'homme (207), de sorte que les doses utilisées en clinique ne semblent pas à risque de favoriser la calcification vasculaire.

En résumé, la vitamine D protégerait contre la calcification vasculaire, par ses effets propres et par sa régulation des taux de PTH. La substitution des patients présentant un déficit en vitamine D semble donc particulièrement importante pour ces deux raisons.

5.5.2. Hormone parathyroïdienne (PTH)

L'hyperparathyroïdisme, qu'il soit primaire ou secondaire à une IRC ou à un déficit en vitamine D par exemple, est associé à une augmentation de la morbi-mortalité cardiovasculaire (187,208). Plusieurs mécanismes sont évoqués : la PTH :

- augmente la contractilité cardiaque et les calcifications vasculaires, myocardiques et valvulaires ; elle est associée à la dysfonction endothéliale, à la dysfonction ventriculaire systolique et diastolique (avec hypertrophie ventriculaire gauche et fibrose myocardique) et à l'HTA ;
- est associée à l'intolérance au glucose, à l'insulino-résistance et à la dyslipidémie (augmentation des triglycérides et du cholestérol total, diminution de l'activité et de la production de la lipase hépatique) (208–210) ;
- semble avoir un effet pro-inflammatoire par augmentation de la synthèse hépatique et osseuse d'IL-6, cytokine qui non seulement stimule la résorption osseuse par les ostéoclastes (effet recherché par la PTH), mais favorise aussi l'athérogenèse (211,212) ;
- augmente l'expression du RANKL (29).

Une étude prospective récente dans la communauté (suivi sur environ 10 ans) associe PTH et RCV de façon indépendante, attribuant à la PTH 20% du RCV, même en l'absence d'anomalie de la fonction rénale et des taux de vitamine D, calcium et phosphate (213). Dans cette étude, la PTH prédit par ailleurs la mortalité cardiovasculaire même lorsque ses taux sont dans la limite de la norme.

En résumé, la PTH serait un marqueur et/ou facteur de RCV. Mais en raison de son implication dans le métabolisme phosphocalcique, elle peut parfois simplement refléter d'autres anomalies sous-jacentes associées au RCV. Bien que la baisse des taux de PTH par parathyroïdectomie (208) ou par calcimimétique (214) diminue les événements cardiovasculaires lors d'hyperparathyroïdisme primaire ou secondaire, il n'existe pas d'évidence d'un bénéfice direct d'abaisser les taux de PTH dans la population générale, que ce soit par substitution en vitamine D ou par calcimimétique.

5.5.3. Produit phosphocalcique

Si l'association entre produit phosphocalcique et RCV est bien connue lors d'IRC (187), elle semble aussi exister en l'absence d'IRC, suggérant que le dosage de la calcémie et de la phosphatémie puisse donner des informations pronostiques sur le RCV dans la population générale.

5.5.3.1. Phosphatémie

La phosphatémie est associée aux maladies cardiovasculaires (215–220). Dans l'étude prospective Framingham Offsprings (suivi de 20 ans d'une population exempte d'IRC et de maladies cardiovasculaire à l'entrée), la phosphatémie et le produit phosphocalcique sont associés positivement à l'âge, à la CRPus, à l'index athérogène (cholestérol total/HDL) et au RCV (risque relatif 1.31, intervalle de confiance 95% 1.05-1.63), et négativement à l'indice de masse corporelle (IMC) et à la TAS (219), tandis qu'une autre étude associe négativement phosphatémie et syndrome métabolique (221).

Alors que Foley corrèle la phosphatémie au SCC (215), d'autres auteurs l'associent de façon beaucoup plus forte au risque d'AVC et de décès qu'aux accidents coronariens, ce qui semble s'expliquer par des effets différents du calcium et du phosphate en fonction du type et de la localisation des artères (216).

En résumé, la phosphatémie semble associée positivement aux maladies cardiovasculaires également en l'absence d'IRC. Plusieurs mécanismes expliquent cette relation : le phosphate :

- induit la dédifférentiation des CMLV en cellules de phénotype ostéoblastique et leur calcification (78,222) ;
- diminue la synthèse de vitamine D (223,224) et augmente les taux de PTH (225) ;
- augmente les taux d'ostéopontine, protéine qui inhibe la formation et la progression des calcifications et favorise leur régression (78,226).

5.5.3.2. Calcémie

Les données sur le lien entre calcémie et RCV sont discordantes. Alors que plusieurs études sont négatives (219,227), le suivi de 2176 sujets dans la population générale pendant 30 ans associe calcémie, phosphatémie et produit phosphocalcique au risque de décès (217), la calcémie étant néanmoins surtout liée à la mortalité non-cardiovasculaire et la phosphatémie à la mortalité cardiovasculaire.

Deux grandes études prospectives associent la calcémie à la mortalité, dont 58% d'origine cardiovasculaire (228), et à l'HTA, la glycémie à jeun, la cholestérolémie et l'incidence des IM (229). Par ailleurs, la supplémentation calcique semble augmenter les événements cardiovasculaires (230). Au contraire de la phosphatémie, la calcémie est associée positivement à l'intolérance au glucose, même en l'absence d'IRC (210,229).

En résumé, la calcémie semble associée positivement au RCV, mais les données sont encore rares.

5.6. Voie de la glycation

5.6.1. Produits de fin de glycation (advanced glycation end products, AGEs) (231,232)

Comme discuté plus haut, l'hyperglycémie participe probablement de façon importante aux complications macrovasculaires du diabète. Bien que d'autres mécanismes soient impliqués, la voie de la glycation avancée jouerait un rôle central dans la toxicité liée à l'hyperglycémie chronique, les AGEs participant à la « mémoire glycémique » qui explique l'impact délétère de l'hyperglycémie sur les artères plus de 15 ans après la période d'hyperglycémie (233) – la formation d'AGEs étant irréversible. Les modèles murins transgéniques montrent par ailleurs le rôle de la glycation dans les complications vasculaires du diabète (234–237).

Au niveau biochimique, la glycation non enzymatique, ou réaction de Maillard (figure 4), consiste en l'adjonction d'un groupe aldéhyde ou cétone d'un sucre sur une protéine ou un lipide, formant une base de Schiff qui est ensuite réarrangée en produit d'Amadori (exemples : LDL glyqué, albumine glyquée, HbA1c), plus stable, avec groupe carbonyle libre, à lui seul déjà responsable d'effets délétères (238–240). Les produits d'Amadori peuvent être dégradés en produits de glycation intermédiaires (glyoxal, 3-deoxy-glucosone, méthyl-glyoxal), qui résultent aussi directement de l'auto-oxydation du glucose et sont lentement réarrangés pour conduire à la formation irréversible d'AGEs.

Différents AGEs sont décrits : pentosidine, MG-H1 (methyl-glyoxal-hydroimidazolone-1), CML (N ϵ -carboxyethyllysine), CEL (N ϵ -carboxymethyllysine), GH (glyoxal-derived hydroimidazolone), 3-DGH (3-deoxyglucosone hydroimidazolone), GOLD (glyoxal lysine dimer), MOLD (methylglyoxal lysine dimer), DOLD (3-deoxyglucosone lysine dimer), pyrroline, FFI (2-(2-furoyl)-485-furanyl-1H-imidazole), AFGP

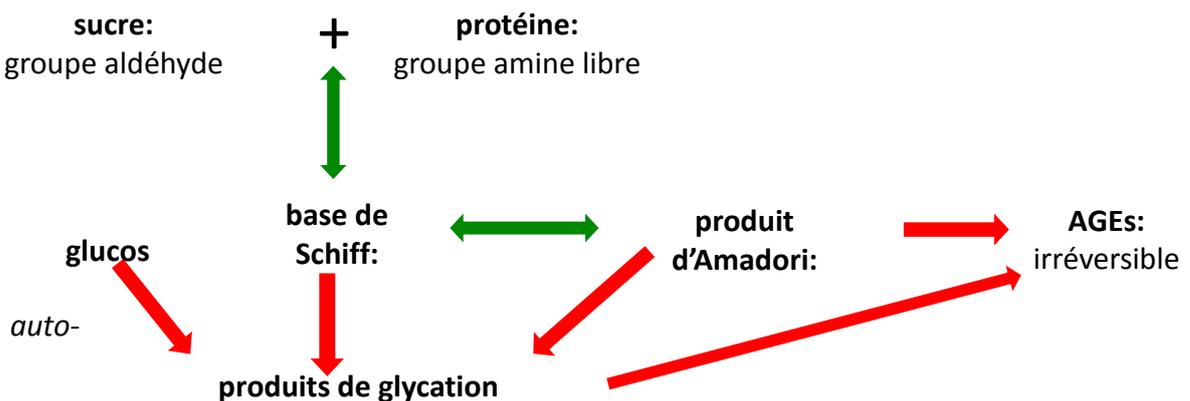
(1-alkyl-2-formyl-3,4-diglycosyl pyrrole). La CML, provenant de la glycoxydation des protéines ou de la peroxydation lipidique, est l'AGE prédominant, retrouvé en quantités importantes dans les plaques d'athérosclérose, les cellules spumeuses et le sérum des patients diabétiques (241–243).

Les facteurs-clés déterminant le taux de formation des AGEs sont le degré d'hyperglycémie, le type de sucre (réaction plus rapide avec le fructose et le glucose-6-phosphate qu'avec le glucose), l'importance du stress oxydatif environnant, le vieillissement naturel et le taux de turnover des protéines – directement lié à la durée d'exposition de celles-ci aux sucres.

Le dosage sérique des AGEs est facilement réalisable, bien que coûteux et nécessitant une technique sophistiquée, mais le résultat n'est pas forcément corrélé à leurs taux tissulaires (244,245). Les AGEs cutanés semblent en revanche mieux refléter les AGEs tissulaires (246).

Les effets délétères des AGEs peuvent être subdivisés en deux grands groupes, selon qu'ils sont ou non médiés par un récepteur.

Figure 4 : Glycation non enzymatique ou réaction de Maillard (231).



Légendes: flèche à double sens verte: réaction réversible; flèche à sens unique rouge: réaction irréversible.

5.6.1.1. Effets indépendants d'un récepteur

Certains AGEs, dits « cross-linking » (pentosidine, GOLD, MOLD, DOLD), conduisent à la formation de ponts entre les fibres de collagène de la matrice extracellulaire, les rendant résistantes aux collagénases, ainsi qu'entre le collagène et des éléments plasmatiques trappés dans les parois vasculaires (immunoglobulines, LDL), de même qu'entre deux molécules d'AGEs. Le collagène est particulièrement concerné par la glycation en raison de sa longue demi-vie et donc de sa durée d'exposition prolongée à l'hyperglycémie. Ces ponts augmentent la synthèse de la matrice extracellulaire (collagène, vitronectine, laminine) et en altèrent la fonction, contribuant à rigidifier les artères. La calcification accroît encore la rigidification des artères et semble provoquer un feedback positif, avec développement d'un cercle vicieux (70).

Par ailleurs, les AGEs provoquent l'adhésion de cellules circulantes à la paroi vasculaire et favorisent la vasoconstriction par augmentation de la synthèse d'endothéline-1, baisse de celle de prostacycline, diminution de la production et inactivation du NO, et baisse de l'activité et raccourcissement de la demi-vie de la NO synthase.

La glycation des lipides concerne l'apolipoprotéine B (apoB) et le LDL dont elle ralentit la clairance par diminution de l'affinité du récepteur hépatique pour les formes glyquées de LDL ; elle augmente le stress oxydatif et donc la formation de LDLox, en parallèle avec une expression accrue du récepteur aux LDLox (LOX-1) par les macrophages. La liaison des AGEs aux érythrocytes augmente également la production d'espèces réactives d'oxygène. Par ailleurs, le LDL glyqué diminue la production de NO. Les effets sur le NO semblent particulièrement relevant, puisque ce dernier est un important facteur antiathérogène par son action vasodilatatrice, son effet antiprolifératif sur les CMLV et son inhibition de l'adhésion des leucocytes aux parois vasculaires et de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaires.

5.6.1.2. Effets dépendants d'un récepteur

Les AGEs sont principalement reconnus par le RAGE (receptor for AGEs), un récepteur de la famille des immunoglobulines dont il existe deux formes, l'une transmembranaire et l'autre soluble circulante (sRAGE).

La forme transmembranaire se trouve sur trois types cellulaires importants dans l'athérogenèse : cellules endothéliales, CMLV, monocytes-macrophages. Le RAGE lie non seulement les AGEs, mais également d'autres molécules pro-inflammatoires. La liaison des AGEs au RAGE conduit à leur internalisation par endocytose. Alors que l'expression du RAGE est faible dans les tissus et vaisseaux normaux, elle est induite par les lésions tissulaires et par les ligands du RAGE, engendrant un cercle vicieux par rétrocontrôle positif (232). Une variabilité interindividuelle de l'expression du RAGE semble par ailleurs expliquer en partie la susceptibilité aux complications vasculaires du diabète (235).

L'activation du RAGE sur les cellules endothéliales augmente le stress oxydatif intracellulaire qui active la voie RAS – MAPK – NF-κB, avec comme conséquences : augmentation de cytokines pro-inflammatoires, du vascular endothelial growth factor et de molécules d'adhésion leucocytaires ; effet procoagulant par augmentation du facteur tissulaire et diminution de la thrombomoduline ; hyperperméabilité endothéliale par altération de l'actine et de la morphologie cellulaire ; diminution de l'activité de la glyoxalase-I, enzyme qui empêche la formation d'AGEs en milieu hyperglycémique (247).

L'activation du RAGE sur les CMLV stimule leur prolifération et leur production de fibronectine, ainsi que la prolifération néointimale (248,249), favorisant la resténose ; les souris RAGE^{-/-} présentent en

effet une réponse néointimale significativement réduite suite à une lésion vasculaire (250). Ce mécanisme semble significatif dans les lésions myocardiques d'ischémie – reperfusion (251–253).

Les macrophages sont activés par la liaison des AGEs au RAGE, avec augmentation de leur chimiotactisme et ralentissement de leur migration (apoptaxis) ; cela permet leur activation là où les AGEs sont présents, avec comme conséquence notamment une augmentation de cyclo-oxygénase 2 et de prostaglandine E₁, molécules qui augmentent les métalloprotéinases matricielles qui elles-mêmes favorisent l'instabilité des plaques d'athérome.

L'activation des macrophages par la CML, via le RAGE, induit leur apoptose et la différenciation des CMLV en cellules de phénotype ostéoblastique (254).

Les AGEs se lient également à d'autres récepteurs que le RAGE (232). L'activation des récepteurs scavenger de classe A des macrophages, ainsi que des AGE-R1, -R2 et -R3, n'induit pas de transduction de signal cellulaire, mais semble antiathérogène en favorisant la clairance et la détoxification des AGEs. En revanche, l'activation des récepteurs scavenger de classe B des macrophages augmente le stress oxydatif et interfère avec la captation du HDL. Les AGEs augmentent l'expression de LOX-1 et la captation du LDLox et du LDL glyqué par les macrophages (affinité des récepteurs plus élevée que pour le LDL natif, contrairement aux récepteurs hépatiques).

5.6.1.3. AGEs et complications vasculaires du diabète chez l'homme

Les AGEs sont associés à la durée et aux complications microvasculaires du diabète (255–261). Si l'association avec la macroangiopathie est décrite au niveau coronarien et carotidien lors de diabète de type 2 (262–265), les données sur l'AOMI sont encore éparses et demandent confirmation. Une étude associe l'AOMI, définie par un ABI ≤ 0.9 (médiocalcose exclue par échographie-doppler artérielle des membres inférieurs (EDA)), aux taux de pentosidine et d'AGEs sériques chez des patients diabétiques de type 2 et non diabétiques (266).

5.6.2. Récepteur soluble aux AGEs (sRAGE)

La forme soluble du RAGE, le sRAGE, résulte d'une forme clivée du RAGE transmembranaire et de plusieurs isoformes produites par épissage alternatif (endogenous soluble RAGE, esRAGE) (267). Son rôle reste controversé. L'administration de sRAGE aux souris diabétiques apoE^{-/-} suggère que ce dernier agit comme récepteur « leurre », avec un effet antiathérogène en empêchant la liaison des AGEs au RAGE (234,268–270). Par ailleurs, l'esRAGE tronqué en N-terminal ne semble pas lier les AGEs et serait donc inactif, contrairement à l'isoforme tronquée en C-terminal qui pourrait quant à elle s'avérer protectrice (267). S'il est possible de doser la fraction esRAGE du sRAGE, on ne dispose en revanche pas encore de test permettant d'individualiser ses différentes isoformes. Un déséquilibre entre les différentes isoformes peut expliquer la complexité des effets du sRAGE et les

résultats divergents retrouvés dans la littérature quant aux relations avec les complications vasculaires.

Le sRAGE est associé négativement à l'âge, à l'HTA, au tabagisme et à la résistance à l'insuline (syndrome métabolique, intolérance au glucose, diabète), association plus forte chez les patients intolérants au glucose que chez les patients diabétiques, et qui diminue avec la durée du diabète (271).

Des taux abaissés de sRAGE semblent prédire les complications vasculaires (272). La Dallas Heart Study (n=2571) associe négativement sRAGE et SCC, relation demandant néanmoins confirmation dans certains sous-groupes de l'étude comme les patients diabétiques (273). Falcone aussi associe négativement sRAGE et maladie coronarienne chez des patients non diabétiques (274) et Koyama montre une corrélation inverse entre sRAGE et épaisseur intima-média carotidienne et fémorale – mais significative uniquement chez les patients non diabétiques (271).

Chez les patients avec diabète de type 2, le sRAGE est en revanche associé positivement à la rigidité aortique (275), à la maladie coronarienne (276), à l'incidence et à la prévalence des événements coronariens (272), aux taux d'AGEs et aux complications microvasculaires du diabète (260,277,278), soutenant l'hypothèse d'une augmentation réactionnelle, bien qu'insuffisante, pour contrer l'augmentation des AGEs. Le rétrocontrôle positif induit par les ligands du RAGE transmembranaire sur son expression pourrait également expliquer l'augmentation de la forme circulante.

Ainsi, les données concernant la relation entre sRAGE et RCV sont encore discordantes, et semblent être opposées en fonction de la présence ou non de diabète.

5.6.3. Voie de la glycation et perspectives thérapeutiques

La mise en évidence du rôle des AGEs dans les complications du diabète ouvre la porte à de nouvelles voies thérapeutiques. Chez la souris, l'injection de sRAGE permet d'arrêter, voire de supprimer l'athérosclérose (268,270), tandis que chez l'homme, des antagonistes du RAGE sont en développement clinique pour le diabète et la maladie d'Alzheimer (272).

Les inhibiteurs de la formation ou de l'accumulation des AGEs, comme le LR-90, l'aminoguanidine (pimagédine) ou l'ALT-946 (N-2-(acetamidoethyl)hydrozinecarboximidamide hydrochloride) montrent des résultats prometteurs chez l'homme et chez l'animal (279–284), néanmoins contrebalancés par un effet délétère par inhibition de la NO synthase ; de plus, ils semblent surtout utiles au stade initial de la maladie diabétique et probablement inefficaces si les AGEs sont accumulés depuis longtemps. Cette constatation conduit au développement d'agents permettant de cliver les AGEs, tels que le PTB (N-phenacylthiazolium bromide) ou l'ALT-711 (alagebrium), et donc probablement efficaces dans des stades plus avancés du diabète, comme cela a déjà été démontré chez l'animal (282,285–288).

Par ailleurs, une partie du bénéfice du traitement cardiovasculaire standard recommandé actuellement est peut-être obtenue par modulation de la voie de la glycation. Ainsi, les statines semblent stabiliser la plaque d'athérome en diminuant l'expression du RAGE (289,290), et diminuer les concentrations d'AGEs (291), de même que l'activation de plusieurs voies stimulées par ces derniers (292–294). Les bloqueurs du SRAA diminuent la production de précurseurs carbonyl réactifs (295) ; le ramipril réduit l'accumulation d'AGEs chez le rat (296), tandis que le périndopril augmente le sRAGE et diminue les AGEs plasmatiques (297). Les agonistes du PPAR diminuent l'expression du RAGE, la prolifération cellulaire in vitro, l'hyperplasie néointimale (298) et la captation de LDL glyqué par les macrophages, par diminution de la lipoprotéine lipase (299) ; tous ces mécanismes semblent dépendant du RAGE.

In vitro et chez l'animal, la pyridoxamine (vitamine B₆) diminue la quantité d'AGEs dans le collagène et la formation d'AGEs, notamment en empêchant la transformation des produits d'Amadori en AGEs (300–303).

Les AGEs proviennent également de l'alimentation : viande, fromage, jaune d'œuf, aliments frits, grillés ou cuits à température élevée ou pendant une durée prolongée ; au contraire, on retrouve peu d'AGEs dans les hydrates de carbone (304). Chez les patients diabétiques, une alimentation riche en AGEs est associée à une augmentation de leurs taux plasmatiques, des « cross-links », de diverses voies induites par les AGEs, des marqueurs inflammatoires, du LDL et du LDLox (305,306). Par ailleurs, l'excrétion des AGEs est diminuée lors de néphropathie diabétique, et une alimentation pauvre en AGEs en ralentit la progression (307,308).

Le blocage complet des AGEs, bien que probablement réalisable en pratique clinique, semble néanmoins incompatible avec la vie, qui nécessite un équilibre entre taux tolérables et délétères d'AGEs pour un vieillissement réussi.

5.7. Adiponectine

Plus qu'une simple réserve énergétique, le tissu adipeux constitue un réel organe endocrinien dont les implications dans les perturbations métaboliques telles que l'obésité, la résistance à l'insuline ou le diabète, sont bien démontrées (309–313). L'adiponectine, principale hormone produite par le tissu adipeux, est associée inversement à l'insulino-résistance, au diabète de type 2, à la dyslipidémie, à l'HTA et à l'obésité viscérale (310,312–315). Une adiponectine basse ne semble néanmoins pas être une cause, mais plutôt une conséquence de l'obésité, et prédit la survenue du diabète de type 2 (316) ; en effet, toute perte de poids significative améliore non seulement la sensibilité à l'insuline, mais augmente également l'adiponectine (290).

Les données animales suggèrent des effets protecteurs de l'adiponectine sur le système cardiovasculaire, peut-être par inhibition de la production de TNF- α par le tissu adipeux (311). En

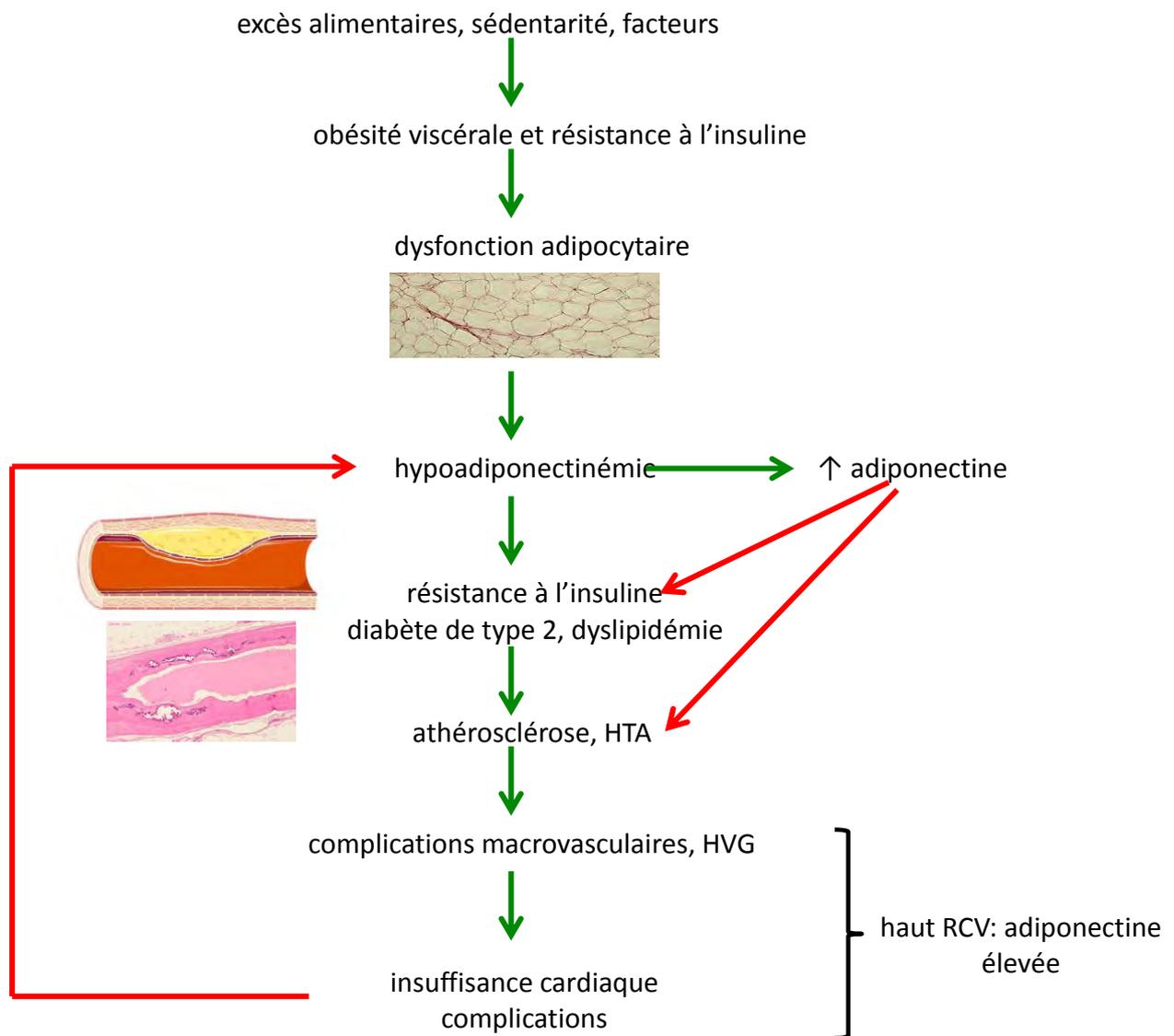
effet, l'injection d'adiponectine améliore l'angiogenèse et réduit l'inflammation, l'accumulation lipidique dans les parois vasculaires, la prolifération intimale et la formation de thrombus (317–319). Chez l'homme, la relation entre adiponectine et complications cardiovasculaires n'est pas claire ; en effet, selon les études, on observe une association positive (320–325), négative (326–330) ou nulle (331–333), qui semble dépendre du stade de la pathologie (310,321,334). Ainsi, chez des patients sans maladie cardiovasculaire évidente, une adiponectine basse serait liée à un profil de risque défavorable (insulino-résistance, HTA, dyslipidémie, obésité viscérale), suggérant un éventuel rôle protecteur de l'adiponectine contre la progression de l'athérosclérose et du syndrome d'insulino-résistance. Au contraire, chez des patients à un stade plus avancé et compliqué (maladie cardiovasculaire manifeste, insuffisance cardiaque, IRC), une adiponectine élevée reflèterait un profil de risque défavorable associé à un risque accru de décès. Elle pourrait alors être liée à un mauvais état général et nutritionnel – un IMC élevé étant associé à un bon pronostic chez ces patients ; néanmoins, elle pourrait aussi refléter, comme pour l'OPG, une tentative contre-régulatrice de défense contre l'inflammation vasculaire et le stress oxydatif liés à l'athérosclérose (335,336). L'association clinique aux marqueurs inflammatoires systémiques, notamment à la CRPus, est cependant négative ou absente (321,337–339), mais ces résultats sont peut-être expliqués par le fait que les marqueurs sériques ne reflètent pas toujours adéquatement l'activité locale. Ce mécanisme compensatoire pour essayer d'améliorer le profil de RCV serait néanmoins insuffisant pour contrer la progression de la pathologie artérielle ; à ce stade, l'adiponectine serait donc un marqueur de RCV accru. Ainsi, il faudrait peut-être interpréter les taux d'adiponectine de façon différente en fonction du stade d'atteinte vasculaire. La figure 5 illustre ce paradigme.

D'autres explications possibles pour cette relation positive, comme une diminution de la clairance rénale de l'hormone ou une perte de poids, physiologiques avec l'âge, ne sont pas démontrées (356). Plus récemment, Gaens (340) corrèle inversement CML sérique et adiposité viscérale. Il étudie des adipocytes humains et des souris obèses diabétiques RAGE^{-/-}, et montre que la CML circulante est trappée dans le tissu adipeux, viscéral en particulier, par un mécanisme dépendant du RAGE, et que son accumulation induit, par activation du RAGE, une diminution de l'expression d'adiponectine et de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, parallèlement à une augmentation de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6. Ce mécanisme peut s'avérer à la fois délétère, en contribuant à la dysfonction adipocytaire associée à la résistance à l'insuline avec sécrétion de molécules pro-inflammatoires, mais également salutaire, en empêchant les effets néfastes des AGEs dans d'autres tissus, notamment vasculaires, et contribuer ainsi à expliquer le paradoxe de l'adiponectine.

Les données sur l'AOMI sont également discordantes, avec une association négative (341–344) ou positive en fonction des études (345–347). Une adiponectine élevée semble prédire la mortalité chez

des patients avec AOMI symptomatique, de façon indépendante des autres facteurs prédictifs connus, à l'exception de l' amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) (334,348). L'implication physiopathologique de l'adiponectine dans les complications vasculaires n'est donc pas parfaitement démontrée et il reste possible qu'elle n'en représente qu'un épiphénomène. Finalement, l'adiponectine influencerait le métabolisme osseux régulé par la voie OPG/RANKL/RANK, ce qui expliquerait une partie du lien entre IMC et masse osseuse, bien que les résultats restent discordants (349–352). A notre connaissance, il n'existe par contre pas d'étude sur le lien direct entre l'adiponectine et la voie OPG/RANKL/RANK dans la physiopathologie vasculaire. En résumé, les données entre adiponectine et RCV sont encore discordantes, et nécessitent de nouvelles études.

Figure 5 : le paradoxe de l'adiponectine (310).



Légendes: flèche rouge: inhibition; flèche verte: activation.

6. Score de calcification

La mesure du score calcique a été développée initialement pour les artères coronaires il y a une vingtaine d'années. Le but était de créer un outil rapide, sensible et standardisé, pour détecter et quantifier la calcification artérielle, afin de mieux décrire la maladie coronarienne (353). Le SCC est un facteur prédictif d'accident coronarien (99) et de mortalité toutes causes confondues (354), indépendamment d'autres FRCV.

Le diabète et le déséquilibre glycémique sont des facteurs de risque de progression du SCC (47,48,99). La vitesse de progression du SCC est fortement corrélée au SCC initial, avec la progression la plus rapide chez les patients avec SCC élevé au départ, reflétant probablement le cercle vicieux impliqué dans le développement des calcifications artérielles, par rétrocontrôle positif (99). La répétition de cet examen d'imagerie semble donc surtout utile lors de score initial élevé. Le SCC est par ailleurs corrélé à l'OPG chez les patients diabétiques, mais pas à la CRPus ni à l'IL-6 (99,132).

Ce principe est actuellement utilisé pour mesurer la calcification des artères de jambe également (score calcique infra-poplité, SCIP). Le SCIP exclut volontairement les régions aorto-iliaques et fémorales car ce sont les lésions infra-poplitées qui sont particulièrement associées au risque d'amputation (7). Le SCIP est fortement associé à l'importance et au risque de péjoration de la symptomatologie ischémique de l'AOMI et semble mieux prédire le risque d'amputation que l'ABI ou les FRCV traditionnels (71).

C) Deuxième partie : étude DIACART

1. Justification scientifique

La première partie de ce travail a décrit l'importance de l'AOMI dans la population diabétique, ses conséquences en termes de morbi-mortalité pour la santé de la population, sa prise en charge actuelle, ainsi que les données de la littérature sur sa physiopathologie, en soulignant le caractère encore lacunaire des connaissances et l'importance d'en améliorer la qualité. Il est en effet nécessaire d'avoir des données solides avec un haut niveau de preuve avant de pouvoir démarrer des études visant à développer ou tester de nouveaux moyens thérapeutiques ciblant les mécanismes physiopathologiques récemment mis en évidence, comme les voies de l'ostéogenèse et de la glycation.

2. Hypothèse de l'étude

Sur la base des données de la littérature sur la physiopathologie de l'AOMI, nous émettons l'hypothèse que les marqueurs du remodelage osseux et de la voie de la glycation avancée sont associés à la calcification des artères de jambe chez les patients diabétiques, de manière indépendante des FRCV traditionnels.

3. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de la partie transversale de cette étude est de montrer un lien entre marqueurs du remodelage osseux (OPG, sRANKL, fétuine-A, FGF-23), de glycation avancée (sRAGE, CML, MG-H1, pentosidine) et calcification artérielle des jambes évaluée par scanner non injecté (SCIP).

Les objectifs secondaires sont d'étudier le lien entre calcification artérielle des jambes et inflammation de bas grade (CRPus, IL-6, IGF-1), insulino-résistance (adiponectine), métabolisme phosphocalcique (calcium, phosphate, PTH, vitamine D) et neuropathie périphérique et autonome.

4. Méthodologie

202 patients sont inclus entre le 8 novembre 2011 et le 9 juillet 2012. La taille de l'échantillon est définie sur la base de l'hypothèse de corrélation entre sRANKL et progression du SCIP à 2 ans, estimée à 20% après ajustement sur les covariables, et du nombre attendu de patients perdus de vue (10%), pour obtenir une puissance de 80% avec un risque alpha de 5% (calcul par nQuery 7.0).

Les critères d'inclusion, non exclusifs, sont :

- diabète et coronaropathie (sténose >70% et/ou occlusion à la coronarographie et/ou antécédent d'IM et/ou de revascularisation par stent et/ou pontage) ;

- diabète et AOMI connue (sténose >70% et/ou occlusion à l'EDA) ;
- diabète de type 2 chez un homme de >50 ans ou chez une femme >60 ans.

Les critères d'exclusion sont :

- insuffisance rénale avec clairance de la créatinine <30ml/min selon la formule du modification of diet in renal disease (MDRD), ;
- immunosuppression ;
- traitement anti-inflammatoire par voie générale ;
- traitement contre l'ostéoporose ;
- maladie inflammatoire ou infectieuse ;
- maladie menaçant le pronostic vital à court terme ;
- angioplastie et/ou pontage infra-poplité, ces derniers altérant l'interprétation du SCIP.

Les patients sont recrutés dans les services de diabétologie du Professeur Agnès HARTEMANN (consultations ambulatoires et hospitalisations) et de cardiologie du Professeur Michel KOMADJA (consultations ambulatoires), au GHPS.

Les visites d'inclusion se déroulent au centre d'investigation clinique plurithématique Paris-Est du GHPS et comprennent les éléments décrits ci-dessous.

4.1. Explications du déroulement et recueil du consentement par le médecin

Les patients donnent leur consentement éclairé à l'utilisation anonyme de leurs données et au recueil de deux tubes de sang supplémentaires pour les analyses spécifiques au protocole (marqueurs du remodelage osseux et de la glycation). Le comité d'éthique local (comité local de protection des personnes) a donné son accord au préalable. Les autres examens effectués font partie du bilan du diabète et sont pris en charge à 100% par la sécurité sociale française, dans le cadre de l'affection longue durée que constitue le diabète.

4.2. Recueil des données biométriques

La taille est recueillie par l'anamnèse, le cas échéant mesurée. Les patients (pieds nus et habillés de façon légère, avec déduction systématique de 500g pour les vêtements) sont pesés sur une balance à impédancemétrie qui mesure le pourcentage de masse grasse. Le tour de taille est mesuré et l'IMC calculé.

4.3. Prélèvements et dosages

L'équipe infirmière du centre d'investigation clinique effectue un prélèvement sanguin pour les dosages suivants (patients à jeun) : glucose, HbA1c, créatinine (avec calcul du taux de filtration

glomérulaire selon la formule du MDRD), lipides (triglycérides, cholestérol total, HDL, LDL calculé ou mesuré en cas d'hypertriglycémie >2.2mmol/l, calcul de l'index athérogène), CRPus, IL-6, IGF-1, adiponectine, albumine, calcium, phosphate, 25-OH vitamine D totale, PTH intacte (PTHi), protéines du remodelage osseux (sRANKL, OPG, FGF-23, fétuine A), AGEs (CML, MG-H1, pentosidine), sRAGE.

Un échantillon urinaire, sans récolte de 24h, est recueilli pour doser la microalbumine, la créatinine et l'urée, avec calcul du rapport albuminurie/créatininurie (ACR), considéré anormal si >3mg/mmol.

Les protéines du remodelage osseux sont dosées dans le laboratoire du Professeur Ziad Massy (laboratoire INSERM ERI-12/EA4292, Amiens), les AGEs dans le laboratoire du Professeur Philippe Gilléry (laboratoire CNRS UMR 6237, Reims), et sRAGE et les autres paramètres biologiques dans le laboratoire de biochimie du Professeur Dominique Rousselot, sous la direction de la Doctoresse Michèle Fonfrède (GHPS).

Les méthodes suivantes sont utilisées :

- OPG totale : ELISA MicroVue, Quidel Corporation, San Diego, USA ;
- sRANKL (forme libre) : Human RANKL FlowCytomix Simplex, eBioscience, San Diego, USA ;
- Fétuine A : Fetuin-A ELISA, DIASource, Louvain-la-Neuve, Belgique ;
- FGF-23 : Human FGF-23 (C-Term) ELISA, Immunotopics, San Clemente, USA ;
- sRAGE : Quantikine Human RAGE Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA ;
- AGEs : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS, Système API4000 (ABSciex), selon des méthodes développées par le laboratoire (355).

4.4. Recueil des données cliniques par le médecin

En aveugle pour les résultats d'imagerie artérielle, je recueille les données anamnestiques et effectue l'examen clinique de l'ensemble des patients.

4.4.1. Données anamnestiques

Les données suivantes sont recueillies par l'anamnèse : sexe, date et lieu de naissance, année de découverte du diabète, type de diabète, traitement actuel (en cas d'insulinothérapie : année d'introduction), statut tabagique (le cas échéant : unité paquets-années (UPA)), HTA, rétinopathie (le cas échéant : traitement par laser), antécédent de plaie chronique du pied (définie par une durée >4 semaines) et de complications coronariennes (infarctus myocardique (IM), stent, pontage coronarien) et cérébrales (AVC/AIT (accident ischémique transitoire)).

4.4.2. Examen artériel

Les pouls pédieux et tibiaux postérieurs sont palpés. L'examen est considéré normal si tous les pouls sont palpables. Les pressions de chevilles (pédieuses et tibiales postérieures) et humérales sont mesurées avec une sonde doppler (Parks Medical Electronics), avec calcul de l'ABI pour chaque côté, en utilisant le chiffre le plus élevé pour la pression humérale et le chiffre le plus bas pour la pression de cheville, afin de privilégier la sensibilité du test (356). L'ABI est jugé normal entre 0.91 et 1.29, anormal si ≤ 0.9 , et ininterprétable si ≥ 1.3 (artères incompressibles). Un ABI normal ne pouvant exclure la présence d'une AOMI, chez les patients diabétiques en particulier (357,358), des examens artériels complémentaires sont réalisés par imagerie.

4.4.3. Examen de la neuropathie périphérique

La neuropathie périphérique est évaluée par le test au monofilament, le neuropathy disability score (NDS) et le Neuropad®.

4.4.3.1. Test au monofilament

La perception du monofilament de 10g de Semmes-Weinstein, qui évalue l'intégrité des grosses fibres myélinisées, est testée sur les quatre sites plantaires suivants, en évitant les zones d'hyperkératose : 2^{ème} phalange de l'hallux, 1^{ère} tête métatarsienne, 5^{ème} tête métatarsienne, talon. Le test est considéré anormal en présence d'au moins deux erreurs sur les trois essais sur un même site. Le monofilament est changé après un maximum de cinquante patients.

4.4.3.2. Neuropathy disability score (NDS)

Ce score est réalisé d'après sa description par Boulton (tableau 4) (359–361). La cotation se fait pour chaque côté, avec un maximum de 10 et un minimum de 0. La classification de la neuropathie selon le NDS est la suivante : 0-2 = absente, 3-5 = débutante, 6-8 = modérée, 9-10 = sévère. Un NDS ≥ 6 est utilisé pour définir la neuropathie périphérique. Ce seuil est choisi en raison de son association à une augmentation du risque de plaie du pied (362).

Tableau 4 : NDS d'après Boulton (359–361).

Test	Description	Cotation	Fibres concernées
Vibration ou pallesthésie	diapason de 128Hz sur l'apex de l'hallux	0=normal : distingue la vibration de l'absence de vibration 1=anormal	fibres myélinisées de gros calibre (voie des lemnisques médians)
Température	tubes avec eau chaude ou eau froide sur le dos du pied	0=normal : distingue le chaud du froid 1=anormal	fibres faiblement myélinisées et non myélinisées de petit calibre (faisceau spinothalamique)
Piquer-toucher	application sur le dos de l'hallux, proximale à l'ongle, d'un coton-tige pour le toucher et d'un cure-dent pour le piquer (juste de façon à déformer la peau)	0=normal : distingue le piquer du toucher 1=anormal	fibres faiblement myélinisées et non myélinisées de petit calibre
Réflexes	recherche des réflexes achilléens avec un marteau à réflexe	0=normal : réflexe présent 1=réflexe diminué : présent après manœuvre de provocation 2=réflexe absent	fibres myélinisées de gros calibre (voie afférente) et motoneurone (voie efférente)

4.4.3.3. Neuropad®

Le Neuropad®, test récemment commercialisé en Allemagne (Trigocare International GmbH, Wiehl-Drabenderhöhe, Germany, www.neuropad.com), évalue la fonction autonome sudomotrice (petites fibres cholinergiques de type C post-ganglionnaires du système nerveux sympathique). Il est associé aux atteintes neurophysiologiques (363), à la sévérité de la neuropathie périphérique (364,365), et à la neuropathie autonome cardiaque (NAC). Une méta-analyse confirme sa sensibilité élevée (85%) et sa bonne valeur prédictive négative (VPN) (86%) pour le dépistage de la neuropathie périphérique, alors que sa spécificité et sa valeur prédictive positives (VPP) sont modérées (56 et 50% respectivement) (366).

Il s'agit d'un patch facile d'emploi que l'on colle sur la face plantaire du pied entre la 1^{ère} et la 2^{ème} tête métatarsienne, en évitant au maximum les zones d'hyperkératose, les pieds ayant été à l'air pendant au moins 10 minutes. On évalue le changement de couleur du patch (de bleu à rose) ; un virement complet de couleur en <6 minutes suggère l'absence de neuropathie périphérique (367). Un seuil fixé à 10 minutes est très sensible, mais modérément spécifique (368), alors qu'un seuil à 15 ou 20 minutes est plus spécifique et a une meilleure VPN (365). La durée jusqu'au changement de couleur est corrélée à la sévérité du trouble de conduction nerveuse (363). Le test est très

reproductible (98%) et peut être utilisé et interprété par les patients eux-mêmes pour un pré-screening de la neuropathie périphérique, du fait d'un taux élevé d'accord (90%) entre patients et professionnels de soin concernant l'interprétation du test (367,369,370). Ce test semble diagnostiquer précocement la neuropathie périphérique (364,371), et son caractère visuel apporte une valeur éducative additionnelle (372,373).

Dans l'étude DIACART, le changement de couleur est évalué de façon dichotomique à 10 et 20 minutes. L'état de kératose, la température et l'humidité des pieds sont relevés en parallèle.

Le Neuropad® est en principe contre-indiqué en présence d'AOMI, en raison de l'association de cette dernière avec une sécheresse cutanée potentiellement responsable de résultats faussement positifs, et l'AOMI constitue donc le plus souvent un facteur d'exclusion dans les études précitées. La performance du Neuropad® n'a néanmoins jamais été étudiée spécifiquement chez ces patients, raison pour laquelle nous décidons de l'utiliser dans notre étude, en comparant sa performance entre les patients avec et sans AOMI.

4.4.4. Examen de la neuropathie autonome cardiovasculaire (NAC)

La neuropathie autonome cardiovasculaire est évaluée par une électrocardiogramme au repos, par le test d'hypotension orthostatique, qui évalue le système nerveux sympathique, et par les trois épreuves standardisées de variabilité du rythme cardiaque décrites par Ewing et Clarke (374), qui explorent le système nerveux parasympathique. Les tests sont effectués à distance de la prise de stimulant (théine, caféine) et de médicament susceptible d'interférer avec les résultats (vasodilatateurs, β -bloquants et autres antihypertenseurs).

4.4.4.1. Électrocardiogramme

Un tracé électrocardiographique de 15 minutes est enregistré au repos, en décubitus dorsal, avant la réalisation des tests de NAC, au moyen d'un logiciel électrocardiographique informatisé (Cardinonics, avec boîtier CardioPlug). La durée de l'intervalle QT corrigé (QTc) est calculée automatiquement par le logiciel après 5 minutes d'enregistrement.

4.4.4.2. Test d'hypotension orthostatique et mesure de la tension artérielle (TA)

La TA est mesurée après 30 minutes de repos en décubitus dorsal et 1, 3 et 5 minutes après le lever rapide, avec un appareil automatique (WelchAllyn®) et un manchon adapté au périmètre brachial, et à distance de la prise d'excitant (théine, caféine) et de médication antihypertensive (en raison des tests de NAC). Le test d'hypotension orthostatique est considéré anormal en présence d'une chute de ≥ 20 mmHg de la TAS et/ou de ≥ 10 mmHg de la TAD à 1, 3 et/ou 5 minutes après le lever.

4.4.4.3. Tests de variabilité de la fréquence cardiaque

Les tracés sont enregistrés par le logiciel et l'intervalle RR est mesuré manuellement sur ordinateur et interprété en fonction de l'âge (40). Les patients avec rythme électro-entraîné sont exclus de cette analyse. La NAC est gradée entre absente (pas d'épreuve anormale), débutante (1 épreuve anormale), confirmée (2 épreuves anormales) ou sévère (3 épreuves anormales). Les patients sont classés entre NAC présente (≥ 1 test anormal) et absente (3 tests normaux). Les patients avec résultats normaux mais pour lesquels nous ne pouvons effectuer ou interpréter l'ensemble des 3 tests ne sont pas retenus dans l'analyse et considérés comme données manquantes.

4.4.4.3.1. Épreuve de respiration profonde

Six cycles de respiration profonde sont effectués sur une minute (5 secondes pour chaque temps respiratoire). Physiologiquement, la fréquence cardiaque accélère en inspiration et ralentit en expiration. Le résultat est exprimé comme la moyenne des six rapports RR maximal (en expiration) / RR minimal (en inspiration).

4.4.4.3.2. Épreuve d'orthostatisme

Ce test est effectué en même temps que celui de l'hypotension orthostatique en demandant au patient de se lever rapidement. Le résultat est exprimé comme le rapport RR maximal (vers la 30^{ème} seconde après le lever) / RR minimal (vers la 15^{ème} seconde après le lever). Les patients de >70 ans sont exclus de l'analyse, le rapport devenant alors ininterprétable (norme <1.0).

4.4.4.3.3. Épreuve de Valsalva

Ce test est effectué en position assise avec un embout buccal relié à un manomètre de mercure, en demandant au patient de maintenir une pression de 40mmHg pendant 15 secondes. Le test est répété trois fois d'affilée, avec 45 secondes de repos entre chaque manœuvre. Le résultat est exprimé comme la moyenne des trois rapports RR maximal (après relâchement) / RR minimal (pendant la phase active). Le test n'est pas effectué chez les patients présentant une rétinopathie proliférante ou lasérisée.

4.5. Recueil des données d'imagerie

Deux types d'imagerie, un scanner infra-poplité natif et une EDA, sont réalisés au maximum dans le mois suivant ou précédant la visite d'inclusion.

4.5.1. Scanner des jambes : score calcique infra-poplité (SCIP)

Le scanner infra-poplité est réalisé dans l'unité de radiologie vasculaire du Professeur Philippe CLUZEL (service de radiologie du Professeur GRENIER, GHPS). L'examen dure 15 minutes par patient, dont moins de 15 secondes d'irradiation, correspondant à une dose d'environ 1.0mSv, sans injection de produit de contraste. Un scanner 128-MD (Somatom Definition flash, Siemens Healthcare, Forchheim, Allemagne) est utilisé pour l'acquisition de coupes en direction craniocaudale du bas de la rotule à la cheville. Un protocole d'examen standardisé est utilisé avec tube de voltage de 120kV, temps de rotation de 0.28 secondes, produit courant-temps dans le tube de 56mAs, détecteur de collimation de 128x0.6mm, section épaisseur/incrément de 1mm/1mm, kernel de reconstruction B35f et produit dose-longueur de 179.8+/-59.3mGy x cm. L'analyse est réalisée par des radiologues en aveugle pour l'EDA et l'examen clinique, avec le logiciel Heartbeat CaScore, Philips Healthcare, Eindhoven, Pays-Bas. Sur des coupes transverses, les aires de calcification d'une densité de ≥ 130 unités Hounsfield sur une surface de $>1\text{mm}^2$ sont identifiées automatiquement. Les scores de calcification, déterminés selon la méthode décrite par Agatston (353), sont obtenus séparément pour chacune des principales artères infra-poplitées (poplitée distale, tibiale antérieure, tibiale postérieure, péronière) et additionnés pour obtenir un SCIP, qui ne permet néanmoins pas de distinguer les calcifications de l'intima de celles de la média.

4.5.2. Échographie-doppler artérielle des membres inférieurs (EDA)

L'EDA est réalisée par 4 angiologues expérimentés sélectionnés, en cabinet d'angiologie ou dans le service de chirurgie vasculaire du Professeur Fabien KOSKAS (GHPS), en aveugle pour le SCIP et l'examen clinique. Lorsque les conditions d'analyse sont défavorables (trop de gaz intestinaux), l'EDA est reconduite après un régime sans résidus.

L'AOMI est décrite selon une cotation établie avec les angiologues (annexe 1) afin d'évaluer les deux composantes de l'AOMI – athérosclérose et médiacalcosse – et d'en quantifier l'importance et les répercussions hémodynamiques. Les angiologues joignent systématiquement un compte-rendu détaillé de l'examen à cette fiche de description.

Les axes suivants sont individualisés de chaque côté : étage aorto-iliaque, artère fémorale commune, artère fémorale superficielle, artère fémorale profonde, tronc tibio-péronier, artère tibiale antérieure, artère tibiale postérieure, artère péronière, artère pédieuse.

L'artère est jugée normale en l'absence d'athérome et de médiacalcosse. La répercussion hémodynamique des lésions artérielles est évaluée en termes de degré de sténose (diamètre) et classée en quatre grades de sévérité : $<50\%$, $50-70\%$, $>70\%$, occlusion.

En combinant les résultats des deux côtés, l'AOMI est définie par la présence d'au moins une sténose >70% et/ou occlusion. Un score de gravité de l'AOMI, adapté d'un score angiographique (358,375), est calculé en cotant l'étage ilio-fémoral, les artères poplitées, les troncs tibio-péroniers et les artères tibiales antérieures et postérieures, péronières et pédieuses : 0 point si pas de sténose ou sténose ≤70%, 2 points si ≥1 sténose >70%, 3 points si ≥1 occlusion (score minimum 0, maximum 42).

La médiocalcose est gradée en 4 degrés d'importance : absente, débutante (calcifications « en mottes », étagées : « + »), modérée (calcifications continues : « ++ »), importante (calcifications majeures et lumière absente : « +++ »). A partir de ces données, un score de médiocalcose infra-poplitée est calculé, correspondant au nombre de « + » dans la colonne médiocalcose des deux côtés sur les troncs tibio-péroniers et les artères poplitées, tibiales antérieures, tibiales postérieures, péronières et pédieuses (score minimum 0, maximum 36).

4.6. Statistiques

Les analyses statistiques principales concernant les associations des différentes variables avec le SCIP et l'AOMI sont réalisées par l'unité de recherche clinique Pitié-Salpêtrière Charles-Foix, au moyen du logiciel SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC), par l'interne Antoine PIERUCCI, sous la direction du Professeur Alain MALLET.

J'effectue des analyses statistiques secondaires avec les logiciels JMP10 (SAS Institute, Cary, NC) et GraphPad 2012 pour Windows.

Pour toutes les analyses, une p-value <0.05 est considérée statistiquement significative. Pour la construction des modèles multivariés, seules les variables avec une p-value <0.20 en analyse univariée sont retenues.

4.6.1. Analyse descriptive

Les variables quantitatives sont décrites par la médiane et son étendue (minimum-maximum). Les variables catégorielles sont décrites en termes d'effectifs et de pourcentages. La normalité des variables est étudiée, ainsi que la possibilité d'amélioration de la distribution par transformation logarithmique. Le cas échéant, les valeurs transformées sont utilisées pour les analyses univariées et multivariées. Les valeurs biologiques indétectables sont remplacées par 0.1 pour permettre leur inclusion dans les analyses. Afin de tenir compte de la diminution physiologique des taux d'IGF-1 avec l'âge, le score standardisé suivant est utilisé : $(\log(\text{IGF-1}) + 0.00625 \times \text{âge} - 2.555) / 0.104$ (106).

4.6.2. Analyse des facteurs associés aux lésions artérielles périphériques

4.6.2.1. Analyse univariée

La relation des variables d'intérêt avec le SCIP et l'AOMI est étudiée en analyse univariée. Le logarithme naturel du SCIP ($\ln(SC+0.1)$) est utilisé afin de normaliser sa distribution. Une régression linéaire simple est utilisée pour les variables quantitatives et un t-test de Student pour les variables qualitatives.

4.6.2.2. Analyse multivariée

Des modèles de régression linéaire multiple sont construits pour étudier la relation entre les variables d'intérêt et le SCIP, en utilisant une procédure pas à pas additive automatique, avec modélisation des variables qualitatives binaires en variables continues. Le coefficient de détermination ajusté (R^2 ajusté) est utilisé pour évaluer l'apport de chaque modèle.

Le modèle 1 concerne la voie du remodelage osseux, le modèle 2 la voie de la glycation, le modèle 3 les autres paramètres cliniques ou biologiques d'intérêt, et le modèle 4 les paramètres de l'examen artériel. Le modèle 5 est construit à partir des modèles 1, 2 et 3 en utilisant leurs scores centrés et réduits (valeurs prédites) pour mettre à l'échelle et rendre comparables leurs coefficients.

4.6.3. Analyse des facteurs associés à l'adiponectine

4.6.3.1. Analyse univariée

La relation entre adiponectine et variables d'intérêt est étudiée en analyse univariée. Une régression linéaire simple est utilisée pour les variables quantitatives et un t-test de Student pour les variables qualitatives.

4.6.3.2. Analyse multivariée

Un modèle de régression linéaire multiple est construit par procédure pas à pas additive automatique pour étudier la relation entre variables d'intérêt et adiponectine, avec modélisation des variables qualitatives binaires en variables continues.

4.6.4. Neuropad®

Des tableaux de contingence sont construits pour étudier la sensibilité, la spécificité, la VPP et la VPN du Neuropad® à 10 et 20 minutes dans l'ensemble de la population et après division en deux sous-

groupes en fonction de la présence d'AOMI. Les proportions sont comparées par des tests de chi-carré, Fisher ou McNemar, en fonction de l'analyse.

5. Résultats

5.1. Description de l'échantillon

L'échantillon est composé de 202 patients, dont 198 (98%) avec diabète de type 2 et 161 (79.7%) de sexe masculin. L'âge médian est de 65 ans (43-85) et la durée du diabète de 13 ans (0-67).

Le tableau 5 présente les caractéristiques de la population.

Données anthropométriques : IMC 28.4kg/m² (17.1-48.8), tour de taille (femmes) 103.0cm (70.0-145.0), tour de taille (hommes) 102.0cm (72.0-147.5), impédance (femmes) 40.6% (13.9-49.5), impédance (hommes) 26.5% (8.1-50.9).

Comorbidités et antécédents : HTA 165 (81.7%), tabagisme actif 27 (13.4%), tabagisme sevré 94 (46.5%), tabagisme actif ou sevré 121 (59.9%), UPA lors d'histoire de tabagisme 30 (1-150), coronaropathie 154 (76.2%), IM 83 (41.1%), pontage coronarien 38 (18.8%), stent coronaire 111 (55.0%), AVC/AIT 15 (7.4%), rétinopathie lasérisée 32 (15.8%), antécédent ulcération chronique du pied 12 (5.9%).

Traitement : insuline 98 (48.5%), antidiabétique oral (ADO) avec ou sans insuline 174 (86.1%), ADO sans insuline 105 (51.5%), antiagrégant plaquettaire 172 (85.1%), bloqueur du SRAA 162 (80.2%), statine 180 (89.1%), β -bloquant 132 (65.3%).

Examen artériel : palpation des pouls anormale 102 (50.5%), ABI \geq 1.3 31 (15.3%), ABI \leq 0.9 53 (26.2%), ABI 1.0 (0.4-1.3), SCIP 574 (0-47'305), AOMI 88 (44.0%), score d'occlusion 0 (0-26), score de médiacalcose 24 (0-36).

Neuropathie périphérique: test au monofilament anormal 32 (25.8%), NDS 2 (0-10), NDS \geq 6 32 (15.8%), pallesthésie anormale 19 (9.4%), perception anormale de la température 61 (30.2%), perception anormale du piquer-toucher 78 (38.1%), Neuropad[®] anormal à 10 minutes 160 (79.2%), Neuropad[®] anormal à 20 minutes 94 (46.5%).

Neuropathie autonome : hypotension orthostatique 27 (13.4%), NAC 91 (61.4%, n=148).

Autres mesures : QTc 415.5ms (358-574), TAS 125mmHg (92-200), TAD 71.5mmHg (55-198).

Laboratoire : microalbuminurie 22.3mg/l (1-11'249.4), albuminurie >200mg/l 25 (12.4%), ACR >3mg/mmol 72 (35.6%), clairance selon MDRD 76ml/min (33-153), glycémie 7.8mmol/l (2.0-18.7), HbA1c 7.5% (4.6-13.4), CRPus 1.2mg/l (0.1-10.7), IL-6 3.0pg/ml (0.6-310.7), IGF-1 139ng/ml (39-308), IGF-1 standardisé -0.12 (-5.48-3.15), adiponectine 3.5mg/l (0.62-23), triglycérides 1.2mmol/l (0.4-7.8), cholestérol total 3.6mmol/l (2.0-7.2), HDL 1.1mmol/l (0.3-2.4), LDL 1.8mmol (0.8-5.1), index athérogène 3.4 (1.7-17.0), index athérogène \geq 5 26 (12.9%).

Métabolisme phosphocalcique et marqueurs du remodelage osseux : calcémie corrigée 2.3mmol/l (2.0-2.7), phosphatémie 1.0mmol/l (0.6-1.5), PTHi 47.2pg/ml (12.7-152.5), 25-OH vitamine D totale 12ng/ml (3-42), OPG 6.08pmol/l (3.7-13.6), sRANKL 8.1pg/ml (0.1-528.6), OPG/sRANKL 0.75nmol/pg (0.02-122.1), FGF-23 21.3RU/ml (0.1-242.8), fétuine A 0.66g/l (0.16-2.32).

Voie de la glycation : sRAGE 823.0pg/ml (227.1-3513.7), CML 0.15µmol/g prot. (0.09-0.24), MG-H1 2.79µmol/g prot. (1.07-13.16), pentosidine 0.86nmol/g prot. (0.34-7.64).

5.2. Analyse prédictive du SCIP et de l'AOMI

5.2.1. Analyse univariée

Le tableau 5 présente les résultats de l'analyse univariée pour le SCIP et l'AOMI.

Les variables suivantes sont associées positivement au SCIP : âge, sexe masculin, diabète de type 1, UPA, coronaropathie, pontage coronarien, rétinopathie lasérisée, antécédent d'ulcération chronique, traitement par antiagrégant plaquettaire, traitement par β-bloquant, AOMI, palpation des pouls anormale, ABI ≥1.3, ABI ≤0.9, score d'occlusion, score de médiacalcose, test au monofilament anormal, NDS, NDS ≥6, perception anormale de la température, perception anormale du piquer-toucher, Neuropad® anormal à 20 minutes, microalbuminurie, ACR >3mg/mmol, adiponectine, PTHi, OPG, CML, pentosidine.

Les variables suivantes sont associées négativement au SCIP : traitement par ADO, ABI moyen, clairance selon MDRD, IGF-1, index athérogène ≥5, calcémie corrigée, MG-H1.

Les variables suivantes sont associées positivement à l'AOMI : âge, diabète de type 1, durée du diabète, coronaropathie, rétinopathie lasérisée, antécédent d'ulcération chronique, traitement par antiagrégant plaquettaire, SCIP, palpation des pouls anormale, ABI ≤0.9, score d'occlusion, score de médiacalcose, test au monofilament anormal, NDS, NDS ≥6, perception anormale de la température, perception anormale du piquer-toucher, TAS, microalbuminurie, ACR >3mg/mmol, adiponectine, PTHi, pentosidine.

Les variables suivantes sont associées négativement à l'AOMI : impédance chez l'homme, ABI moyen, CRPus, index athérogène, index athérogène ≥5, MG-H1.

Tableau 5 : caractéristiques de la population et analyse univariée.

Variable (n=202)	Distribution	p-value SCIP	p-value AOMI
Âge, années	65 (43-85)	<0.001	0.02
Sexe masculin, n (%)	161 (79.7)	<0.001	0.07
Diabète de type 1, n (%)	4 (2)	0.01	0.04
Durée du diabète, années	13 (0-67)	0.05	0.04
Antécédents et comorbidités			
HTA, n (%)	165 (81.7)	0.41	0.17

Tabagisme actif, n (%)	27 (13.4)	0.75	0.83
Tabagisme sevré, n (%)	94 (46.5)	0.18	0.56
Tabagisme actif ou sevré, n (%)	121 (59.9)	0.18	0.62
UPA	30 (1-150)	0.04	0.19
Coronaropathie, n (%)	154 (76.2)	<0.001	0.004
IM, n (%)	83 (41.1)	0.94	0.97
Pontage coronarien, n (%)	38 (18.8)	<0.001	0.08
Stent coronaire, n (%)	111 (55.0)	0.06	0.47
AVC/AIT, n (%)	15 (7.4)	0.09	0.30
Rétinopathie lasérisée, n (%)	32 (15.8)	0.002	0.01
Antécédent d'ulcération chronique, n (%)	12 (5.9)	0.04	0.01
Traitement			
Insuline, n (%)	98 (48.5)	0.18	0.07
ADO avec ou sans insuline, n (%)	174 (86.1)	0.009*	0.14*
ADO sans insuline, n (%)	105 (51.5)	0.18*	0.05*
Antiagrégant plaquettaire, n (%)	172 (85.1)	<0.001	0.002
Bloqueur du SRAA, n (%)	162 (80.2)	0.29	0.27
Statine, n (%)	180 (89.1)	0.92	0.06
β-bloquant, n (%)	132 (65.3)	0.01	0.49
Vitamine D, n (%)	6 (2.97)	0.43	0.70
Données anthropométriques			
IMC, kg/m ²	28.4 (17.1-48.8)	0.65*	0.13*
Tour de taille (femmes), cm	103.0 (70.0-147.5)	0.97	0.75*
Tour de taille (hommes), cm	102.0 (72.0-147.5)	0.82	0.15*
Impédance (femmes), %	40.6 (13.9-49.5)	0.28*	0.09*
Impédance (hommes), %	26.5 (8.1-50.9)	0.93*	0.02*
Examen artériel			
SCIP	573 (0-47'305)	-	<0.001
AOMI, n (%)	88 (44.0)	<0.001	-
Palpation des pouls anormale, n (%)	102 (50.5)	<0.001	<0.001
ABI moyen	1.0 (0.4-1.3)	0.009*	<0.001*
ABI ≥1.3, n (%)	31 (15.3)	<0.001	0.46
ABI ≤0.9, n (%)	53 (26.2)	0.03	<0.001
Score d'occlusion (0-42)	0 (0-26)	<0.001	<0.001
Score de médiacalcose (0-36)	24 (0-36)	<0.001	<0.001
Neuropathie			
Test au monofilament anormal, n (%)	32 (15.8)	0.006	0.04
NDS, 0-10	2 (0-10)	0.002	<0.001
NDS ≥6, n (%)	32 (15.8)	0.001	0.001
Pallesthésie anormale, n (%)	19 (9.4)	0.05	0.58
Perception anormale de la température, n (%)	61 (30.2)	<0.001	0.02
Perception anormale du piquer-toucher, n (%)	78 (38.1)	0.02	<0.001
Neuropad® anormal à 10 minutes, n (%)	160 (79.2)	0.06	0.37
Neuropad® anormal à 20 minutes, n (%)	94 (46.5)	0.04	0.86
Hypotension orthostatique, n (%)	27 (13.4)	0.06*	0.57
NAC, n (%) (n=148)	91 (61.4)	0.08	0.08

Autres mesures			
QTc, ms	415.5 (358-574)	0.23*	0.77*
TAS, mmHg	92 (125-200)	0.55	0.02
TAD, mmHg	71.5 (55-198)	0.80*	0.30*
Laboratoire			
Microalbuminurie, mg/l	22.3 (1-11'249.4)	0.01	0.007
Albuminurie >200mg/l, n (%)	25 (12.4)	0.40	0.68
ACR >3mg/mmol, n (%)	72 (35.6)	0.04	0.04
Clairance selon MDRD, ml/min	76 (33-153)	0.002*	0.28*
Glycémie, mmol/l	7.8 (2.0-18.7)	0.38*	0.24
HbA1c, %	7.5 (4.-13.4)	0.17*	0.43
CRPus, mg/l	1.2 (0.1-10.7)	0.17*	0.02*
Il-6, pg/ml	3.0 (0.6-310.7)	0.43	0.93
IGF-1, ng/ml	139 (39-308)	0.01*	0.71*
IGF-1 standardisé	-0.12 (-5.48-3.15)	0.29*	0.82*
Adiponectine, mg/l	3.5 (0.2-23)	<0.001	0.001
Triglycérides, mmol/l	1.2 (0.4-7.8)	0.13*	0.06*
Cholestérol total, mmol/l	3.6 (2.0-7.2)	0.07*	0.10*
HDL, mmol/l	1.1 (0.3-2.4)	0.41	0.23*
LDL, mmol/l	1.8 (0.8-5.1)	0.10*	0.05*
Index athérogène	3.4 (1.7-17.0)	0.13*	0.01*
Index athérogène ≥5, n (%)	26 (12.9)	0.02*	0.04*
Métabolisme phosphocalcique et marqueurs du remodelage osseux			
Calcémie corrigée, mmol/l	2.3 (2.0-2.7)	0.04*	0.68
Phosphatémie, mmol/l	1.0 (0.6-1.5)	0.55	0.33*
PTHi, pg/ml	47.2 (12.7-152.5)	0.005	0.01
25-OH vitamine D totale, ng/ml	12 (3-42)	0.20*	0.29*
OPG, pmol/l	6.08 (3.7-13.6),	0.02	0.19
sRANKL, pg/ml	8.1 (0.1-528.6)	0.64	0.15*
OPG/sRANKL, nmol/pg	0.75 (0.02-122.1),	0.35	0.09
FGF-23, RU/ml	21.3 (0.1-242.8)	0.32	0.29
Féтуine A, g/l	0.66 (0.16-2.32)	0.05*	0.14*
Voie de la glycation			
sRAGE, pg/ml	823.0 (227.1-3513.7)	0.41	0.13
CML μmol/g prot	0.15 (0.09-0.24)	0.04	0.53
MG-H1, μmol/g prot	2.79 (1.07-13.16)	0.02*	0.001*
Pentosidine, nmol/g prot.	0.86 (0.34-7.64)	<0.001	<0.001

* association négative. Les p-values sont les résultats de l'analyse univariée ; en gras : p-values <0.05.

5.2.2. Analyse multivariée

Le tableau 6 présente les résultats des différents modèles multivariés.

5.2.2.1. Modèle 1 : voie du remodelage osseux

Les variables candidates pour ce modèle sont : calcémie corrigée, phosphatémie, PTHi, 25-OH vitamine D totale, FGF-23, fétuine A, OPG, sRANKL, OPG/sRANKL.

Les paramètres retenus dans le modèle final sont : PTHi, fétuine A (log), OPG (log) et calcémie corrigée, avec une association positive pour la PTHi et l'OPG, et une association négative pour la fétuine A et la calcémie corrigée. Ces quatre paramètres prédisent 7.7% de la variance du SCIP.

5.2.2.2. Modèles 2 et 2 bis : voie de la glycation

Les variables candidates pour ce modèle sont : sRAGE, CML, MG-H1, pentosidine.

Seule la pentosidine (log) est retenue dans le modèle final ; elle prédit 8.4% de la variance du SCIP ($p < 0.001$). Après ajustement sur l'âge, le sexe et la durée du diabète (modèle 2 bis), la pentosidine reste significativement associée au SCIP ($p = 0.02$). Ce dernier modèle prédit 21.5% de la variance du SCIP.

5.2.2.3. Modèle 3 : autres paramètres cliniques ou biologiques

Les variables candidates pour ce modèle sont : âge, sexe, durée du diabète, HTA, tabagisme actif ou passé, UPA, IMC, tour de taille, impédance, NDS ≥ 6 , NAC, hypotension orthostatique, QTc, TAS, TAD, clairance selon MDRD, microalbuminurie, ACR, CRPus, IL-6, IGF-1 standardisé, adiponectine, glycémie, HbA1c, paramètres lipidiques, traitement par antiagrégant, traitement par bloqueur du SRAA, traitement par statine, traitement par β -bloquant, traitement par vitamine D.

Les paramètres retenus dans le modèle final sont : âge, sexe masculin, NDS ≥ 6 , adiponectine, traitement par β -bloquant. L'association est positive pour tous les paramètres. Ce modèle prédit 32.5% de la variance du SCIP.

5.2.2.4. Modèle 4 : examen artériel

Ce modèle est construit pour valider le lien entre les examens habituels de l'AOMI et le SCIP. Les variables candidates sont : palpation des pouls anormale, ABI ≥ 1.3 , ABI ≤ 0.9 , AOMI, score d'occlusion, score de médiacalcosé. Les paramètres retenus sont : palpation des pouls anormale, ABI ≥ 1.3 , AOMI, score de médiacalcosé. Ce modèle prédit 30.1% du SCIP.

5.2.2.5. Modèle 5 : analyse globale des modèles 1, 2 et 3

Ce modèle, construit à partir des modèles 1, 2 et 3, évalue si l'information apportée par les modèles 1 et 2 est redondante par rapport au modèle 3, ce dernier incluant des facteurs de risque connus d'artériopathie, ou si elle apporte une valeur supplémentaire pour expliquer la calcification artérielle

infra-poplitée. Il permet également de comparer l'importance relative des modèles 1, 2 et 3, et prédit 36.7% de la variance du SCIP. Le modèle 3 apporte le plus d'informations, suivi du modèle 1 et finalement du modèle 2.

Tableau 6 : modèles multivariés pour la prédiction du SCIP.

Modèle 1 : voie du remodelage osseux		R² ajusté 0.077	
		Estimation	p-value
PTHi		0.02	0.01
Féтуine A (log)		-1.06	0.03
OPG (log)		2.13	0.03
Calcémie corrigée		-4.52	0.04
Modèle 2 : voie de la glycation		R² ajusté 0.084	
		Estimation	p-value
Pentosidine (log)		2.43	<0.001
Modèle 2 bis : voie de la glycation avec ajustement		R² ajusté 0.215	
		Estimation	p-value
Pentosidine (log)		1.63	0.02
Âge		0.10	<0.001
Durée du diabète		0.02	0.20
Sexe masculin		1.17	<0.001
Modèle 3 : autres paramètres cliniques ou biologiques		R² ajusté 0.325	
		Estimation	p-value
Âge		0.11	<0.001
Sexe masculin		1.22	<0.001
NDS ≥6		0.95	<0.001
Adiponectine		0.25	<0.001
Traitement par β-bloquant		0.75	<0.001
Modèle 4 : examen artériel		R² ajusté 0.301	
		Estimation	p-value
ABI ≥1.3		0.84	0.001
Palpation des pouls anormale		0.66	0.001
Score de médiacalcoсе		0.05	0.02
AOMI		0.87	<0.001
Modèle 5 : analyse globale des modèles 1, 2 et 3		R² ajusté 0.367	
		Estimation	p-value
Modèle 1 : voie du remodelage osseux		0.53	0.01
Modèle 2 : voie de la glycation		0.30	0.14
Modèle 3 : autres paramètres cliniques et biologiques		0.88	<0.001

5.3. Adiponectine

5.3.1. Analyse univariée

Le tableau 7 présente les résultats de l'analyse univariée pour l'adiponectine.

Les variables suivantes sont associées positivement à l'adiponectine : âge, sexe féminin, durée du diabète, tabagisme actif, tabagisme actif ou sevré, AOMI, ABI ≥ 1.3 , SCIP, HDL, sRAGE, CML, pentosidine, phosphatémie, PTHi, sRANKL.

Les variables suivantes sont associées négativement à l'adiponectine : traitement par ADO, clairance selon MDRD, triglycérides, index athérogène, index athérogène ≥ 5 , fétuine A.

Tableau 7 : analyse univariée des facteurs associés à l'adiponectine.

Variable	Sens du lien	p-value univariée
Âge	+	<0.001
Sexe féminin	+	0.02
Durée du diabète	+	<0.001
IMC	-	0.09
Tour de taille	-	0.07
Impédance	-	0.22
Traitement par insuline	+	0.90
Traitement par ADO	-	0.002
Traitement par ADO sans insuline	-	0.87
Traitement par antiagrégant plaquettaire	+	0.15
Traitement par bloqueur du SRAA	-	0.24
Traitement par statine	-	0.75
Traitement par β -bloquant	-	0.72
Traitement par vitamine D	-	0.69
TAS	+	0.23
TAD	-	0.32
ABI	+	0.43
AOMI	+	0.001
ABI ≥ 1.3	+	0.04
ABI ≤ 0.9	+	0.43
SCIP	+	<0.001
Tabagisme actif	+	0.03
Tabagisme actif ou sevré	-	0.04
UPA	-	0.89
Microalbuminurie	+	0.37
Albuminurie >200mg/ml	+	0.50
ACR >3mg/mmol	+	0.70
Clairance selon MDRD	-	0.005
Triglycérides	-	<0.001
Cholestérol total	+	0.71

HDL	+	<0.001
LDL	-	0.88
Index athérogène	-	<0.001
Index athérogène ≥5	-	0.003
IGF-1 standardisé	+	0.48
HbA1c	-	0.87
sRAGE	+	0.03
CML	+	0.01
MG-H1	-	0.41
Pentosidine	+	<0.001
Calcémie corrigée	-	0.63
Phosphatémie	+	0.03
PTHi	+	0.01
25-OH vitamine D totale	-	0.39
OPG	+	0.18
sRANKL	+	0.009
FGF-23	+	0.09
Féтуine A	-	0.04

5.3.2. Analyse multivariée

Le tableau 8 présente le modèle multivarié pour l'adiponectine. Les paramètres retenus dans le modèle final, ajusté sur la durée du diabète, le tour de taille et la clairance selon MDRD, sont : âge, sexe féminin, tabagisme actif, sRAGE (log), pentosidine (log), triglycérides (log), HDL (log), sRANKL et SCIP. Dans ce modèle, qui prédit 33.8% de la variance de l'adiponectine, seuls l'âge, la pentosidine, le HDL, le sRANKL et le SCIP restent significatifs, alors que les relations avec les triglycérides et le sRAGE atteignent la limite de la significativité (p=0.08 et 0.09 respectivement).

Tableau 8 : analyse multivariée des facteurs prédictifs de l'adiponectine. R² ajusté 0.338.

Variables	Estimation	p-value
Âge	0.06	0.004
Sexe féminin	0.35	0.12
Tabagisme actif	-0.33	0.17
sRAGE (log)	0.72	0.09
Pentosidine (log)	1.31	0.04
Triglycérides (log)	-1.86	0.08
HDL (log)	6.99	0.001
sRANKL	0.009	0.03
SCIP	0.17	0.004
Durée du diabète	0.01	0.48
Tour de taille	-0.003	0.81
Clairance selon MDRD	0.00007	0.99

5.4. Neuropad®

Le tableau 9 présente les performances du Neuropad® à 10 et 20 minutes dans l'ensemble de la population et chez les patients avec ou sans AOMI. Hormis la VPP, les résultats ne sont pas significativement différents entre les patients avec ou sans AOMI. A 10 minutes, le test a une bonne sensibilité et une bonne VPN, alors que la spécificité et la VPP sont faibles. A 20 minutes, la sensibilité est plus faible, au profit d'une augmentation significative de la spécificité ($p < 0.0001$).

Tableau 9 : performances du Neuropad® à 10 et 20 minutes dans l'ensemble de la population et chez les patients avec ou sans AOMI.

	Tous	AOMI	Pas d'AOMI	p-value*
Neuropad® à 10 minutes				
Sensibilité	93.8	91.3	100.0	1.00
Spécificité	23.2	20.0	25.2	0.46
VPP	18.9	28.8	10.5	0.003
VPN	95.1	86.7	100.0	0.13
Neuropad® à 20 minutes				
Sensibilité	68.8	73.9	55.6	0.41
Spécificité	57.7	61.5	55.3	0.52
VPP	23.7	40.5	9.8	0.001
VPN	90.7	87.0	93.4	0.32

*p-value pour la différence entre les sous-groupes avec et sans AOMI.

6. Discussion

L'objectif principal de la partie transversale de l'étude DIACART est d'évaluer l'association de la calcification vasculaire infra-poplitée, mesurée de façon originale par le SCIP, à de multiples paramètres. L'évaluation distincte des différentes voies d'intérêt a pour but d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de la calcification vasculaire infra-poplitée en mettant en évidence le rôle propre des différentes variables étudiées.

6.1. Marqueurs du remodelage osseux

6.1.1. Voie OPG/RANKL/RANK

Alors qu'il existe passablement d'études cliniques sur le lien entre OPG et calcification coronaire, les données sur l'AOMI sont rares. Dans notre étude, l'OPG est associée de façon indépendante au SCIP, suggérant que les observations faites au niveau coronaire puissent s'étendre aux artères périphériques. Comme discuté dans la première partie de ce travail, il s'agit probablement d'une augmentation réactive, bien qu'insuffisante, contre le processus lésionnel vasculaire. Par ailleurs, la

possible résistance à l'action de l'OPG en présence de lésions artérielles, probablement due à une augmentation locale de RANKL dans les artères, peut expliquer que des taux supranormaux d'OPG ne suffisent pas à endiguer la pathologie.

De façon intéressante, l'association n'est pas significative avec l'AOMI, suggérant un rôle prédominant de l'OPG dans le processus calcifiant spécifiquement, plus que dans la formation de l'athérome.

Ainsi, l'OPG pourrait représenter un nouveau marqueur de RCV, non seulement pour les atteintes coronaires, mais également pour les lésions périphériques. Si ces données sont confirmées de manière prospective, il sera possible d'initier des essais thérapeutiques ciblant ce mécanisme, notamment par substitution en OPG recombinante, à des doses probablement supra-physiologiques afin de contrer la résistance susmentionnée.

Bien que dans notre étude sRANKL ne soit pas associé à la calcification périphérique, nous constatons néanmoins que l'exclusion des 8 patients présentant des valeurs aberrantes de SCIP (identifiées par le calcul statistique de la distance de Mahalanobis) fait apparaître une association positive entre sRANKL et SCIP ($p=0.02$). Cette association reste significative après ajustement sur l'âge, la durée du diabète, le sexe, la clairance rénale, l'adiponectine, l'OPG et les paramètres du métabolisme phosphocalcique, suggérant que le RANKL puisse jouer un rôle différent en fonction du degré de calcification artérielle. On peut ainsi supposer que, chez les patients avec SCIP très élevés, le processus calcifiant est achevé et que le RANKL n'est plus impliqué à ce stade. Nos données prospectives aideront à supporter ou infirmer cette hypothèse.

D'autres explications peuvent contribuer à l'absence d'association entre sRANKL et SCIP dans notre étude : manque de puissance, données transversales, dosage sérique ne reflétant peut-être pas l'activité locale de RANKL dans les artères, la forme membranaire étant plus active que la forme soluble (87).

6.1.2. Fétuine A (α_2 -Heremans-Schmid glycoprotéine)

Les données sur fétuine A et atteintes macrovasculaires sont encore discordantes, probablement en raison du rôle à la fois néfaste (insulino-résistance) et protecteur (anticalcifiant) de cette protéine dans la physiopathologie vasculaire. Nous associons fétuine A et SCIP de façon négative et indépendante. Cela suggère que, dans une population à haut RCV, l'effet anticalcifiant de la fétuine A prédomine sur l'effet insulino-résistant et contribue à protéger les patients avec SCIP faible contre la progression de la calcification. Ceci expliquerait, du moins en partie, le fait que les patients avec les artères les plus calcifiées sont ceux dont les atteintes progressent de la façon la plus importante et la plus rapide, aussi bien au niveau coronaire qu'au niveau périphérique (98,99). Nos données prospectives contribueront à étayer cette hypothèse. De façon intéressante, comme pour l'OPG,

l'association n'est pas significative avec l'AOMI, suggérant un rôle prédominant de la fétuine A contre le processus calcifiant, plus que dans le développement de l'athérome.

6.1.3. FGF-23

Comme d'autres auteurs, nous ne trouvons pas d'association entre FGF-23 et calcification périphérique dans notre population exempte d'IRC sévère, suggérant que le rôle du FGF-23 dans la physiopathologie vasculaire prédomine lors d'IRC, notamment par sa régulation de la phosphatémie. Un manque de puissance et la limite des données transversales peuvent néanmoins contribuer à l'absence d'association observée ; il sera ainsi intéressant d'étudier cette relation de façon prospective.

6.1.4. Métabolisme phosphocalcique

Les études concernant le lien entre calcémie et maladie cardiovasculaire en l'absence d'IRC, discutées en première partie de ce travail, trouvent une association positive ou nulle. Nous observons au contraire une relation négative significative entre calcémie et calcification vasculaire, alors que la calcémie n'est pas associée à l'AOMI. Cette observation suggère une hypothèse intéressante : les patients avec SCIP élevé présenteraient une vulnérabilité particulière à la calcification vasculaire, probablement d'origine multifactorielle ; leurs artères présenteraient une avidité élevée pour le calcium, qui serait alors trappé dans les lésions. Ce mécanisme pourrait être primaire et donc à l'origine des lésions, ou secondaire et alors déclencher un véritable cercle vicieux : plus les lésions s'aggravent, plus le calcium y est capté ; la calcémie baisse consécutivement et déclenche un hyperparathyroïdisme secondaire avec aggravation des calcifications par les effets propres de la PTH. L'association positive entre PTHi et SCIP corrobore cette théorie.

L'absence de données précédentes similaires et les limites des données transversales ne nous permettent néanmoins pas de conclure. Il est par ailleurs intéressant de noter que 97% de nos patients présentent une calcémie dans les limites de la norme ; il semble donc exister un lien entre calcémie et calcification vasculaire même en l'absence de valeurs sériques anormales, comme pour la PTH (213).

Nous associons positivement PTHi et calcification vasculaire, en cohérence avec les données physiopathologiques et cliniques discutées en première partie de ce travail. Alors que 37% de nos patients présentent un déficit et 67% une insuffisance en vitamine D, nous observons des valeurs supranormales de PTHi chez seulement 25% de nos patients. La PTHi est néanmoins inversement corrélée à la vitamine D ($r=-0.37$, $p<0.0001$), mais pas à la calcémie ($r=0.07$, $p=0.34$). L'augmentation de la PTHi semble donc ici plutôt liée à la vitamine D qu'à la calcémie, bien que nous ne puissions exclure que son augmentation ait eu comme première cible la calcémie et ait précisément permis le

maintien de valeurs normales de cette dernière. Il semble donc particulièrement important de substituer la carence en vitamine D chez ces patients, pour ses effets propres et pour abaisser la PTH. Un traitement direct par parathyroïdectomie ou calcimimétique n'a pas fait ses preuves en l'absence de taux anormaux de PTH et il faut pour l'instant le réserver aux cas d'hyperparathyroïdisme réfractaire, après substitution correcte en vitamine D et recherche et traitement d'autres causes d'élévation de la PTH.

En dépit du rôle suggéré du phosphate dans la physiopathologie vasculaire, nous ne l'associons pas de façon significative au SCIP ou à l'AOMI dans notre population exempte d'IRC.

6.2. Glycémie et glycation

Le DCCT et l'UKPDS démontrent l'association entre hyperglycémie et complications macrovasculaires, en utilisant l'HbA1c comme marqueur de l'exposition glycémique. Nous n'observons en revanche pas de relation entre glycémie à jeun, HbA1c, SCIP et AOMI, probablement en raison du caractère ponctuel de l'information fournie par la glycémie à jeun et l'HbA1c, un marqueur de glycation intermédiaire reflétant l'exposition glycémique uniquement des 2 à 3 mois précédant le dosage. La glycémie à jeun et l'HbA1c sont donc probablement plus utiles et interprétables de façon prospective.

Contrairement à l'HbA1c, les AGEs, dont la formation est irréversible et concerne des protéines à longue durée de vie, reflètent une exposition plus durable à l'hyperglycémie. Chez nos patients, la CML est associée positivement au SCIP, et la pentosidine au SCIP et à l'AOMI. La pentosidine à elle seule explique 8.4% de la variance du SCIP, ce qui est relativement important pour un seul marqueur. Il est intéressant de noter que cette association demeure significative après ajustement sur l'âge et la durée du diabète, paramètres que l'on sait associés à la glycation.

De façon étonnante, le MG-H1 est associé négativement au SCIP et à l'AOMI en analyse univariée. Nous n'avons pas connaissance de données similaires, mais cet AGE a été peu étudié de façon isolée. Une explication possible est l'origine différente des 3 AGEs étudiés : en effet, alors que la CML et la pentosidine sont produites par réduction simple de sucres, en passant par la formation de base de Schiff et de produit d'Amadori, il semble que le MG-H1 soit formé par liaison directe de composés carbonyle réactifs (355). Ainsi, le lien avec les complications du diabète pourrait être différent pour ces 3 AGEs, mais cela demande confirmation. Une explication alternative est le fait que le dosage sérique ne reflète pas directement les taux tissulaires d'AGEs (244) ; un dosage sérique global des AGEs semble par ailleurs mieux corrélé aux complications du diabète que la mesure de CML ou de pentosidine isolément (255).

Alors que les données de la littérature sont encore discordantes sur le lien entre sRAGE et artériopathie, nous ne trouvons pas d'association entre sRAGE et SCIP ou AOMI ; un éventuel manque de puissance et les limites des données transversales ne permettent pas de conclure.

En résumé, le lien très significatif et important entre SCIP et pentosidine suggère que la calcification vasculaire est fortement liée à l'imprégnation glycémique de longue durée. Ceci s'avère important cliniquement en raison des perspectives thérapeutiques, puisque des thérapies ciblant les AGEs ont déjà montré des résultats chez l'animal et pourraient avoir un impact préventif et thérapeutique important dans la pathologie vasculaire diabétique (232).

6.3. Adiponectine

Nous associons l'adiponectine positivement et de façon très significative au SCIP et à l'AOMI, de façon indépendante de l'âge et du sexe notamment. Puisque notre population est à haut RCV, ces résultats sont en accord avec le paradigme discuté en première partie de ce travail, suggérant qu'à ce stade l'adiponectine reflète un profil de risque défavorable ou une augmentation réactive insuffisante contre le processus inflammatoire athérosclérotique. Nous ne retrouvons cependant pas de lien avec les marqueurs inflammatoires systémiques, en cohérence avec les données de la littérature discutées plus haut.

Nous confirmons néanmoins l'association de l'adiponectine avec le sexe féminin et avec des marqueurs de RCV favorables (HDL élevé, triglycérides et rapport athérogène bas, pas d'antécédents tabagiques), alors que l'association inverse connue entre obésité viscérale et adiponectine atteint la limite de la significativité. Nous ne relierons cependant pas l'adiponectine à la TA, à l'HbA1c, à la microalbuminurie ou au traitement par insuline. Par ailleurs, l'association avec la fonction rénale disparaît après ajustement sur l'âge.

A noter, dans l'ensemble de notre population, les valeurs d'adiponectine sont globalement basses par rapport à la norme (2,5-6,1mg/l). Par ailleurs, l'absence de population contrôle non diabétique limite nos conclusions. On peut supposer que la relation soit similaire dans une telle population, mais avec des taux d'adiponectine globalement plus élevés.

L'association positive que nous observons entre adiponectine et AGEs (CML et pentosidine) est cohérente avec les données de Gaens (340) discutées en première partie de ce travail, et pourrait donc être expliquée, du moins en partie, par un piégeage des AGEs moins important dans le tissu adipeux des patients avec adiponectine élevée ; cette hypothèse est soutenue par l'association inverse entre adiponectine et obésité (tour de taille, IMC), bien qu'à la limite de la significativité dans notre étude.

Les relations entre AGEs, sRAGE et adiponectine sont par ailleurs indépendantes de l'âge, mais la relation avec la CML et le sRAGE disparaît en faveur de la pentosidine en analyse multivariée et après

ajustement sur la durée du diabète, suggérant, comme pour le lien avec le SCIP, une association nettement plus significative pour la pentosidine que pour les autres marqueurs ; cela demande néanmoins confirmation.

Alors que des études suggèrent que les bloqueurs du SRAA et les statines augmentent les taux d'adiponectine (376–379), nous ne mettons en évidence aucune relation significative chez nos patients ; il faut néanmoins noter la proportion importante de patients recevant ces médicaments dans notre étude, peut-être à l'origine d'un manque de puissance.

Finalement, nous associons l'adiponectine aux marqueurs osseux (phosphate, PTHi, sRANKL et fétuine A). La relation avec le sRANKL, qui reste significative en analyse multivariée, peut être liée à la pathologie vasculaire, mais également au métabolisme osseux, puisque l'adiponectine agit sur les cellules osseuses par la voie OPG/RANKL/RANK. La relation négative entre adiponectine et fétuine A est en accord à la fois avec les effets bénéfiques anticalcifians de la fétuine A et avec le fait que ces deux marqueurs – fétuine A élevée et adiponectine basse – sont associés à l'insulino-résistance. Ces relations pourraient contribuer à expliquer l'association positive entre adiponectine et complications vasculaires, par activation de facteurs procalcifiants (sRANKL) et diminution de facteurs anticalcifians (fétuine A), et méritent donc qu'on s'y intéresse de plus près.

En résumé, nous associons l'adiponectine de façon positive aux complications vasculaires périphériques, à un profil de RCV favorable, à l'âge et à certains marqueurs de glycation et du remodelage osseux. Le rôle propre de chacune de ces associations reste hypothétique et il est nécessaire de clarifier si la relation observée entre adiponectine et complications vasculaires n'est qu'un épiphénomène, ou si cette hormone a un réel rôle – protecteur ou néfaste – dans la pathogenèse vasculaire chez des patients à haut RCV en particulier. Des données prospectives, qui seront notamment apportées par notre étude, sont nécessaires pour mettre en évidence un éventuel lien de cause à effet et pour évaluer l'intérêt du dosage de l'adiponectine comme marqueur prédictif des complications vasculaires périphériques.

6.4. Inflammation et IGF-1

Nous n'observons pas de relation significative entre SCIP et CRPus, IL-6 ou IGF-1 standardisé, en cohérence avec des données transversales au niveau coronarien (99). Seul l'IGF-1 non standardisé est associé au SCIP, mais cette relation disparaît après ajustement sur l'âge, ajustement indispensable en raison de la diminution physiologique d'IGF-1 avec l'âge (106), corrélation retrouvée chez nos patients également ($r=-0,23$, $p<0.001$).

Etonnamment, l'AOMI est associée négativement à la CRPus, suggérant une hypothèse : dans notre population à haut RCV, les patients avec AOMI auraient atteint un stade lésionnel sévère, où le rôle de l'inflammation de bas grade serait moindre, alors que le processus inflammatoire serait encore

actif chez les patients ne présentant pas encore de sténose significative. Des données prospectives sont nécessaires pour étayer cette hypothèse. Cela suggère aussi que l'inflammation de bas grade puisse jouer un rôle moins important dans la pathogenèse de la calcification vasculaire que de l'athérome. Par ailleurs, les statines et les bloqueurs du SRAA semblent diminuer la CRPus (378,380–382); bien que nous n'observions pas cette association, il est néanmoins possible que la médication biaise les valeurs de CRPus dans notre population.

Il est également probable que les dosages sériques ne traduisent pas adéquatement l'activité vasculaire locale et que le dosage d'IGF-1 ne reflète pas son activité biologique réelle (102).

Finalement, il faut noter que 77% de nos patients présentent des valeurs normales de CRPus (<3mg/l), 92% d'IL-6 (<6.45pg/ml) et 75% d'IGF-1 (55-186ng/ml), tandis que 2% et 33% ont des valeurs d'IGF-1 infranormales et supranormales respectivement. Ainsi, l'état d'inflammation de bas grade ne semble pas prédominant dans notre population. L'évaluation transversale et l'absence de population contrôle saine limitent nos conclusions.

6.5. Autres facteurs de risque cardiovasculaires (FRCV)

6.5.1. Âge et sexe

Nous confirmons l'association connue entre lésions artérielles périphériques, âge et sexe masculin.

6.5.2. Type, durée et traitement du diabète

Nous confirmons l'association entre durée du diabète et lésions artérielles périphériques.

Alors que les rares patients avec diabète de type 1 présentent un SCIP plus élevé que ceux avec diabète de type 2, ces résultats semblent biaisés par la durée du diabète dont la médiane (minimum-maximum) se situe à 45 ans (40-67) pour le diabète de type 1 et à 13 ans (0-40) pour le diabète de type 2. L'association entre type de diabète et SCIP disparaît en effet après ajustement sur la durée du diabète. Des résultats analogues sont observés pour l'AOMI.

L'association entre traitement par ADO et SCIP disparaît après ajustement sur la durée du diabète. Les modalités de traitement antidiabétique sont en effet fortement corrélées à la durée du diabète : les patients avec une histoire de diabète plus longue ont plus souvent de l'insuline ($p < 0.001$), ceux avec une histoire plus courte plus souvent des ADO ($p < 0.001$). Ces observations sont cohérentes avec le fait que l'insulino-résistance augmente avec la progression de la pathologie diabétique.

6.5.3. Tabagisme

L'UKPDS, qui montre un risque relatif d'AOMI de 2.90 chez les fumeurs, évalue l'AOMI uniquement par l'ABI, la palpation des pouls et la symptomatologie clinique de claudication intermittente (14).

Dans notre étude, nous associons le tabagisme non seulement à un ABI ≤ 0.9 ($p=0.01$ pour le tabagisme actif et $p=0.005$ pour les UPA) et à une palpation des pouls anormale ($p=0.02$ pour le tabagisme actif et $p<0.01$ pour les UPA), mais aussi au SCIP, alors que la relation avec l'AOMI n'est pas significative. Cela suggère qu'en présence de diabète, le tabagisme joue un rôle prédominant dans le développement des calcifications vasculaires, mais cela demande confirmation par une évaluation prospective.

6.5.4. HTA et dyslipidémie

Nous ne mettons pas en évidence d'association entre SCIP et TA ou dyslipidémie, à l'exception d'une relation inverse avec l'index athérogène. L'AOMI est en revanche associée non seulement à l'index athérogène (négativement), mais aussi à la TAS (positivement).

Ces résultats doivent néanmoins être interprétés avec prudence en raison du taux élevé de patients sous médication antihypertensive et/ou hypolipémiante. Par ailleurs, la prescription de statine, de β -bloquant et/ou de bloqueur du SRAA en indication de prévention secondaire mais en l'absence d'HTA ou d'anomalie notable du bilan lipidique, est fréquente dans notre population. Cette approche, efficace sur les lésions coronariennes en particulier, explique très probablement nos résultats non concluants. De plus, après ajustement sur la coronaropathie, l'association entre SCIP et traitement par antiagrégant ou par β -bloquant disparaît, bien que le traitement par β -bloquant soit retenu dans le modèle multivarié. Finalement, il ne faut pas oublier que des valeurs lipidiques normales, notamment pour le LDL, n'excluent pas la présence d'une dyslipidémie qualitative, bien décrite chez les patients diabétiques (particules LDL petites et denses, particulièrement athérogènes).

6.5.5. Données biométriques

L'IMC, le tour de taille et l'impédance ne sont pas associés au SCIP de façon significative. L'impédance chez l'homme, qui est par ailleurs corrélée positivement à l'IMC et au tour de taille de façon très significative ($p<0.0001$ pour les deux), est néanmoins associée négativement à l'AOMI.

L'IMC a été associé inversement à l'AOMI chez les patients avec antécédent de tabagisme, mais positivement chez ceux sans cet antécédent, suggérant que le tabagisme, facteur de risque majeur d'AOMI, puisse biaiser la relation entre AOMI et adiposité – les fumeurs étant souvent moins adipeux que les non fumeurs (383). La relation que nous observons entre AOMI et impédance persiste cependant après ajustement sur le tabagisme ; de plus, elle est également présente dans l'analyse du sous-groupe de patients n'ayant jamais fumé ($p<0.02$). Ainsi, le tabagisme ne semble pas tout expliquer. Il est possible que les mécanismes de piégeage des AGEs récemment mis en évidence par Gaens (340) et discutés en première partie, contribuent à expliquer cette relation inverse.

Ylitalo, au contraire, associe positivement obésité et AOMI, sans ajuster sur le tabagisme (384). Nos populations ne sont cependant probablement pas comparables, la prévalence de l'AOMI n'étant que de 11% dans son étude, alors qu'elle est de 44% dans la nôtre ; par ailleurs, seuls 15.5% de ses patients sont diabétiques.

6.6. Traitement

Nous observons une relation positive entre SCIP et traitement par antiagrégant plaquettaire ou β -bloquant, alors que l'association n'est pas significative pour le traitement par bloqueur du SRAA ou statine. L'AOMI est quant à elle associée positivement au traitement par antiagrégant plaquettaire, alors que la relation avec le traitement par statine atteint la limite de la significativité. Bien que ces médicaments aient fait leurs preuves en prévention cardiovasculaire primaire et secondaire, en particulier au niveau coronarien, deux études prospectives montrent néanmoins une association positive entre progression du SCC et traitement par statine, β -bloquant ou bloqueur du SRAA (99,385). Nos résultats, dont l'interprétation est néanmoins limitée par le caractère transversal de l'étude, vont dans le même sens, suggérant l'échec de cette médication à protéger contre les lésions artérielles périphériques. L'interprétation doit néanmoins rester prudente en raison du nombre important de patients traités et du fait que l'on prescrit plus fréquemment un traitement antiagrégant en présence d'AOMI connue, ce qui peut biaiser les résultats. Nos données prospectives aideront à clarifier ces questions. Finalement, nous devons noter que la durée depuis l'initiation du traitement et la compliance médicamenteuse ne sont pas analysées et peuvent donc également constituer un biais.

6.7. Autres complications vasculaires

La coronaropathie est associée de façon significative au SCIP et à l'AOMI, en cohérence avec le caractère systémique bien connu de l'atteinte artérielle. Nous confirmons également l'association entre atteinte macrovasculaire périphérique et complications microvasculaires (rétinopathie, néphropathie, neuropathie).

6.7.1. Neuropathie

6.7.1.1. Neuropathie périphérique

La neuropathie périphérique est associée au SCIP et à l'AOMI, en accord avec les données sur son lien avec la calcification vasculaire (29) et la rigidité artérielle (386). Le Neuropad® évaluant la fonction des fibres cholinergiques sympathiques, sa relation avec le SCIP est cohérente avec

l'observation historique qui révèle le développement d'importantes calcifications vasculaires périphériques suite à une sympathectomie lombaire (387).

Chez nos patients, les examens des petites fibres nerveuses sont plus souvent anormaux (30.2% pour la perception de la température et 38.1% pour le piquer-toucher) que ceux des grosses fibres nerveuses (9.4% pour la pallesthésie et 15.8% pour le test au monofilament), en cohérence avec une atteinte initiale des petites fibres chez les patients diabétiques (388). Ces différents tests semblent néanmoins associés au SCIP et à l'AOMI de façon similaire, à l'exception de la pallesthésie qui atteint seulement la limite de la significativité pour le SCIP. A noter que la pallesthésie n'a été évaluée que de façon qualitative, expliquant probablement le faible pourcentage de patients présentant un test anormal.

Par ailleurs, tous les patients avec antécédent d'ulcération chronique présentent une AOMI et/ou une neuropathie périphérique, confirmant que ces deux pathologies constituent les principaux facteurs de risque d'ulcération du pied (389), et qu'il est donc essentiel de les dépister et d'en améliorer les connaissances physiopathologiques.

6.7.1.1.1. Neuropad® et AOMI

Les performances du Neuropad®, aussi bien à 10 minutes qu'à 20 minutes, ne diffèrent pas statistiquement entre les patients avec et sans AOMI dans notre étude, à l'exception de la VPP qui est plus élevée chez les patients avec AOMI, très probablement en raison de la prévalence plus élevée de la neuropathie périphérique dans ce sous-groupe de patients. Ainsi, nos résultats suggèrent que le Neuropad® peut également être utilisé en présence d'AOMI, ce qui est cliniquement important puisqu'il est particulièrement nécessaire de dépister la neuropathie périphérique chez les patients avec AOMI, en raison du risque podologique accru par la présence simultanée de ces 2 complications du diabète.

Nous avons publié un article à ce sujet dans Diabetic Medicine (390).

6.7.1.2. NAC

L'association de la NAC au SCIP et à l'AOMI en analyse univariée atteint la limite de la significativité, en accord avec des observations préalables qui font de la NAC un marqueur prédictif de mortalité et de RCV (391).

De façon plus étonnante, nous observons une relation négative entre hypotension orthostatique et SCIP, à la limite de la significativité. Cette association apparemment paradoxale pourrait être expliquée par une efficacité plus importante de la réaction adrénérgique à l'orthostatisme en présence d'artères rigidifiées par la calcification. L'hypotension orthostatique est néanmoins très peu spécifique de la neuropathie autonome diabétique, les causes en étant très variées : médication

(antihypertenseurs, neuroleptiques et antidépresseurs tricycliques notamment) ; déshydratation ; trouble neurologique, cardiovasculaire ou endocrinien. Par ailleurs, l'étiologie reste indéterminée dans un tiers des cas (392). Cette association doit donc être interprétée de façon prudente. De plus, l'hypotension orthostatique est plus fréquente chez les femmes (393), ce qui peut biaiser la relation négative avec la calcification vasculaire, cette dernière étant associée au sexe masculin.

6.8. Examen artériel

L'examen clinique, l'EDA et le SCIP permettent une évaluation détaillée de l'artériopathie périphérique. Le SCIP est associé de façon significative à tous les paramètres d'évaluation de l'artériopathie périphérique : palpation des pouls anormale, ABI moyen, $ABI \leq 0.9$, $ABI \geq 1.3$, présence d'AOMI à l'EDA, score d'occlusion, score de médiacalcose. Ainsi, bien qu'il n'évalue que la calcification vasculaire, celle-ci semble bien corrélée aux occlusions artérielles. Ces résultats confirment la validité du SCIP dans l'évaluation globale de l'artériopathie périphérique. Les limites en sont l'absence d'évaluation directe des sténoses et occlusions artérielles, ainsi que l'impossibilité de distinguer les calcifications de l'intima et celles de la média. Alors que le SCIP apparaît associé au risque d'amputation et en constitue un meilleur facteur prédictif que l'ABI (71), sa valeur prédictive des complications de l'AOMI (ischémie, amputation) doit néanmoins être confirmée pour préciser son utilité clinique dans l'évaluation de l'AOMI (71).

7. Points forts et limites de l'étude DIACART

L'étude DIACART présente plusieurs points forts. Les différents tests sont réalisés par un nombre restreint d'examineurs (réduction du risque de biais interobservateur), en aveugle pour les résultats des autres types d'exams. Les différents critères d'exclusion évitent des biais liés à des paramètres pouvant influencer nos variables d'intérêt (IRC sévère et traitement contre l'ostéoporose notamment). Un examen très détaillé de la neuropathie et de l'artériopathie périphérique, ainsi que le dosage de nombreux paramètres biologiques, permettent une évaluation poussée des complications neurologiques et artérielles des membres inférieurs dans notre population diabétique à haut RCV.

Un certain nombre de limites doivent néanmoins être mentionnées. L'évaluation par SCIP ne permet pas de distinguer les calcifications de l'intima de celles de la média. Le caractère transversal des analyses présentées ici ne permet ni une évaluation dynamique du processus de calcification vasculaire (calcifications anciennes ou nouvelles, processus calcifiant actif ou non), ni de conclure à des relations de cause à effet. Nous étudions une population à haut RCV, en majorité des patients avec coronaropathie, ce qui limite la généralisation des résultats. Nous n'avons pas de groupe

contrôle. La taille de l'échantillon, bien que calculée au préalable selon notre hypothèse prospective principale, peut néanmoins limiter la puissance de l'analyse de certains paramètres.

8. Suite de l'étude DIACART et objectifs du suivi

Les données présentées ici constituent la partie transversale de l'étude DIACART. Les patients seront revus deux ans après leur inclusion, avec répétition du SCIP et des analyses biochimiques. L'association entre ces dosages et le SCIP à l'inclusion et à deux ans sera évaluée, de même que l'association entre la vitesse de calcification (progression du SCIP pendant les deux années) et ces dosages à l'inclusion.

Cette analyse prospective permettra d'évaluer la calcification artérielle de façon dynamique, d'en étudier les facteurs prédictifs de progression – en particulier marqueurs du remodelage osseux et de glycation avancée et adiponectine – et de suggérer d'éventuels liens causaux qui devraient contribuer à améliorer les connaissances physiopathologiques de cette complication vasculaire.

9. Conclusion de l'étude DIACART

Le but de l'étude DIACART est d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de l'artériopathie périphérique chez les patients diabétiques. Le processus ciblé est la calcification artérielle, particulièrement prévalente en présence de diabète, mais dont la localisation aux membres inférieurs est encore peu étudiée en clinique.

Nos résultats suggèrent que l'OPG, la fétuine A et la glycation avancée sont impliquées dans le processus de calcification des artères des membres inférieurs. Par ailleurs, nous mettons en évidence une relation positive très forte entre adiponectine et artériopathie périphérique, en cohérence avec des données récentes. Notre étude confirme également le lien connu entre calcification artérielle et différents marqueurs et/ou facteurs de RCV (âge, sexe, durée du diabète, tabagisme, neuropathie, néphropathie, rétinopathie).

Ces résultats ont été présentés sous forme d'un poster au congrès annuel de la Société Suisse d'Endocrinologie et de Diabétologie (SSED, Berne, 22-23.11.2013).

L'analyse prospective apportera des notions complémentaires quant aux liens dynamiques de ces paramètres avec la calcification artérielle, aidera à préciser leur rôle comme marqueurs et/ou facteurs de RCV, et permettra peut-être la mise en place d'essais thérapeutiques ciblant ces mécanismes.

D) Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Agnès Hartemann pour sa disponibilité et son important soutien tout au long de mon travail de recherche. Je remercie également, pour leur précieuse collaboration, toute l'équipe du centre d'investigation clinique Paris-Est et des services de diabétologie et de cardiologie du GHPS, ainsi que les Docteurs Olivier Bourron, Beny Charbit, Frédérique Lajat-Kiss, Josette Le Doeuff, Jacques Lajou, Michel Dadon, Romuald Mentaverri et Michèle Fonfrède, les Professeurs Philippe Gilléry, Ziad Massy, Philippe Cluzel et Alain Mallet, et les Internes Salim Kemel, Antoine Pierucci et Florence Morel, qui ont permis le bon déroulement de la première partie de cette étude. Je remercie finalement mon directeur de thèse à Lausanne, le Docteur Juan Ruiz.

E) Annexes

Annexe 1 : échographie-doppler artérielle des membres inférieurs (EDA), étude DIACART

Nom.....

Prénom

Date.....

Examineur

- Coter séparément

1) le degré de sténose : mettre une croix dans la case correspondante de normal à occluse.

2) la présence de plaque(s) : + si présence, - si absence

3) la médiacalcosé :

- pour absente
- + pour débutante = calcifications « en mottes », étagées
- ++ pour modérée = **calcifications continues**
- +++ pour importante = **calcifications majeures et lumière plus visible**

- Sténose > 70% (diamètre) = rapport des vitesses systoliques sténose/amont > 4

- Merci de joindre un compte-rendu détaillé habituel

Jambe droite

	Normal	Sténose(s) <50%	Sténose(s) 50-70%	Sténose(s) >70%	Occluse	Plaque(s)	Médiacalcosé
Etage aorto-iliaque D							
Fémorale commune							
Fémorale superficielle							
Fémorale profonde							
Poplitée							
Tronc tibio- péronier							
Tibiale antérieure							
Tibiale postérieure							
Péronière							
Pédieuse							

Jambe gauche

	Normal	Sténose(s) <50%	Sténose(s) 50-70%	Sténose(s) >70%	Occluse	Plaque(s)	Médiacalcosé
Etage aorto-iliaque D							
Fémorale commune							
Fémorale superficielle							
Fémorale profonde							
Poplitée							
Tronc tibio- péronier							
Tibiale antérieure							
Tibiale postérieure							
Péronière							
Pédieuse							

Annexe 2 : liste des abréviations

ABI	ankle brachial index
ACR	rapport albuminurie / créatininurie
AFGP	1-alkyl-2-formyl-3,4-diglycosyl pyrrole
AGEs	advanced glycation end products (produits de fin de glycation)
AIT	accident ischémique transitoire
ALT-711	alagebrium
ALT-946	N-2-(acetamidoethyl)hydrozinecarboximidamide hydrochloride
AOMI	artériopathie oblitérante des membres inférieurs
apoB	apolipoprotéine B
AVC	accident vasculaire cérébral
BMP	bone morphogenic protein
CEL	Nε-carboxymethyllysine
CML	Nε-carboxyethyllysine
CMLV	cellule musculaire lisse vasculaire
CRP _{us}	protéine C-réactive ultrasensible
CVC	cellule vasculaire calcifiante
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
3-DGH	3-deoxyglucosone hydroimidazolone
DOLD	3-deoxyglucosone lysine dimer
EASD	European Association for the Study of Diabetes
EDA	échographie-doppler artérielle des membres inférieurs
FFI	2-(2-furoyl)-485-furanyl-1H-imidazole
FGF	fibroblast growth factor
FRCV	facteur de risque cardiovasculaire
GH	glyoxal-derived hydroimidazolone
GHPS	groupe hospitalier universitaire Pitié-Salpêtrière
GOLD	glyoxal lysine dimer
HTA	hypertension artérielle
HbA1c	hémoglobine glyquée
HDL	high density lipoprotein
HSP	heat shock protein
IFN	interféron
IGF	insulin-like growth factor

IL	interleukine
IM	infarctus myocardique
IMC	indice de masse corporelle
INSERM	institut national de la santé et de la recherche médicale
IRC	insuffisance rénale chronique
LDL	low density lipoprotein
LDLox	low density lipoprotein oxydées
LOX	lectin-like oxidized LDL receptor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDRD	modification of diet in renal disease
MG-H1	methyl-glyoxal-hydroimidazolone
MGP	matrix gla protein
MOLD	methylglyoxal lysine dimer
NAC	neuropathie autonome cardiaque
NDS	neuropathy disability score
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	oxyde nitrique
NT-proBNP	amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide
OPG	ostéoprotégérine
PA	phosphatase alcaline
Pi	phosphate inorganique
PPi	pyrophosphate inorganique
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PTB	N-phenacylthiazolium bromide
PTH	parathormone
QTc	intervalle QT corrigé
RAGE	receptor for advanced glycation end products
RANK	receptor activator of NF- κ B
RANKL	receptor activator of NF- κ B ligand
RCV	risque cardiovasculaire
RR	intervalle RR
SCA	syndrome coronarien aigu
SCC	score calcique coronaire
SCIP	score calcique infra-poplité
SFD	Société Francophone du Diabète

SRAA	système rénine-angiotensine-aldostérone
sRAGE	soluble receptor for advanced glycation end products
sRANKL	soluble receptor activator of NF- κ B ligand
SSED	Société Suisse d'Endocrinologie et de Diabétologie
TA	tension artérielle
TAD	tension artérielle diastolique
TAS	tension artérielle systolique
TNF	tumor necrosis factor
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
UMR	unité mixte de recherche
UPA	unité paquets-années
VHDL	very high density lipoprotein
VPP	valeur prédictive positive
VPN	valeur prédictive négative

F) Références

1. Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 1998;339(4):229-234.
2. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;16(2):434-444.
3. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 1979;241(19):2035-2038.
4. Grimaldi A, Heurtier A. Epidemiology of cardio-vascular complications of diabetes. *Diabetes Metab.* 1999;25 Suppl 3:12-20.
5. Fosse S, Hartemann-Heurtier A, Jacqueminet S, Ha Van G, Grimaldi A, Fagot-Campagna A. Incidence and characteristics of lower limb amputations in people with diabetes. *Diabet. Med.* 2009;26(4):391-396.
6. Wölfle KD, Bruijnen H, Reeps C, Reutemann S, Wack C, Campbell P, et al. Tibioperoneal arterial lesions and critical foot ischaemia: successful management by the use of short vein grafts and percutaneous transluminal angioplasty. *VASA* 2000;29(3):207-214.
7. Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361(9374):2005-2016.
8. Gaede P, Lund-Andersen H, Parving H-H, Pedersen O. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2008;358(6):580-591.
9. Pedersen TR, Kjekshus J, Pyörälä K, Olsson AG, Cook TJ, Musliner TA, et al. Effect of simvastatin on ischemic signs and symptoms in the Scandinavian simvastatin survival study (4S). *Am. J. Cardiol.* 1998;81(3):333-335.
10. Aronow WS, Nayak D, Woodworth S, Ahn C. Effect of simvastatin versus placebo on treadmill exercise time until the onset of intermittent claudication in older patients with peripheral arterial disease at six months and at one year after treatment. *Am. J. Cardiol.* 2003;92(6):711-712.
11. Mondillo S, Ballo P, Barbati R, Guerrini F, Ammaturo T, Agricola E, et al. Effects of simvastatin on walking performance and symptoms of intermittent claudication in hypercholesterolemic patients with peripheral vascular disease. *Am. J. Med.* 2003;114(5):359-364.
12. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996;348(9038):1329-1339.
13. Adler AI, Stevens RJ, Neil A, Stratton IM, Boulton AJM, Holman RR. UKPDS 59: hyperglycemia and other potentially modifiable risk factors for peripheral vascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25(5):894-899.
14. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 2000;321(7258):405-412.
15. Adler AI, Stratton IM, Neil HA, Yudkin JS, Matthews DR, Cull CA, et al. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ* 2000;321(7258):412-419.
16. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. *N. Engl. J. Med.* 2000;342(6):381-389.

17. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N. Engl. J. Med.* 1993;329(14):977-986.
18. Gall MA, Borch-Johnsen K, Hougaard P, Nielsen FS, Parving HH. Albuminuria and poor glycemic control predict mortality in NIDDM. *Diabetes* 1995;44(11):1303-1309.
19. Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care* 1999;22(2):233-240.
20. Uusitupa MI, Niskanen LK, Siitonen O, Voutilainen E, Pyörälä K. Ten-year cardiovascular mortality in relation to risk factors and abnormalities in lipoprotein composition in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia* 1993;36(11):1175-1184.
21. Kuusisto J, Mykkänen L, Pyörälä K, Laakso M. NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease in elderly subjects. *Diabetes* 1994;43(8):960-967.
22. Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 1998;21(7):1167-1172.
23. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol J-P, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006;295(14):1681-1687.
24. Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC Jr, Bigger JT, Buse JB, et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2008;358(24):2545-2559.
25. Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, et al. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2009;360(2):129-139.
26. Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2008;358(24):2560-2572.
27. King GL, Kunisaki M, Nishio Y, Inoguchi T, Shiba T, Xia P. Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. *Diabetes* 1996;45 Suppl 3:S105-108.
28. Jeffcoate WJ, Rasmussen LM, Hofbauer LC, Game FL. Medial arterial calcification in diabetes and its relationship to neuropathy. *Diabetologia* 2009;52(12):2478-2488.
29. Olesen P, Ledet T, Rasmussen LM. Arterial osteoprotegerin: increased amounts in diabetes and modifiable synthesis from vascular smooth muscle cells by insulin and TNF-alpha. *Diabetologia* 2005;48(3):561-568.
30. Wang CCL, Sorribas V, Sharma G, Levi M, Draznin B. Insulin attenuates vascular smooth muscle calcification but increases vascular smooth muscle cell phosphate transport. *Atherosclerosis* 2007;195(1):e65-75.
31. Vergès B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2005;31(5):429-439.
32. Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, Crouse JR 3rd, Leiter LA, Linz P, et al. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 2010;362(17):1563-1574.
33. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HAW, Livingstone SJ, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2004;364(9435):685-696.
34. Vergès B. Diabetic dyslipidaemia: insights for optimizing patient management. *Curr Med Res Opin.* 2005;21 Suppl 1:S29-40.

35. West of Scotland Coronary Prevention Study: identification of high-risk groups and comparison with other cardiovascular intervention trials. *Lancet* 1996;348(9038):1339-1342.
36. Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. Low triglycerides-high high-density lipoprotein cholesterol and risk of ischemic heart disease. *Arch. Intern. Med.* 2001;161(3):361-366.
37. Harvey JN. Trends in the prevalence of diabetic nephropathy in type 1 and type 2 diabetes. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2003;12(3):317-322.
38. Chantrel F, Enache I, Bouiller M, Kolb I, Kunz K, Petitjean P, et al. Abysmal prognosis of patients with type 2 diabetes entering dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1999;14(1):129-136.
39. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 2007;116(1):85-97.
40. André Grimaldi et al. *Traité de diabétologie. Médecine-Sciences Flammarion.*
41. Madore F. Vascular risk factors and renal failure. *Med Sci (Paris)* 2004;20(12):1100-1103.
42. O'Hare A, Johansen K. Lower-extremity peripheral arterial disease among patients with end-stage renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001;12(12):2838-2847.
43. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 2008;117(22):2938-2948.
44. Persy V, D'Haese P. Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox. *Trends Mol Med.* 2009;15(9):405-416.
45. Jude EB, Oyibo SO, Chalmers N, Boulton AJ. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes Care* 2001;24(8):1433-1437.
46. Strandness D Jr, Priest R, Gibbons G. Combined clinical and pathologic study of diabetic and nondiabetic peripheral arterial disease. *Diabetes* 1964;13:366-372.
47. Kronmal RA, McClelland RL, Detrano R, Shea S, Lima JA, Cushman M, et al. Risk factors for the progression of coronary artery calcification in asymptomatic subjects: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Circulation* 2007;115(21):2722-2730.
48. Raggi P, Cooil B, Ratti C, Callister TQ, Budoff M. Progression of coronary artery calcium and occurrence of myocardial infarction in patients with and without diabetes mellitus. *Hypertension* 2005;46(1):238-243.
49. Bishop PD, Feiten LE, Ouriel K, Nassoiy SP, Pavkov ML, Clair DG, et al. Arterial calcification increases in distal arteries in patients with peripheral arterial disease. *Ann Vasc Surg.* 2008;22(6):799-805.
50. Kashyap VS, Pavkov ML, Bishop PD, Nassoiy SP, Eagleton MJ, Clair DG, et al. Angiography underestimates peripheral atherosclerosis: lumenography revisited. *J. Endovasc. Ther.* 2008;15(1):117-125.
51. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420(6917):868-874.
52. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W Jr, Richardson M, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb.* 1992;12(1):120-134.
53. Six I, Massy ZA. Inflammation and vascular calcifications. *Nephrol. Ther.* 2010;6 Suppl 1:S13-18.
54. Sato K, Niessner A, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM. TRAIL-expressing T cells induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in the atherosclerotic plaque. *J. Exp. Med.* 2006;203(1):239-250.
55. Felton CV, Crook D, Davies MJ, Oliver MF. Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17(7):1337-1345.

56. Stehouwer CDA, Henry RMA, Ferreira I. Arterial stiffness in diabetes and the metabolic syndrome: a pathway to cardiovascular disease. *Diabetologia* 2008;51(4):527-539.
57. O'Rourke MF, Hashimoto J. Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007;50(1):1-13.
58. Fukui M, Kitagawa Y, Nakamura N, Mogami S, Ohnishi M, Hirata C, et al. Augmentation of central arterial pressure as a marker of atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2003;59(2):153-161.
59. Everhart JE, Pettitt DJ, Knowler WC, Rose FA, Bennett PH. Medial arterial calcification and its association with mortality and complications of diabetes. *Diabetologia* 1988;31(1):16-23.
60. Nelson RG, Gohdes DM, Everhart JE, Hartner JA, Zwemer FL, Pettitt DJ, et al. Lower-extremity amputations in NIDDM. 12-yr follow-up study in Pima Indians. *Diabetes Care* 1988;11(1):8-16.
61. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Rönnemaa T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996;16(8):978-983.
62. Soor GS, Vukin I, Leong SW, Oreopoulos G, Butany J. Peripheral vascular disease: who gets it and why? A histomorphological analysis of 261 arterial segments from 58 cases. *Pathology* 2008;40(4):385-391.
63. Shao J-S, Cheng S-L, Sadhu J, Towler DA. Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective. *Hypertension* 2010;55(3):579-592.
64. Cottart C-H, Laguillier C, Nivet-Antoine V, Klimczak C, Sebban C, Beaudoux J-L. [Biology of arterial ageing and arteriosclerosis]. *C. R. Biol.* 2009;332(5):433-447.
65. Shao J-S, Cai J, Towler DA. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(7):1423-1430.
66. Nakamura S, Ishibashi-Ueda H, Niizuma S, Yoshihara F, Horio T, Kawano Y. Coronary calcification in patients with chronic kidney disease and coronary artery disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(12):1892-1900.
67. Massy ZA, Mentaverri R, Mozar A, Brazier M, Kamel S. The pathophysiology of vascular calcification: are osteoclast-like cells the missing link? *Diabetes Metab.* 2008;34 Suppl 1:S16-20.
68. Vengrenyuk Y, Carlier S, Xanthos S, Cardoso L, Ganatos P, Virmani R, et al. A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(40):14678-14683.
69. New SEP, Aikawa E. Cardiovascular calcification: an inflammatory disease. *Circ. J.* 2011;75(6):1305-1313.
70. Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7(9):528-536.
71. Guzman RJ, Brinkley DM, Schumacher PM, Donahue RMJ, Beavers H, Qin X. Tibial artery calcification as a marker of amputation risk in patients with peripheral arterial disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008;51(20):1967-1974.
72. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo J-L, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* 2007;116(24):2841-2850.
73. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004;15(11):2857-2867.

74. Dervisoglu E, Kir HM, Kalender B, Caglayan C, Eraldemir C. Serum fetuin--a concentrations are inversely related to cytokine concentrations in patients with chronic renal failure. *Cytokine* 2008;44(3):323-327.
75. Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D, Lok VM, Jaffer FA, Aikawa M, et al. Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease. *Circulation* 2007;115(3):377-386.
76. Nadra I, Mason JC, Philippidis P, Florey O, Smythe CDW, McCarthy GM, et al. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ. Res.* 2005;96(12):1248-1256.
77. Shanahan CM. Inflammation ushers in calcification: a cycle of damage and protection? *Circulation* 2007;116(24):2782-2785.
78. Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ. Res.* 2005;96(7):717-722.
79. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27(11):2302-2309.
80. Speer MY, McKee MD, Guldborg RE, Liaw L, Yang H-Y, Tung E, et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J. Exp. Med.* 2002;196(8):1047-1055.
81. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N. Engl. J. Med.* 2008;359(13):1343-1356.
82. Callister TQ, Raggi P, Cooil B, Lippolis NJ, Russo DJ. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on coronary artery disease as assessed by electron-beam computed tomography. *N. Engl. J. Med.* 1998;339(27):1972-1978.
83. Bas A, Lopez I, Perez J, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J. Bone Miner. Res.* 2006;21(3):484-490.
84. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20(2):317-327.
85. Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J. Cell Biol.* 2004;165(5):625-630.
86. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386(6620):78-81.
87. Demer L, Tintut Y. The roles of lipid oxidation products and receptor activator of nuclear factor- κ B signaling in atherosclerotic calcification. *Circ. Res.* 2011;108(12):1482-1493.
88. Ouchi Y, Akishita M, De Souza AC, Nakamura T, Orimo H. Age-related loss of bone mass and aortic/aortic valve calcification--reevaluation of recommended dietary allowance of calcium in the elderly. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993;676:297-307.
89. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001;286(3):327-334.
90. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95(13):7614-7619.
91. Van Lente F. Markers of inflammation as predictors in cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta* 2000;293(1-2):31-52.

92. Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Lehto S, Rönnemaa T. High-sensitivity C-reactive protein and coronary heart disease mortality in patients with type 2 diabetes: a 7-year follow-up study. *Diabetes Care* 2006;29(2):329-333.
93. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 2003;107(3):391-397.
94. Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkänen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000;102(1):42-47.
95. Fröhlich M, Imhof A, Berg G, Hutchinson WL, Pepys MB, Boeing H, et al. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care* 2000;23(12):1835-1839.
96. Schulze MB, Rimm EB, Li T, Rifai N, Stampfer MJ, Hu FB. C-reactive protein and incident cardiovascular events among men with diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(4):889-894.
97. O'Sullivan EP, Ashley DT, Davenport C, Kelly J, Devlin N, Crowley R, et al. Osteoprotegerin is higher in peripheral arterial disease regardless of glycaemic status. *Thromb. Res.* 2010;126(6):e423-427.
98. Singh DK, Winocour P, Summerhayes B, Kaniyur S, Viljoen A, Sivakumar G, et al. Prevalence and progression of peripheral vascular calcification in type 2 diabetes subjects with preserved kidney function. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2012;97(1):158-165.
99. Anand DV, Lim E, Darko D, Bassett P, Hopkins D, Lipkin D, et al. Determinants of progression of coronary artery calcification in type 2 diabetes role of glycemic control and inflammatory/vascular calcification markers. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007;50(23):2218-2225.
100. Holt RIG, Simpson HL, Sönksen PH. The role of the growth hormone-insulin-like growth factor axis in glucose homeostasis. *Diabet. Med.* 2003;20(1):3-15.
101. Holly JM, Amiel SA, Sandhu RR, Rees LH, Wass JA. The role of growth hormone in diabetes mellitus. *J. Endocrinol.* 1988;118(3):353-364.
102. Higashi Y, Sukhanov S, Anwar A, Shai S-Y, Delafontaine P. IGF-1, oxidative stress and atheroprotection. *Trends Endocrinol. Metab.* 2010;21(4):245-254.
103. Radcliff K, Tang T-B, Lim J, Zhang Z, Abedin M, Demer LL, et al. Insulin-like growth factor-1 regulates proliferation and osteoblastic differentiation of calcifying vascular cells via extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circ. Res.* 2005;96(4):398-400.
104. Sukhanov S, Higashi Y, Shai S-Y, Vaughn C, Mohler J, Li Y, et al. IGF-1 reduces inflammatory responses, suppresses oxidative stress, and decreases atherosclerosis progression in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27(12):2684-2690.
105. Von der Thüsen JH, Borensztajn KS, Moimas S, Van Heiningen S, Teeling P, Van Berkel TJC, et al. IGF-1 has plaque-stabilizing effects in atherosclerosis by altering vascular smooth muscle cell phenotype. *Am. J. Pathol.* 2011;178(2):924-934.
106. Hilding A, Brismar K, Degerblad M, Thorén M, Hall K. Altered relation between circulating levels of insulin-like growth factor-binding protein-1 and insulin in growth hormone-deficient patients and insulin-dependent diabetic patients compared to that in healthy subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995;80(9):2646-2652.
107. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 17 avr 1998;93(2):165-176.

108. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002;22(4):549-553.
109. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ. Res.* 2004;95(11):1046-1057.
110. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J. Exp. Med.* 2000;192(4):463-474.
111. Quercioli A, Montecucco F, Bertolotto M, Ottonello L, Pende A, Mach F, et al. Coronary artery calcification and cardiovascular risk: the role of RANKL/OPG signalling. *Eur. J. Clin. Invest.* 2010;40(7):645-654.
112. Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, López-Ongil S, et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ. Res.* 2009;104(9):1041-1048.
113. Chasseraud M, Liabeuf S, Mozar A, Mentaverri R, Mentaveri R, Brazier M, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and vascular calcification. *Ther Apher Dial.* 2011;15(2):140-146.
114. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89(2):309-319.
115. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;12(9):1260-1268.
116. Morony S, Tintut Y, Zhang Z, Cattley RC, Van G, Dwyer D, et al. Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in *ldlr(-/-)* mice. *Circulation* 2008;117(3):411-420.
117. Ovchinnikova O, Gylfe A, Bailey L, Nordström A, Rudling M, Jung C, et al. Osteoprotegerin promotes fibrous cap formation in atherosclerotic lesions of ApoE-deficient mice--brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009;29(10):1478-1480.
118. Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, Rattazzi M, Varon RM, Averill M, et al. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(9):2117-2124.
119. Ndip A, Williams A, Jude EB, Serracino-Inglott F, Richardson S, Smyth JV, et al. The RANKL/RANK/OPG signaling pathway mediates medial arterial calcification in diabetic Charcot neuroarthropathy. *Diabetes* 2011;60(8):2187-2196.
120. Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21(10):1610-1616.
121. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21(5):817-824.
122. Ziegler S, Kudlacek S, Luger A, Minar E. Osteoprotegerin plasma concentrations correlate with severity of peripheral artery disease. *Atherosclerosis* 2005;182(1):175-180.
123. Jono S, Ikari Y, Shioi A, Mori K, Miki T, Hara K, et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002;106(10):1192-1194.
124. Kiechl S, Schett G, Wenning G, Redlich K, Oberhollenzer M, Mayr A, et al. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation* 2004;109(18):2175-2180.
125. Avignon A, Sultan A, Piot C, Elaerts S, Cristol JP, Dupuy AM. Osteoprotegerin is associated with silent coronary artery disease in high-risk but asymptomatic type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2005;28(9):2176-2180.

126. Schoppet M, Sattler AM, Schaefer JR, Herzum M, Maisch B, Hofbauer LC. Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88(3):1024-1028.
127. Avignon A, Sultan A, Piot C, Mariano-Goulart D, Thuan Dit Dieudonné J-F, Cristol JP, et al. Osteoprotegerin: a novel independent marker for silent myocardial ischemia in asymptomatic diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30(11):2934-2939.
128. Browner WS, Lui LY, Cummings SR. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86(2):631-637.
129. Terekci HM, Senol MG, Top C, Sahan B, Celik S, Sayan O, et al. Plasma osteoprotegerin concentrations in type 2 diabetic patients and its association with neuropathy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2009;117(3):119-123.
130. Knudsen ST, Foss CH, Poulsen PL, Andersen NH, Mogensen CE, Rasmussen LM. Increased plasma concentrations of osteoprotegerin in type 2 diabetic patients with microvascular complications. *Eur. J. Endocrinol.* 2003;149(1):39-42.
131. Secchiero P, Corallini F, Pandolfi A, Consoli A, Candido R, Fabris B, et al. An increased osteoprotegerin serum release characterizes the early onset of diabetes mellitus and may contribute to endothelial cell dysfunction. *Am. J. Pathol.* 2006;169(6):2236-2244.
132. Mikami S, Hamano T, Fujii N, Nagasawa Y, Isaka Y, Moriyama T, et al. Serum osteoprotegerin as a screening tool for coronary artery calcification score in diabetic pre-dialysis patients. *Hypertens. Res.* 2008;31(6):1163-1170.
133. Schoppet M, Schaefer JR, Hofbauer LC. Low serum levels of soluble RANK ligand are associated with the presence of coronary artery disease in men. *Circulation* 2003;107(11):e76; author reply e76.
134. Crisafulli A, Micari A, Altavilla D, Saporito F, Sardella A, Passaniti M, et al. Serum levels of osteoprotegerin and RANKL in patients with ST elevation acute myocardial infarction. *Clin. Sci.* 2005;109(4):389-395.
135. Ozkok A, Caliskan Y, Sakaci T, Erten G, Karahan G, Ozel A, et al. Osteoprotegerin/RANKL Axis and Progression of Coronary Artery Calcification in Hemodialysis Patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(6):965-973.
136. Lieb W, Gona P, Larson MG, Massaro JM, Lipinska I, Keaney JF Jr, et al. Biomarkers of the osteoprotegerin pathway: clinical correlates, subclinical disease, incident cardiovascular disease, and mortality. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010;30(9):1849-1854.
137. Kiechl S, Schett G, Schwaiger J, Seppi K, Eder P, Egger G, et al. Soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and risk for cardiovascular disease. *Circulation* 2007;116(4):385-391.
138. Semb AG, Ueland T, Aukrust P, Wareham NJ, Luben R, Gullestad L, et al. Osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and risk for coronary events: a nested case-control approach in the prospective EPIC-Norfolk population study 1993-2003. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009;29(6):975-980.
139. Sandberg WJ, Yndestad A, Øie E, Smith C, Ueland T, Ovchinnikova O, et al. Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute coronary syndrome: possible role in plaque destabilization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(4):857-863.
140. Liabeuf S, Barreto DV, Barreto FC, Chasseraud M, Brazier M, Choukroun G, et al. The circulating soluble TRAIL is a negative marker for inflammation inversely associated with the mortality risk in chronic kidney disease patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2010;25(8):2596-2602.
141. Bogado CE, Boailchuk JA, Zanchetta MB, Massari FE, Zanchetta JR. Denosumab: an update. *Drugs Today* 2011;47(8):605-613.

142. Helas S, Goettsch C, Schoppet M, Zeitz U, Hempel U, Morawietz H, et al. Inhibition of receptor activator of NF-kappaB ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice. *Am. J. Pathol.* 2009;175(2):473-478.
143. Sipos W, Zysset P, Kostenuik P, Mayrhofer E, Bogdan C, Rauner M, et al. OPG-Fc treatment in growing pigs leads to rapid reductions in bone resorption markers, serum calcium, and bone formation markers. *Horm. Metab. Res.* 2011;43(13):944-949.
144. Dickson IR, Bagga M, Paterson CR. Variations in the serum concentration and urine excretion of alpha 2HS-glycoprotein, a bone-related protein, in normal individuals and in patients with osteogenesis imperfecta. *Calcif. Tissue Int.* 1983;35(1):16-20.
145. Ashton BA, Smith R. Plasma alpha 2HS-glycoprotein concentration in Paget's disease of bone: its possible significance. *Clin. Sci.* 1980;58(5):435-438.
146. Jahnen-Dechent W, Schäfer C, Ketteler M, McKee MD. Mineral chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J. Mol. Med.* 2008;86(4):379-389.
147. Price PA, Thomas GR, Pardini AW, Figueira WF, Caputo JM, Williamson MK. Discovery of a high molecular weight complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix gamma-carboxyglutamic acid protein in the serum of etidronate-treated rats. *J. Biol. Chem.* 2002;277(6):3926-3934.
148. Mathews ST, Singh GP, Ranalletta M, Cintron VJ, Qiang X, Goustin AS, et al. Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene. *Diabetes* 2002;51(8):2450-2458.
149. Ix JH, Shlipak MG, Brandenburg VM, Ali S, Ketteler M, Whooley MA. Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: data from the Heart and Soul Study. *Circulation* 2006;113(14):1760-1767.
150. Stefan N, Fritsche A, Weikert C, Boeing H, Joost H-G, Häring H-U, et al. Plasma fetuin-A levels and the risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 2008;57(10):2762-2767.
151. Mori K, Emoto M, Araki T, Yokoyama H, Teramura M, Lee E, et al. Association of serum fetuin-A with carotid arterial stiffness. *Clin. Endocrinol.* 2007;66(2):246-250.
152. Demetriou M, Binkert C, Sukhu B, Tenenbaum HC, Dennis JW. Fetuin/alpha2-HS glycoprotein is a transforming growth factor-beta type II receptor mimic and cytokine antagonist. *J. Biol. Chem.* 1996;271(22):12755-12761.
153. Ombrellino M, Wang H, Yang H, Zhang M, Vishnubhakat J, Frazier A, et al. Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan. *Shock* 2001;15(3):181-185.
154. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, et al. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J. Clin. Invest.* 2003;112(3):357-366.
155. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Böhm R, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* 2003;361(9360):827-833.
156. Wang AY-M, Woo J, Lam CW-K, Wang M, Chan IH-S, Gao P, et al. Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005;20(8):1676-1685.
157. Ketteler M. Fetuin-A and extraosseous calcification in uremia. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2005;14(4):337-342.

158. Zheng S, De Las Fuentes L, Bierhals A, Ash-Bernal R, Spence K, Slatopolsky E, et al. Relation of serum fetuin-A levels to coronary artery calcium in African-American patients on chronic hemodialysis. *Am. J. Cardiol.* 2009;103(1):46-49.
159. Roos M, Lutz J, Salmhofer H, Lupp A, Knauss A, Braun S, et al. Relation between plasma fibroblast growth factor-23, serum fetuin-A levels and coronary artery calcification evaluated by multislice computed tomography in patients with normal kidney function. *Clin. Endocrinol.* 2008;68(4):660-665.
160. Lehtinen AB, Burdon KP, Lewis JP, Langefeld CD, Ziegler JT, Rich SS, et al. Association of alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein polymorphisms with subclinical atherosclerosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007;92(1):345-352.
161. Parker BD, Schurgers LJ, Brandenburg VM, Christenson RH, Vermeer C, Ketteler M, et al. The associations of fibroblast growth factor 23 and uncarboxylated matrix Gla protein with mortality in coronary artery disease: the Heart and Soul Study. *Ann. Intern. Med.* 2010;152(10):640-648.
162. Ix JH, Katz R, De Boer IH, Kestenbaum BR, Peralta CA, Jenny NS, et al. Fetuin-A is inversely associated with coronary artery calcification in community-living persons: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Clin. Chem.* 2012;58(5):887-895.
163. Emoto M, Mori K, Lee E, Kawano N, Yamazaki Y, Tsuchikura S, et al. Fetuin-A and atherosclerotic calcified plaque in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metab. Clin. Exp.* 2010;59(6):873-878.
164. Eraso LH, Ginwala N, Qasim AN, Mehta NN, Dlugash R, Kapoor S, et al. Association of lower plasma fetuin-a levels with peripheral arterial disease in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010;33(2):408-410.
165. Mehrotra R, Westenfeld R, Christenson P, Budoff M, Ipp E, Takasu J, et al. Serum fetuin-A in nondialyzed patients with diabetic nephropathy: relationship with coronary artery calcification. *Kidney Int.* 2005;67(3):1070-1077.
166. Weikert C, Stefan N, Schulze MB, Pischon T, Berger K, Joost H-G, et al. Plasma fetuin-a levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *Circulation* 2008;118(24):2555-2562.
167. Fiore CE, Celotta G, Politi GG, Di Pino L, Castelli Z, Mangiafico RA, et al. Association of high alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin concentration in serum and intima-media thickness in patients with atherosclerotic vascular disease and low bone mass. *Atherosclerosis* 2007;195(1):110-115.
168. Lorant DP, Grujicic M, Hoebaus C, Brix J-M, Hoellerl F, Schernthaner G, et al. Fetuin-A levels are increased in patients with type 2 diabetes and peripheral arterial disease. *Diabetes Care* 2011;34(1):156-161.
169. Silver J, Naveh-Many T. FGF23 and the parathyroid. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;728:92-99.
170. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J. Clin. Invest.* 2004;113(4):561-568.
171. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997;390(6655):45-51.
172. Sitara D, Razzaque MS, Hesse M, Yoganathan S, Taguchi T, Erben RG, et al. Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in *Phex*-deficient mice. *Matrix Biol.* 2004;23(7):421-432.
173. Morishita K, Shirai A, Kubota M, Katakura Y, Nabeshima Y, Takeshige K, et al. The progression of aging in *klotho* mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J. Nutr.* 2001;131(12):3182-3188.

174. Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML, Yu X, Mackenzie DS, Sorenson AH, et al. A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes severe tumoral calcinosis. *J. Clin. Invest.* 2007;117(9):2684-2691.
175. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat. Genet.* 2000;26(3):345-348.
176. Mirza MAI, Hansen T, Johansson L, Ahlström H, Larsson A, Lind L, et al. Relationship between circulating FGF23 and total body atherosclerosis in the community. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009;24(10):3125-3131.
177. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 2008;359(6):584-592.
178. Fliser D, Kollerits B, Neyer U, Ankerst DP, Lhotta K, Lingenhel A, et al. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007;18(9):2600-2608.
179. Khan AM, Chirinos JA, Litt H, Yang W, Rosas SE. FGF-23 and the Progression of Coronary Arterial Calcification in Patients New to Dialysis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2012;7(12):2017-22. doi: 10.2215/CJN.02160212.
180. O'Connell TD, Berry JE, Jarvis AK, Somerman MJ, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulation of cardiac myocyte proliferation and hypertrophy. *Am. J. Physiol.* 1997;272(4 Pt 2):H1751-1758.
181. Li YC, Kong J, Wei M, Chen Z-F, Liu SQ, Cao L-P. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest.* 2002;110(2):229-238.
182. Mirza MAI, Larsson A, Lind L, Larsson TE. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in the community. *Atherosclerosis* 2009;205(2):385-390.
183. Mirza MAI, Alsiö J, Hammarstedt A, Erben RG, Michaëlsson K, Tivesten A, et al. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with fat mass and dyslipidemia in two independent cohorts of elderly individuals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(1):219-227.
184. Dalal M, Sun K, Cappola AR, Ferrucci L, Crasto C, Fried LP, et al. Relationship of serum fibroblast growth factor 23 with cardiovascular disease in older community-dwelling women. *Eur. J. Endocrinol.* 2011;165(5):797-803.
185. Schoppet M, Hofbauer LC, Brinkelle-Schmal N, Varennes A, Goudable J, Richard M, et al. Serum Level of the Phosphaturic Factor FGF23 Is Associated with Abdominal Aortic Calcification in Men: The STRAMBO Study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2012;97(4):E575-83. doi: 10.1210/jc.2011-2836.
186. Taylor EN, Rimm EB, Stampfer MJ, Curhan GC. Plasma fibroblast growth factor 23, parathyroid hormone, phosphorus, and risk of coronary heart disease. *Am. Heart J.* 2011;161(5):956-962.
187. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004;15(8):2208-2218.
188. Chiu KC, Chu A, Go VLW, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004;79(5):820-825.
189. Lind L, Hänni A, Lithell H, Hvarfner A, Sörensen OH, Ljunghall S. Vitamin D is related to blood pressure and other cardiovascular risk factors in middle-aged men. *Am. J. Hypertens.* 1995;8(9):894-901.
190. Sung C-C, Liao M-T, Lu K-C, Wu C-C. Role of vitamin d in insulin resistance. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012;2012:634195.
191. Pittas AG, Dawson-Hughes B, Li T, Van Dam RM, Willett WC, Manson JE, et al. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 2006;29(3):650-656.

192. Watson KE, Abrolat ML, Malone LL, Hoeg JM, Doherty T, Detrano R, et al. Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation* 1997;96(6):1755-1760.
193. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch. Intern. Med.* 2008;168(11):1174-1180.
194. Lund B, Badskjaer J, Lund B, Soerensen OH. Vitamin D and ischaemic heart disease. *Horm. Metab. Res.* 1978;10(6):553-556.
195. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, et al. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch. Intern. Med.* 2008;168(12):1340-1349.
196. Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective. *Br. J. Nutr.* 2005;94(4):483-492.
197. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007;357(3):266- 281.
198. Davies MR, Hruska KA. Pathophysiological mechanisms of vascular calcification in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2001;60(2):472-479.
199. Simpson RU, Weishaar RE. Involvement of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in regulating myocardial calcium metabolism: physiological and pathological actions. *Cell Calcium.* 1988;9(5-6):285-292.
200. Carthy EP, Yamashita W, Hsu A, Ooi BS. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and rat vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 1989;13(6 Pt 2):954-959.
201. Fraser JD, Otawara Y, Price PA. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates the synthesis of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein by osteosarcoma cells. Mutually exclusive expression of vitamin K-dependent bone proteins by clonal osteoblastic cell lines. *J. Biol. Chem.* 1988;263(2):911-916.
202. Canning MO, Grotenhuis K, De Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA. 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Eur. J. Endocrinol.* 2001;145(3):351-357.
203. Müller K, Haahr PM, Diamant M, Rieneck K, Kharazmi A, Bendtzen K. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits cytokine production by human blood monocytes at the post-transcriptional level. *Cytokine* 1992;4(6):506-512.
204. Schleithoff SS, Zittermann A, Tenderich G, Berthold HK, Stehle P, Koerfer R. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006;83(4):754-759.
205. Auwerx J, Bouillon R, Kesteloot H. Relation between 25-hydroxyvitamin D₃, apolipoprotein A-I, and high density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler. Thromb.* 1992;12(6):671-674.
206. Takeo S, Anan M, Fujioka K, Kajihara T, Hiraga S, Miyake K, et al. Functional changes of aorta with massive accumulation of calcium. *Atherosclerosis* 1989;77(2-3):175-181.
207. Vieth R, Kimball S, Hu A, Walfish PG. Randomized comparison of the effects of the vitamin D₃ adequate intake versus 100 mcg (4000 IU) per day on biochemical responses and the wellbeing of patients. *Nutr J.* 2004;3:8.
208. Andersson P, Rydberg E, Willenheimer R. Primary hyperparathyroidism and heart disease--a review. *Eur. Heart J.* 2004;25(20):1776-1787.
209. Rostand SG, Drüeke TB. Parathyroid hormone, vitamin D, and cardiovascular disease in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999;56(2):383-392.
210. Wareham NJ, Byrne CD, Carr C, Day NE, Boucher BJ, Hales CN. Glucose intolerance is associated with altered calcium homeostasis: a possible link between increased serum calcium concentration and cardiovascular disease mortality. *Metab. Clin. Exp.* 1997;46(10):1171-1177.
211. Grey A, Mitnick MA, Masiukiewicz U, Sun BH, Rudikoff S, Jilka RL, et al. A role for interleukin-6 in parathyroid hormone-induced bone resorption in vivo. *Endocrinology* 1999;140(10):4683-4690.

212. Mitnick MA, Grey A, Masiukiewicz U, Bartkiewicz M, Rios-Velez L, Friedman S, et al. Parathyroid hormone induces hepatic production of bioactive interleukin-6 and its soluble receptor. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001;280(3):E405-412.
213. Hagström E, Hellman P, Larsson TE, Ingelsson E, Berglund L, Sundström J, et al. Plasma parathyroid hormone and the risk of cardiovascular mortality in the community. *Circulation* 2009;119(21):2765-2771.
214. Cunningham J, Danese M, Olson K, Klassen P, Chertow GM. Effects of the calcimimetic cinacalcet HCl on cardiovascular disease, fracture, and health-related quality of life in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 2005;68(4):1793-1800.
215. Foley RN, Collins AJ, Herzog CA, Ishani A, Kalra PA. Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009;20(2):397-404.
216. Foley RN, Collins AJ, Ishani A, Kalra PA. Calcium-phosphate levels and cardiovascular disease in community-dwelling adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am. Heart J.* 2008;156(3):556-563.
217. Larsson TE, Olauson H, Hagström E, Ingelsson E, Arnlöv J, Lind L, et al. Conjoint effects of serum calcium and phosphate on risk of total, cardiovascular, and noncardiovascular mortality in the community. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010;30(2):333-339.
218. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation* 2005;112(17):2627-2633.
219. Dhingra R, Sullivan LM, Fox CS, Wang TJ, D'Agostino RB Sr, Gaziano JM, et al. Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. *Arch. Intern. Med.* 2007;167(9):879-885.
220. Onufrak SJ, Bellasi A, Cardarelli F, Vaccarino V, Muntner P, Shaw LJ, et al. Investigation of gender heterogeneity in the associations of serum phosphorus with incident coronary artery disease and all-cause mortality. *Am. J. Epidemiol.* 2009;169(1):67-77.
221. Kalaitzidis R, Tsimihodimos V, Bairaktari E, Siamopoulos KC, Elisaf M. Disturbances of phosphate metabolism: another feature of metabolic syndrome. *Am. J. Kidney Dis.* 2005;45(5):851-858.
222. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ. Res.* 2000;87(7):E10-17.
223. Portale AA, Halloran BP, Morris RC Jr. Physiologic regulation of the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D by phosphorus in normal men. *J. Clin. Invest.* 1989;83(5):1494-1499.
224. Portale AA, Halloran BP, Murphy MM, Morris RC Jr. Oral intake of phosphorus can determine the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D by determining its production rate in humans. *J. Clin. Invest.* 1986;77(1):7-12.
225. Silverberg SJ, Shane E, Clemens TL, Dempster DW, Segre GV, Lindsay R, et al. The effect of oral phosphate administration on major indices of skeletal metabolism in normal subjects. *J. Bone Miner. Res.* 1986;1(4):383-388.
226. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM. Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney International.* 2002;62(5):1724-1731.
227. Welsh P, Doolin O, McConnachie A, Boulton E, McNeil G, Macdonald H, et al. Circulating 25OHD, Dietary Vitamin D, PTH, and Calcium Associations with Incident Cardiovascular Disease and Mortality: The MIDSPAN Family Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012.
228. Leifsson BG, Ahrén B. Serum calcium and survival in a large health screening program. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996;81(6):2149-2153.

229. Lind L, Skarfors E, Berglund L, Lithell H, Ljunghall S. Serum calcium: a new, independent, prospective risk factor for myocardial infarction in middle-aged men followed for 18 years. *J Clin Epidemiol.* 1997;50(8):967-973.
230. Guessous I, Bochud M. Effects of calcium and vitamin D supplementations on cardiovascular disease: review article. *Rev Med Suisse* 2012;8(348):1458-1463.
231. Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc. Res.* 2004;63(4):582-592.
232. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006;114(6):597-605.
233. Carter RE, Lackland DT, Cleary PA, Yim E, Lopes-Virella MF, Gilbert GE, et al. Intensive treatment of diabetes is associated with a reduced rate of peripheral arterial calcification in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 2007;30(10):2646-2648.
234. Barile GR, Pachydaki SI, Tari SR, Lee SE, Donmoyer CM, Ma W, et al. The RAGE axis in early diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005;46(8):2916-2924.
235. Yamamoto Y, Yamagishi S, Yonekura H, Doi T, Tsuji H, Kato I, et al. Roles of the AGE-RAGE system in vascular injury in diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000;902:163-170; discussion 170-172.
236. Lindsey JB, Cipollone F, Abdullah SM, McGuire DK. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications. *Diab Vasc Dis Res.* 2009;6(1):7-14.
237. Kislinger T, Tanji N, Wendt T, Qu W, Lu Y, Ferran LJ Jr, et al. Receptor for advanced glycation end products mediates inflammation and enhanced expression of tissue factor in vasculature of diabetic apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21(6):905-910.
238. Cohen MP, Ziyadeh FN, Chen S. Amadori-modified glycosylated serum proteins and accelerated atherosclerosis in diabetes: pathogenic and therapeutic implications. *J. Lab. Clin. Med.* 2006;147(5):211-219.
239. Schalkwijk C, Ligtvoet N, Twaalfhoven H, Jager A, Blaauwgeers H, Schlingemann R, et al. Amadori albumin in type 1 diabetic patients - Correlation with markers of endothelial function, association with diabetic nephropathy, and localization in retinal capillaries. *Diabetes* 1999;48(12):2446-2453.
240. Schalkwijk CG, Chaturvedi N, Twaalfhoven H, Van Hinsbergh VWM, Stehouwer CDA. Amadori-albumin correlates with microvascular complications and precedes nephropathy in type 1 diabetic patients. *Eur. J. Clin. Invest.* 2002;32(7):500-506.
241. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J. Clin. Invest.* 1997;99(3):457-468.
242. Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Yoshida M, Araki T, et al. N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Biochemistry* 1996;35(24):8075-8083.
243. Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry* 1995;34(34):10872-10878.
244. Hricik DE, Wu YC, Schulak A, Friedlander MA. Disparate changes in plasma and tissue pentosidine levels after kidney and kidney-pancreas transplantation. *Clin Transplant.* 1996;10(6 Pt 1):568-573.
245. Sell DR, Lapolla A, Odetti P, Fogarty J, Monnier VM. Pentosidine formation in skin correlates with severity of complications in individuals with long-standing IDDM. *Diabetes* 1992;41(10):1286-1292.

246. Chabroux S, Canouï-Poitrine F, Reffet S, Mills-Joncour G, Morelon E, Colin C, et al. Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence in type 1 diabetics are associated with nephropathy, but not retinopathy. *Diabetes Metab.* 2010;36(2):152-157.
247. Thornalley PJ. Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem. Soc. Trans.* 2003;31(Pt 6):1343-1348.
248. Sakata N, Meng J, Takebayashi S. Effects of advanced glycation end products on the proliferation and fibronectin production of smooth muscle cells. *J. Atheroscler. Thromb.* 2000;7(3):169-176.
249. Zhou Z, Wang K, Penn MS, Marso SP, Lauer MA, Forudi F, et al. Receptor for AGE (RAGE) mediates neointimal formation in response to arterial injury. *Circulation* 2003;107(17):2238-2243.
250. Sakaguchi T, Yan SF, Yan SD, Belov D, Rong LL, Sousa M, et al. Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J. Clin. Invest.* 2003;111(7):959-972.
251. Aleshin A, Ananthakrishnan R, Li Q, Rosario R, Lu Y, Qu W, et al. RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction via impact on JNK and STAT signaling in a murine model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008;294(4):H1823-1832.
252. Bucciarelli LG, Kaneko M, Ananthakrishnan R, Harja E, Lee LK, Hwang YC, et al. Receptor for advanced-glycation end products: key modulator of myocardial ischemic injury. *Circulation* 2006;113(9):1226-1234.
253. Andrassy M, Volz HC, Igwe JC, Funke B, Eichberger SN, Kaya Z, et al. High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart. *Circulation* 2008;117(25):3216-3226.
254. Wang Z, Jiang Y, Liu N, Ren L, Zhu Y, An Y, et al. Advanced glycation end-product N-carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes. *Atherosclerosis* 2012;221(2):387-396.
255. Miura J, Yamagishi S, Uchigata Y, Takeuchi M, Yamamoto H, Makita Z, et al. Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation endproducts are correlated to severity of microvascular complications in patients with Type 1 diabetes. *J. Diabetes Complicat.* 2003;17(1):16-21.
256. Genuth S, Sun W, Cleary P, Sell DR, Dahms W, Malone J, et al. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes.* nov 2005;54(11):3103-3111.
257. Salman AG, Mansour DEAA, Swelem A-HA, Al-Zawahary WMA-R, Radwan AA. Pentosidine - a new biochemical marker in diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res.* 2009;42(2):96-98.
258. Sugiyama S, Miyata T, Ueda Y, Tanaka H, Maeda K, Kawashima S, et al. Plasma levels of pentosidine in diabetic patients: an advanced glycation end product. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998;9(9):1681-1688.
259. Ghanem AA, Elewa A, Arafa LF. Pentosidine and N-carboxymethyl-lysine: biomarkers for type 2 diabetic retinopathy. *Eur J Ophthalmol.* 2011;21(1):48-54.
260. Kerkeni M, Saïdi A, Bouzidi H, Yahya SB, Hammami M. Elevated serum levels of AGEs, sRAGE, and Pentosidine in Tunisian patients with severity of Diabetic Retinopathy. *Microvascular research* 2012;84(3):378-83. doi: 10.1016/j.mvr.2012.07.006.
261. Gottsäter A, Szelag B, Kangro M, Wroblewski M, Sundkvist G. Plasma adiponectin and serum advanced glycated end-products increase and plasma lipid concentrations decrease with increasing duration of type 2 diabetes. *Eur. J. Endocrinol.* 2004;151(3):361-366.
262. Ono Y, Aoki S, Ohnishi K, Yasuda T, Kawano K, Tsukada Y. Increased serum levels of advanced glycation end-products and diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1998;41(2):131-137.

263. Kilhovd BK, Juutilainen A, Lehto S, Rönnemaa T, Torjesen PA, Hanssen KF, et al. Increased serum levels of advanced glycation endproducts predict total, cardiovascular and coronary mortality in women with type 2 diabetes: a population-based 18 year follow-up study. *Diabetologia* 2007;50(7):1409-1417.
264. Kilhovd BK, Berg TJ, Birkeland KI, Thorsby P, Hanssen KF. Serum levels of advanced glycation end products are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care* 1999;22(9):1543-1548.
265. Aso Y, Inukai T, Tayama K, Takemura Y. Serum concentrations of advanced glycation endproducts are associated with the development of atherosclerosis as well as diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 2000;37(2):87-92.
266. Lapolla A, Piarulli F, Sartore G, Ceriello A, Ragazzi E, Reitano R, et al. Advanced glycation end products and antioxidant status in type 2 diabetic patients with and without peripheral artery disease. *Diabetes Care* 2007;30(3):670-676.
267. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem. J.* 2003;370(Pt 3):1097-1109.
268. Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ Jr, Chow WS, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat. Med.* 1998;4(9):1025-1031.
269. Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong LL, et al. RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2006;185(1):70-77.
270. Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, et al. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 2002;106(22):2827-2835.
271. Koyama H, Shoji T, Yokoyama H, Motoyama K, Mori K, Fukumoto S, et al. Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25(12):2587-2593.
272. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington P, Hitman G, Neil A, Livingstone S, et al. Total soluble and endogenous secretory receptor for advanced glycation end products as predictive biomarkers of coronary heart disease risk in patients with type 2 diabetes: an analysis from the CARDS trial. *Diabetes* 2011;60(9):2379-2385.
273. Lindsey JB, De Lemos JA, Cipollone F, Ayers CR, Rohatgi A, Morrow DA, et al. Association between circulating soluble receptor for advanced glycation end products and atherosclerosis: observations from the Dallas Heart Study. *Diabetes Care* 2009;32(7):1218-1220.
274. Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Buzzi MP, Belvito C, Cuccia M, et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25(5):1032-1037.
275. Yoon S-J, Park S, Park C, Chang W, Cho D-K, Ko Y-G, et al. Association of soluble receptor for advanced glycation end-product with increasing central aortic stiffness in hypertensive patients. *Coron. Artery Dis.* 2012;23(2):85-90.
276. Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, Kurita-Nakamura Y, Matsui T, Yoshida T, et al. Elevation of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in diabetic subjects with coronary artery disease. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2007;23(5):368-371.

277. Tan KCB, Shiu SWM, Chow WS, Leng L, Bucala R, Betteridge DJ. Association between serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and circulating advanced glycation end products in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006;49(11):2756-2762.
278. Challier M, Jacqueminet S, Benabdesselam O, Grimaldi A, Beaudeau J-L. Increased Serum Concentrations of Soluble Receptor for Advanced Glycation Endproducts in Patients with Type 1 Diabetes. *Clinical Chemistry* 2005;51(9):1749-1750.
279. Rahbar S. Novel inhibitors of glycation and AGE formation. *Cell Biochem. Biophys.* 2007;48(2-3):147-157.
280. Huijberts MS, Wolffenbuttel BH, Boudier HA, Crijns FR, Kruseman AC, Poitevin P, et al. Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 1993;92(3):1407-1411.
281. Freedman BI, Wuerth JP, Cartwright K, Bain RP, Dippe S, Hershon K, et al. Design and baseline characteristics for the aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy (ACTION II). *Control Clin Trials* 1999;20(5):493-510.
282. Vasan S, Foiles PG, Founds HW. Therapeutic potential of AGE inhibitors and breakers of AGE protein cross-links. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10(11):1977-1987.
283. Forbes JM, Soulis T, Thallas V, Panagiotopoulos S, Long DM, Vasan S, et al. Renoprotective effects of a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetologia* 2001;44(1):10-114.
284. Prévost G, Bulckaen H, Gaxatte C, Boulanger E, Béraud G, Creusy C, et al. Structural modifications in the arterial wall during physiological aging and as a result of diabetes mellitus in a mouse model: are the changes comparable? *Diabetes Metab.* 2011;37(2):106-111.
285. Forbes JM, Yee LTL, Thallas V, Lassila M, Candido R, Jandeleit-Dahm KA, et al. Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes* 2004;53(7):1813-1823.
286. Vasan S, Foiles P, Founds H. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003;419(1):89-96.
287. Cooper ME, Thallas V, Forbes J, Scalbert E, Sastra S, Darby I, et al. The cross-link breaker, N-phenacylthiazolium bromide prevents vascular advanced glycation end-product accumulation. *Diabetologia* 2000;43(5):660-664.
288. Forbes JM, Thallas V, Thomas MC, Founds HW, Burns WC, Jerums G, et al. The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. *FASEB J.* 2003;17(12):1762-1764.
289. Feng B, Xu L, Wang H, Yan X, Xue J, Liu F, et al. Atorvastatin exerts its anti-atherosclerotic effects by targeting the receptor for advanced glycation end products. *Biochim. Biophys. Acta* 2011;1812(9):1130-1137.
290. Cuccurullo C, Iezzi A, Fazio ML, De Cesare D, Di Francesco A, Muraro R, et al. Suppression of RAGE as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in type 2 diabetes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(12):2716-2723.
291. Nakamura T, Sato E, Fujiwara N, Kawagoe Y, Takeuchi M, Maeda S, et al. Atorvastatin reduces proteinuria in non-diabetic chronic kidney disease patients partly via lowering serum levels of advanced glycation end products (AGEs). *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3(5):304-307.
292. Ishibashi Y, Yamagishi S-I, Matsui T, Ohta K, Tanoue R, Takeuchi M, et al. Pravastatin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced proximal tubular cell apoptosis and injury by reducing receptor for AGEs (RAGE) level. *Metabolism* 2012;61(8):1067-72. doi: 10.1016/j.metabol.2012.01.006.

293. Ishibashi Y, Matsui T, Takeuchi M, Yamagishi S. Rosuvastatin blocks advanced glycation end products-elicited reduction of macrophage cholesterol efflux by suppressing NADPH oxidase activity via inhibition of geranylgeranylation of Rac-1. *Horm. Metab. Res.* 2011;43(9):619-624.
294. Yoon S-J, Yoon YW, Lee BK, Kwon HM, Hwang K-C, Kim M, et al. Potential role of HMG CoA reductase inhibitor on oxidative stress induced by advanced glycation endproducts in vascular smooth muscle cells of diabetic vasculopathy. *Exp. Mol. Med.* 2009;41(11):802-811.
295. Miyata T, Van Ypersele de Strihou C, Ueda Y, Ichimori K, Inagi R, Onogi H, et al. Angiotensin II receptor antagonists and angiotensin-converting enzyme inhibitors lower in vitro the formation of advanced glycation end products: biochemical mechanisms. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002;13(10):2478-2487.
296. Forbes JM, Cooper ME, Thallas V, Burns WC, Thomas MC, Brammar GC, et al. Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes* 2002;51(11):3274-3282.
297. Forbes JM, Thorpe SR, Thallas-Bonke V, Pete J, Thomas MC, Deemer ER, et al. Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005;16(8):2363-2372.
298. Wang K, Zhou Z, Zhang M, Fan L, Forudi F, Zhou X, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma down-regulates receptor for advanced glycation end products and inhibits smooth muscle cell proliferation in a diabetic and nondiabetic rat carotid artery injury model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006;317(1):37-43.
299. Gbaguidi FG, Chinetti G, Milosavljevic D, Teissier E, Chapman J, Olivecrona G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists decrease lipoprotein lipase secretion and glycated LDL uptake by human macrophages. *FEBS Lett.* 2002;512(1-3):85-90.
300. Voziyan PA, Khalifah RG, Thibaudeau C, Yildiz A, Jacob J, Serianni AS, et al. Modification of proteins in vitro by physiological levels of glucose: pyridoxamine inhibits conversion of Amadori intermediate to advanced glycation end-products through binding of redox metal ions. *J. Biol. Chem.* 2003;278(47):46616-46624.
301. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, et al. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int.* 2002;61(3):939-950.
302. Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, et al. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes* 2002;51(9):2826-2832.
303. Alderson NL, Chachich ME, Frizzell N, Canning P, Metz TO, Januszewski AS, et al. Effect of antioxidants and ACE inhibition on chemical modification of proteins and progression of nephropathy in the streptozotocin diabetic rat. *Diabetologia* 2004;47(8):1385-1395.
304. Goldberg T, Cai W, Peppia M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc.* 2004;104(8):1287-1291.
305. Cai W, He JC, Zhu L, Peppia M, Lu C, Uribarri J, et al. High levels of dietary advanced glycation end products transform low-density lipoprotein into a potent redox-sensitive mitogen-activated protein kinase stimulant in diabetic patients. *Circulation* 2004;110(3):285-291.
306. Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99(24):15596-15601.

307. Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94(12):6474-6479.
308. Uribarri J, Peppia M, Cai W, Goldberg T, Lu M, He C, et al. Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003;14(3):728-731.
309. Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives. *Trends Cardiovasc. Med.* 2007;17(8):275-283.
310. Chang L-C, Huang K-C, Wu Y-W, Kao H-L, Chen C-L, Lai L-P, et al. The clinical implications of blood adiponectin in cardiometabolic disorders. *J. Formos. Med. Assoc.* 2009;108(5):353-366.
311. Shimada K, Miyazaki T, Daida H. Adiponectin and atherosclerotic disease. *Clin. Chim. Acta.* 2004;344(1-2):1-12.
312. Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24(1):29-33.
313. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, et al. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ. J.* 2004;68(11):975-981.
314. Okamoto Y. Adiponectin provides cardiovascular protection in metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2011;2011:313179.
315. Von Eynatten M, Hamann A, Twardella D, Nawroth PP, Brenner H, Rothenbacher D. Relationship of adiponectin with markers of systemic inflammation, atherogenic dyslipidemia, and heart failure in patients with coronary heart disease. *Clin. Chem.* 2006;52(5):853-859.
316. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002;360(9326):57-58.
317. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2002;106(22):2767-2770.
318. Kato H, Kashiwagi H, Shiraga M, Tadokoro S, Kamae T, Ujiie H, et al. Adiponectin acts as an endogenous antithrombotic factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(1):224-230.
319. Shibata R, Ouchi N, Kihara S, Sato K, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 2004;279(27):28670-28674.
320. George J, Patal S, Wexler D, Sharabi Y, Peleg E, Kamari Y, et al. Circulating adiponectin concentrations in patients with congestive heart failure. *Heart* 2006;92(10):1420-1424.
321. Menon V, Li L, Wang X, Greene T, Balakrishnan V, Madero M, et al. Adiponectin and mortality in patients with chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006;17(9):2599-2606.
322. Kistorp C, Faber J, Galatius S, Gustafsson F, Frystyk J, Flyvbjerg A, et al. Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2005;112(12):1756-1762.
323. Dekker JM, Funahashi T, Nijpels G, Pilz S, Stehouwer CDA, Snijder MB, et al. Prognostic value of adiponectin for cardiovascular disease and mortality. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008;93(4):1489-1496.
324. Maiolino G, Cesari M, Sticchi D, Zanchetta M, Pedon L, Antezza K, et al. Plasma adiponectin for prediction of cardiovascular events and mortality in high-risk patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008;93(9):3333-3340.
325. Wannamethee SG, Whincup PH, Lennon L, Sattar N. Circulating adiponectin levels and mortality in elderly men with and without cardiovascular disease and heart failure. *Arch. Intern. Med.* 2007;167(14):1510-1517.

326. Otsuka F, Sugiyama S, Kojima S, Maruyoshi H, Funahashi T, Sakamoto T, et al. Hypoadiponectinemia is associated with impaired glucose tolerance and coronary artery disease in non-diabetic men. *Circ. J.* 2007;71(11):1703-1709.
327. Schulze MB, Shai I, Rimm EB, Li T, Rifai N, Hu FB. Adiponectin and future coronary heart disease events among men with type 2 diabetes. *Diabetes* 2005;54(2):534-539.
328. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23(1):85-89.
329. Rothenbacher D, Brenner H, März W, Koenig W. Adiponectin, risk of coronary heart disease and correlations with cardiovascular risk markers. *Eur. Heart J.* 2005;26(16):1640-1646.
330. Hashimoto N, Kanda J, Nakamura T, Horie A, Kurosawa H, Hashimoto T, et al. Association of hypoadiponectinemia in men with early onset of coronary heart disease and multiple coronary artery stenoses. *Metab. Clin. Exp.* 2006;55(12):1653-1657.
331. Lawlor DA, Davey Smith G, Ebrahim S, Thompson C, Sattar N. Plasma adiponectin levels are associated with insulin resistance, but do not predict future risk of coronary heart disease in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90(10):5677-5683.
332. Laughlin GA, Barrett-Connor E, May S, Langenberg C. Association of adiponectin with coronary heart disease and mortality: the Rancho Bernardo study. *Am. J. Epidemiol.* 2007;165(2):164-174.
333. Sattar N, Wannamethee G, Sarwar N, Tchernova J, Cherry L, Wallace AM, et al. Adiponectin and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Circulation* 2006;114(7):623-629.
334. Dieplinger B, Haltmayer M, Poelz W, Mueller T. Value of adiponectin as predictor of 5-year all-cause mortality in patients with symptomatic peripheral arterial disease: results from the Linz Peripheral Arterial Disease (LIPAD) study. *Clin. Chim. Acta.* 2009;408(1-2):87-91.
335. Sattar N, Nelson SM. Adiponectin, diabetes, and coronary heart disease in older persons: unraveling the paradox. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008;93(9):3299-3301.
336. Teoh H, Strauss MH, Szmitko PE, Verma S. Adiponectin and myocardial infarction: A paradox or a paradigm? *Eur. Heart J.* 2006;27(19):2266-2268.
337. Singer JR, Palmas W, Teresi J, Weinstock R, Shea S, Luchsinger JA. Adiponectin and all-cause mortality in elderly people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2012;35(9):1858-1863.
338. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, et al. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation.* 11 2003;107(5):671-674.
339. Engeli S, Feldpausch M, Gorzelnik K, Hartwig F, Heintze U, Janke J, et al. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes* 2003;52(4):942-947.
340. Gaens K, Niessen P.M.G., van Greevenbroek M.M.J., van der Kallen C.J.H., Niessen H.W.M., Rensen S.S., Buurman W.A., Greve J.M., Goossens G.H., Blaak E.E., van Zandvoort M.A.M., Bierhaus A., Stehouwer C.D.A., Schalkwijk C.G. N-(Carboxymethyl)lysine-RAGE axis: a novel link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Diabetologia* 2012; 55: suppl1 S31. 2012;
341. Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M, Mueller T. Hypoadiponectinemia is associated with symptomatic atherosclerotic peripheral arterial disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2006;44(7):830-833.
342. Lim P-S, Hu C-Y, Wu M-Y, Wu T-K, Chang H-C. Plasma adiponectin is associated with ankle-brachial index in patients on haemodialysis. *Nephrology* 2007;12(6):546-552.
343. Gherman CD, Mironiuc AI. Evaluation of serum adipokines in peripheral arterial occlusive disease. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:257808.

344. Ho DY, Cook NR, Britton KA, Kim E, Creager MA, Ridker PM, et al. High-molecular-weight and total adiponectin levels and incident symptomatic peripheral artery disease in women: a prospective investigation. *Circulation* 2011;124(21):2303-2311.
345. Berger JS, Ballantyne CM, Davidson MH, Johnson JL, Tarka EA, Lawrence D, et al. Peripheral artery disease, biomarkers, and darapladib. *Am. Heart J.* 2011;161(5):972-978.
346. Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M, Mueller T. Association of adiponectin and amino terminal proBNP in peripheral arterial disease. *Clin. Chim. Acta* 2007;377(1-2):192-197.
347. Owens CD, Kim JM, Hevelone ND, Hamdan A, Raffetto JD, Creager MA, et al. Novel adipokines, high molecular weight adiponectin and resistin, are associated with outcomes following lower extremity revascularization with autogenous vein. *J. Vasc. Surg.* 2010;51(5):1152-1159.
348. Komai H, Shibata R, Juri M, Matsushita K, Ouchi N, Murohara T. Plasma adiponectin as a predictive factor of survival after a bypass operation for peripheral arterial disease. *J. Vasc. Surg.* 2009;50(1):95-99.
349. Wang Q-P, Yang L, Li X-P, Xie H, Liao E-Y, Wang M, et al. Effects of 17 β -estradiol on adiponectin regulation of the expression of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. *Bone* 2012 Sep;51(3):515-23. doi: 10.1016/j.bone.2012.05.011.
350. Luo X-H, Guo L-J, Xie H, Yuan L-Q, Wu X-P, Zhou H-D, et al. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J. Bone Miner. Res.* 2006;21(10):1648-1656.
351. Yamaguchi N, Kukita T, Li Y-J, Kamio N, Fukumoto S, Nonaka K, et al. Adiponectin inhibits induction of TNF- α /RANKL-stimulated NFATc1 via the AMPK signaling. *FEBS Lett.* 2008;582(3):451-456.
352. Yamaguchi N, Kukita T, Li Y-J, Martinez Argueta JG, Saito T, Hanazawa S, et al. Adiponectin inhibits osteoclast formation stimulated by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007;49(1):28-34.
353. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M Jr, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1990;15(4):827-832.
354. Shaw LJ, Raggi P, Schisterman E, Berman DS, Callister TQ. Prognostic value of cardiac risk factors and coronary artery calcium screening for all-cause mortality. *Radiology* 2003;228(3):826-833.
355. Jaisson S, Gillery P. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. *Clin. Chem.* 2010;56(9):1401-1412.
356. Schröder F, Diehm N, Kareem S, Ames M, Pira A, Zwettler U, et al. A modified calculation of ankle-brachial pressure index is far more sensitive in the detection of peripheral arterial disease. *J. Vasc. Surg.* 2006;44(3):531-536.
357. Williams DT, Harding KG, Price P. An evaluation of the efficacy of methods used in screening for lower-limb arterial disease in diabetes. *Diabetes Care.* 2005;28(9):2206-2210.
358. Potier L, Halbron M, Bouilloud F, Dadon M, Le Doeuff J, Ha Van G, et al. Ankle-to-brachial ratio index underestimates the prevalence of peripheral occlusive disease in diabetic patients at high risk for arterial disease. *Diabetes Care* 2009;32(4):e44.
359. Young MJ, Boulton AJ, MacLeod AF, Williams DR, Sonksen PH. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia* 1993;36(2):150-154.
360. Feldman EL, Stevens MJ, Thomas PK, Brown MB, Canal N, Greene DA. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1994;17(11):1281-1289.

361. Boulton A J M. Management of Diabetic Peripheral Neuropathy. *Clinical Diabetes* 2005;23(1).
362. Abbott CA, Carrington AL, Ashe H, Bath S, Every LC, Griffiths J, et al. The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort. *Diabet. Med.* 2002;19(5):377-384.
363. Papanas N, Giassakis G, Papatheodorou K, Papazoglou D, Monastiriotes C, Christakidis D, et al. Sensitivity and specificity of a new indicator test (Neuropad) for the diagnosis of peripheral neuropathy in type 2 diabetes patients: a comparison with clinical examination and nerve conduction study. *J. Diabetes Complicat.* 2007;21(6):353-358.
364. Quattrini C, Jeziorska M, Tavakoli M, Begum P, Boulton AJM, Malik RA. The Neuropad test: a visual indicator test for human diabetic neuropathy. *Diabetologia* 2008;51(6):1046-1050.
365. Spallone V, Morganti R, Siamplici M, Fedele T, D'Amato C, Cacciotti L, et al. Neuropad as a diagnostic tool for diabetic autonomic and sensorimotor neuropathy. *Diabet. Med.* 2009;26(7):686-692.
366. Tentolouris N, Kokkinos A, Diakoumopoulou E, Eleftheriadou I, Alexiadou K. The association between Neuropad testing with peripheral neuropathy in diabetes: a meta-analysis. *Diabetologia* 2011; 54: A1154.
367. Papanas N, Paschos P, Papazoglou D, Papatheodorou K, Paletas K, Maltezos E, et al. Accuracy of the Neuropad test for the diagnosis of distal symmetric polyneuropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011;34(6):1378-1382.
368. Ziegler D, Papanas N, Roden M. Neuropad: evaluation of three cut-off points of sudomotor dysfunction for early detection of polyneuropathy in recently diagnosed diabetes. *Diabet. Med.* 2011;28(11):1412-1415.
369. Tentolouris N, Achtsidis V, Marinou K, Katsilambros N. Evaluation of the self-administered indicator plaster neuropad for the diagnosis of neuropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2008;31(2):236-237.
370. Papanas N, Papatheodorou K, Papazoglou D, Christakidis D, Monastiriotes C, Maltezos E. Reproducibility of the new indicator test for sudomotor function (Neuropad) in patients with type 2 diabetes mellitus: short communication. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2005;113(10):577-581.
371. Papanas N, Papatheodorou K, Papazoglou D, Kotsiou S, Maltezos E. A prospective study on the use of the indicator test Neuropad® for the early diagnosis of peripheral neuropathy in type 2 diabetes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2011;119(2):122-125.
372. Papanas N, Papatheodorou K, Papazoglou D, Christakidis D, Monastiriotes C, Maltezos E. The new indicator test (Neuropad): a valuable diagnostic tool for small-fiber impairment in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Educ.* 2007;33(2):257-258, 260, 262 passim.
373. Papanas N, Papatheodorou K, Christakidis D, Papazoglou D, Giassakis G, Piperidou H, et al. Evaluation of a new indicator test for sudomotor function (Neuropad) in the diagnosis of peripheral neuropathy in type 2 diabetic patients. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2005;113(4):195-198.
374. Ewing DJ, Clarke BF. Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy. *BMJ* 1982;285(6346):916-918.
375. Faglia E, Favales F, Quarantiello A, Calia P, Clelia P, Brambilla G, et al. Angiographic evaluation of peripheral arterial occlusive disease and its role as a prognostic determinant for major amputation in diabetic subjects with foot ulcers. *Diabetes Care* 1998;21(4):625-630.
376. Nakamura T, Kawachi K, Saito Y, Saito T, Morishita K, Hoshino J, et al. Effects of ARB or ACE-inhibitor administration on plasma levels of aldosterone and adiponectin in hypertension. *Int Heart J.* 2009;50(4):501-512.

377. Tian F, Luo R, Zhao Z, Wu Y, Ban D. Blockade of the RAS increases plasma adiponectin in subjects with metabolic syndrome and enhances differentiation and adiponectin expression of human preadipocytes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2010;118(4):258-265.
378. Buldak L, Dulawa-Buldak A, Labuzek K, Okopien B. Effects of 90-day hypolipidemic treatment on insulin resistance, adipokines and proinflammatory cytokines in patients with mixed hyperlipidemia and impaired fasting glucose. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2012;50(11):805-813.
379. Nezu U, Tsunoda S, Yoshimura H, Kuwabara T, Tomura S, Seki Y, et al. Pravastatin potentiates increases in serum adiponectin concentration in dyslipidemic patients receiving thiazolidinedione: the DOLPHIN study. *J. Atheroscler. Thromb.* 2010;17(10):1063-1069.
380. Takeda T, Hoshida S, Nishino M, Tanouchi J, Otsu K, Hori M. Relationship between effects of statins, aspirin and angiotensin II modulators on high-sensitive C-reactive protein levels. *Atherosclerosis* 2003;169(1):155-158.
381. Thongtang N, Ai M, Otokoza S, Himbergen TV, Asztalos BF, Nakajima K, et al. Effects of maximal atorvastatin and rosuvastatin treatment on markers of glucose homeostasis and inflammation. *Am. J. Cardiol.* 2011;107(3):387-392.
382. Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA* 2001;286(1):64-70.
383. Ix JH, Biggs ML, Kizer JR, Mukamal KJ, Djousse L, Zieman SJ, et al. Association of body mass index with peripheral arterial disease in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Am. J. Epidemiol.* 2011;174(9):1036-1043.
384. Ylitalo KR, Sowers M, Heeringa S. Peripheral vascular disease and peripheral neuropathy in individuals with cardiometabolic clustering and obesity: National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2004. *Diabetes Care* 2011;34(7):1642-1647.
385. Saremi A, Bahn G, Reaven PD. Progression of Vascular Calcification Is Increased With Statin Use in the Veterans Affairs Diabetes Trial (VADT). *Diabetes Care* 2012;35(11):2390-2392.
386. Kim ES, Moon S, Kim H-S, Lim DJ, Cho JH, Kwon HS, et al. Diabetic peripheral neuropathy is associated with increased arterial stiffness without changes in carotid intima-media thickness in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011;34(6):1403-1405.
387. Goebel FD, Füessl HS. Mönckeberg's sclerosis after sympathetic denervation in diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia* 1983;24(5):347-350.
388. Shun C-T, Chang Y-C, Wu H-P, Hsieh S-C, Lin W-M, Lin Y-H, et al. Skin denervation in type 2 diabetes: correlations with diabetic duration and functional impairments. *Brain* 2004;127(Pt 7):1593-1605.
389. Boulton AJ. The pathogenesis of diabetic foot problems: an overview. *Diabet. Med.* 1996;13 Suppl 1:S12-16.
390. Aubert CE, Le Doeuff J, Lajou J, Barthelemy O, Hartemann A, Bourron O. Influence of peripheral arterial occlusive disease on the Neuropad® test performance in patients with diabetes. *Diabet. Med.* 2013;doi: 10.1111/dme.12150.
391. Spallone V, Ziegler D, Freeman R, Bernardi L, Frontoni S, Pop-Busui R, et al. Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2011 22. doi: 10.1002/dmrr.1239.
392. Lanier JB, Mote MB, Clay EC. Evaluation and management of orthostatic hypotension. *Am Fam Physician* 2011;84(5):527-536.
393. Cheng Y-C, Vyas A, Hymen E, Perlmutter LC. Gender differences in orthostatic hypotension. *Am. J. Med. Sci.* 2011;342(3):221-225.

G) Troisième partie : études ancillaires au protocole DIACART

1. Résumé des articles et contribution scientifique

L'étude DIACART a donné lieu à trois études ancillaires. J'ai effectué moi-même les analyses statistiques et rédigé les trois articles correspondants qui ont été relus par le Professeur Agnès Hartemann et le Docteur Olivier Bourron.

Le premier article, « *Influence of peripheral arterial occlusive disease on the Neuropad® test performance in patients with diabetes* », a été accepté le 3.02.2013 par Diabetic Medicine et paraîtra en mai 2013 dans la version online de ce journal peer-reviewed. Dans cet article, nous étudions la performance du Neuropad® chez les patients avec et sans AOMI, et montrons que ce test est tout aussi fiable en présence ou en absence d'AOMI. En effet, malgré l'association de l'AOMI à la sécheresse cutanée, nous ne mettons pas en évidence une fréquence accrue de tests faussement positifs chez les patients avec AOMI. Nous suggérons donc l'utilisation du Neuropad® également en présence d'AOMI qui ne devrait, dès lors, plus représenter une contre-indication à son utilisation. J'ai présenté ce sujet oralement au congrès annuel de la SSED (Berne, 23.11.2013), et il fera l'objet d'un poster au congrès de la Société Francophone du Diabète (SFD, Montpellier, 26-29.03.2013).

Dans le deuxième article, « *Relationship between peripheral vascular calcification and accuracy of pulse palpation and ankle brachial index as screening methods for peripheral arterial occlusive disease in patients with diabetes* », soumis à Diabetic Medicine le 04.03.2013, nous montrons, de manière nouvelle et objective grâce à la mesure du SCIP, que la calcification artérielle est fortement liée aux résultats faussement négatifs de l'ABI et de la palpation des pouls pour dépister l'AOMI. Ce sujet a également fait l'objet d'une communication orale au congrès annuel de la SSED (Berne, 23.11.2013), et sera proposé pour une présentation au congrès de l'European Association for the Study of Diabetes (EASD, Barcelone, 23-27.09.2013).

Dans le troisième article, « *Association of circulating advanced glycation end products and soluble receptor for advanced glycation end products with peripheral neuropathy in type 2 diabetes* », soumis à Acta Diabetologica le 07.03.2013, nous étudions pour la première fois la relation de la neuropathie périphérique aussi bien avec les AGEs qu'avec le sRAGE, et mettons en évidence une association positive indépendante ; cela suggère un rôle important de la voie de la glycation dans la physiopathologie de la neuropathie périphérique diabétique. Ce sujet a par ailleurs été accepté parmi les six meilleurs résumés pour une communication orale à la 81^{ème} Assemblée annuelle de la Société Suisse de Médecine Interne Générale ; il sera de plus proposé pour une présentation au congrès 2013 de l'EASD.

Research: Complications

Influence of peripheral arterial occlusive disease on the Neuropad® test performance in patients with diabetes

C. E. Aubert¹, J. Le Doeuff², J. Lajou³, O. Barthelemy⁴, A. Hartemann^{1,5} and O. Bourron^{1,5}

¹Diabetes and Metabolic Diseases Department, ²Vascular Surgery Department, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, ³Private Angiology Practice, ⁴Cardiology Department, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital and ⁵University Pierre and Marie Curie Paris, France

Accepted 5 February 2013

Abstract

Aims The specificity of the Neuropad® test to screen for peripheral neuropathy is moderate, but this test has several advantages, such as self-use, educative value and good sensitivity. Use of the Neuropad is usually contra-indicated in the presence of peripheral arterial occlusive disease, a condition associated with skin dryness. The aim of this study was to assess the influence of peripheral arterial occlusive disease on the performance of the Neuropad for screening peripheral neuropathy, and to compare it with the monofilament test.

Methods We included 200 patients with diabetes. Peripheral neuropathy was defined by a neuropathy disability score ≥ 6 . The Neuropad was determined as normal or abnormal at 10 and 20 min, respectively, and its performance was compared in patients with and without peripheral arterial occlusive disease diagnosed by colour duplex ultrasonography. The performances of the Neuropad and of the monofilament test were compared.

Results Prevalences of peripheral neuropathy and of peripheral arterial occlusive disease were 15.8 and 44%, respectively. At 10 min, sensitivity and negative predictive value were high (93.8 and 95.1%), while specificity and positive predictive value were poor (23.2 and 18.9%). The Neuropad performance was not significantly different between patients with and without arteriopathy. Between 10 and 20 min, there was significant loss of sensitivity and gain in specificity. The Neuropad at 10 min was more sensitive but less specific than the monofilament test.

Conclusions The reliability of the Neuropad is not significantly different in the presence or absence of peripheral arterial occlusive disease.

Diabet. Med. 00, 1–7 (2013)

Introduction

Peripheral neuropathy is the first risk factor for foot ulceration [1–3]. Distal symmetrical sensory loss, its most common form, begins insidiously, is asymptomatic in up to 50% of cases and may already be present at the time of diagnosis in about 10% of people with Type 2 diabetes [4].

Peripheral arterial occlusive disease, the first risk factor for major lower-limb amputation in diabetes [5], is often associated with peripheral neuropathy [6]. While the presence of peripheral neuropathy defines a grade 1 risk for foot ulceration, the concomitant presence of peripheral arterial occlusive disease defines a higher risk profile (grade 2) [7]. Peripheral neuropathy screening is therefore particularly important in patients with peripheral arterial occlusive disease; it is clinically relevant, as educative, preventive and therapeutic measures depend on the grade of risk for foot ulceration;

moreover, primary prevention may reduce the prevalence of diabetic foot ulceration by 50% [8]. Rigorous evaluation of peripheral neuropathy relies on clinical tests, ideally assessing all nerve functions, including sudomotor, which, moreover, has been associated with foot ulceration [9,10]. However, this evaluation is time-consuming and thus, unfortunately, often put aside by clinicians [11,12].

The Neuropad® (Trigocare International GmbH, Wiehl-Drabenderhöhe, Germany) is an adhesive patch assessing plantar sweat production—hence cholinergic foot innervation—by a chemical reaction manifested by a colour change. It has been associated with severity of peripheral neuropathy [13,14] and a meta-analysis confirmed its high sensitivity (85%) and negative predictive value (86%), but moderate specificity (56%) and positive predictive value (50%) for screening for peripheral neuropathy [15]. Reproducibility of the test and agreement between patients and healthcare professionals for its interpretation are very good (98 and 90%, respectively), making the Neuropad suitable for self-examination [16–18].

Correspondence to: Carole Elodie Aubert. E-mail: caroleaubert@bluewin.ch

This test could allow an early diagnosis of peripheral neuropathy [13,19] and its visual nature may have an educative value [20,21]. Finally, it has been independently associated with foot ulceration in a cross-sectional study [22] and, if confirmed by prospective data, could perhaps be used to predict diabetic foot disease.

However, the performance of the Neuropad has so far not been analysed in the presence or absence of peripheral arterial occlusive disease, a condition associated with skin dryness that could produce false positive tests [23]. Patients with peripheral arterial occlusive disease have thus often been excluded from previous studies. A single study found a similar Neuropad response in patients with neuropathic or neuroischaemic ulcers, but without distinguishing its performance in patients with or without uncomplicated peripheral arterial occlusive disease [22].

The Neuropad has so far been compared with many tests, but hardly ever with the monofilament test, although the latter is currently used in clinical practice, predicts diabetic foot disease and defines the risk for chronic ulceration [8,24].

The novelty of our study was to compare Neuropad reliability in both the presence and absence of peripheral arterial occlusive disease. We also compared the Neuropad with the monofilament test for peripheral neuropathy screening.

Patients and methods

Patients

This was a cross-sectional ancillary study to the DIACART ('Diabète et Calcification ARTérielle') study (data not yet published), which aimed at studying the physiopathology of peripheral arterial occlusive disease in a population with diabetes and high risk for cardiovascular disease. Over 8 months, 200 people with diabetes (98% with Type 2 diabetes) from the Diabetes and Cardiology Departments of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France) were included in the study. In the DIACART study, inclusion criteria were: (1) diabetes with coronary artery disease and/or (2) diabetes with peripheral arterial occlusive disease and/or (3) Type 2 diabetes with age > 50 years for men and > 60 years for women. Exclusion criteria were: (1) an estimated glomerular filtration rate (eGFR) by the modification of diet in renal disease equation < 30 ml/min and/or (2) a history of infra-popliteal angioplasty and/or bypass. The study was approved by the local ethics committee and all patients gave written informed consent.

Methods

History, medication and anthropometric data were collected, as well as blood and urine samples after an overnight fast for assessment of routine biochemical variables.

Assessment of peripheral neuropathy

Peripheral neuropathy was clinically evaluated by the same physician, blinded to the results of colour duplex ultrasonography. The neuropathy disability score was performed as previously described [4]; temperature perception was tested with tubes of cold and warm water, pallesthesia with a tuning fork at 128 Hz at the top of the big toes, and pinprick with a toothpick (for pain) and a cotton bud (for a light touch). The Semmes–Weinstein 10-g monofilament [25] was applied three times randomly on the following plantar sites of each foot: pulp of hallux, heel, and first and fifth metatarsal heads; inability to perceive the monofilament at any site was defined as abnormal.

Assessment of sudomotor function

The Neuropad was carried out, as previously described [21], at constant room temperature (20–25 °C) and at least 10 min after patients had taken off their socks and shoes. The patch was applied between the first and second metatarsal heads on the sole of each foot, avoiding areas of hyperkeratosis. Neuropad colour change was assessed at 10 and 20 min. It was considered normal when colour completely turned from blue to pink on both feet and abnormal in the presence of any incomplete (patchy) or absent colour change.

Assessment of peripheral arterial occlusive disease

Colour duplex ultrasonography, performed by experienced angiologists blinded to clinical examination, was used to diagnose peripheral arterial occlusive disease, which was defined as the presence of at least one > 70% stenosis or occlusion on any artery studied (aorto-ilio-femoral segment, popliteal artery, tibio-peroneal trunk, and anterior tibial, posterior tibial, peroneal and dorsalis pedis arteries) [26]. Ankle brachial index was performed, but not used to define peripheral arterial occlusive disease because vascular calcification, which is more frequent in diabetes, may falsely increase its value, with the consecutive risk of underestimating peripheral arterial occlusive disease prevalence [27].

Statistical analysis

Data were assessed for normal distribution using the Shapiro–Wilk test. Continuous variables were described as median (minimum–maximum) and categorical variables as frequency (percentage).

Contingency tables were built to calculate sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the Neuropad. For this purpose, a neuropathy disability score ≥ 6 was used as the reference test for peripheral neuropathy. Analysis was computed for the whole population and after having divided the patients into two

subgroups relevant to the presence of peripheral arterial occlusive disease.

Data were compared using the Mann–Whitney *U*-test for continuous variables and the χ^2 -square, Fisher's exact or McNemar tests for proportions, as appropriate.

A *P*-value < 0.05 (two-sided) was considered statistically significant. Data were analysed using JMP 10 (SAS Institute, Cary, NC, USA) and GraphPad 2012 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) softwares for Windows.

Results

Peripheral arterial occlusive disease prevalence was 44% (*n* = 88). Peripheral neuropathy prevalence (neuropathy disability score ≥ 6) was 15.8% (*n* = 31).

Table 1 compares demographic, clinical and biological characteristics of the population according to the presence or absence of peripheral arterial occlusive disease. Patients with peripheral arterial occlusive disease were older, had a longer history of diabetes and presented more complications related to diabetes: retinopathy, history of foot ulceration, coronary artery disease, urinary albumin:creatinine ratio > 3 mg/mmol (*P* < 0.05 for all). A neuropathy disability score ≥ 6 , an abnormal pinprick test and an abnormal monofilament test were significantly more frequent in the subgroup with peripheral arterial occlusive disease, compared with the subgroup without (*P* = 0.0008, *P* = 0.0001 and *P* = 0.03,

respectively). Conversely, the Neuropad result at 10 or 20 min and the frequency of abnormal temperature perception or pallesthesia were not different between the two subgroups.

Performance of the Neuropad and of the monofilament test in patients with and without peripheral arterial occlusive disease

Table 2 presents and compares the performance of the Neuropad and of the monofilament test in the whole population and in the subgroups with and without peripheral arterial occlusive disease, respectively.

Neuropad performance at 10 min

At 10 min, sensitivity was high and similar for the patients with and without peripheral arterial occlusive disease (respectively, 91.3 and 100%, *P* = 1.00); negative predictive value was also high and similar in both subgroups. Specificity was low and similar in both subgroups, while positive predictive value was low but significantly higher in the patients with peripheral arterial occlusive disease than in those without (respectively, 28.8 and 10.5%, *P* = 0.003).

Neuropad performance at 20 min

At 20 min, positive predictive value was significantly higher in the patients with peripheral arterial occlusive disease than

Table 1 Characteristics of the population and comparison between patients with and without peripheral arterial occlusive disease

Variable	Peripheral arterial occlusive disease (<i>n</i> = 88, 44%)	No peripheral arterial occlusive disease (<i>n</i> = 102, 56%)	<i>P</i> -value
Age (years)	66 (46–85)	63 (43–80)	0.02
Men, <i>n</i> (%)	72 (81.8)	88 (78.6)	0.60
Type 2 diabetes, <i>n</i> (%)	85 (96.6)	111 (99.1)	0.32
Diabetes duration (years)	16 (1–67)	12 (0–48)	0.04
Retinopathy, <i>n</i> (%)	21 (23.8)	11 (9.8)	0.01
History of foot ulceration, <i>n</i> (%)	10 (11.4)	2 (1.8)	0.006
Coronary artery disease, <i>n</i> (%)	76 (86.4)	76 (67.9)	0.003
Smoking history, <i>n</i> (%)	55 (62.5)	65 (58.0)	0.53
Body mass index (kg/m ²)	28.1 (17.1–48.8)	28.5 (19.9–47.3)	0.31
Neuropathy disability score ≥ 6 , <i>n</i> (%)	23 (26.1)	9 (8.0)	0.0008
Temperature perception abnormal, <i>n</i> (%)	35 (39.8)	26 (23.2)	0.01
Pallesthesia abnormal, <i>n</i> (%)	10 (11.4)	39 (8.0)	0.47
Pinprick test abnormal, <i>n</i> (%)	47 (53.4)	30 (26.8)	0.0001
Monofilament test abnormal, <i>n</i> (%)	20 (22.7)	12 (10.7)	0.03
Neuropad 10 min abnormal, <i>n</i> (%)	73 (83)	86 (76.8)	0.30
Neuropad 20 min abnormal, <i>n</i> (%)	42 (47.7)	51 (45.5)	0.78
Urinary albumin:creatinine ratio > 3 mg/mmol, <i>n</i> (%)	38 (43.2)	32 (28.6)	0.04
eGFR (ml/min)	73.5 (33–153)	77 (35–133)	0.18
HbA _{1c} (mmol/mol)	60 (39–123)	58 (27–119)	0.39
(%)	7.6 (5.7–13.4)	7.5 (4.6–13)	
Total cholesterol (mmol/l)	3.55 (2.02–7.23)	3.72 (2.05–7.07)	0.11
LDL cholesterol (mmol/l)	1.78 (0.77–5.05)	1.83 (0.78–4.43)	0.23
HDL cholesterol (mmol/l)	1.11 (0.41–2.05)	0.98 (0.31–2.38)	0.17
Triglycerides (mmol/l)	1.18 (0.41–6.71)	1.32 (0.46–7.82)	0.06

Data are shown as median (minimum–maximum) or *n* (%).

P-values shown are for comparisons between patients with and without peripheral arterial occlusive disease.

eGFR, estimated glomerular filtration rate.

Table 2 Performance of the monofilament test and of the Neuropad at 10 and 20 min according to a neuropathy disability score ≥ 6 as reference test, in all the patients and in the subgroups with and without peripheral arterial occlusive disease

	All ($n = 200$)	Peripheral arterial occlusive disease ($n = 88$)	No peripheral arterial occlusive disease ($n = 112$)	P-value
Neuropad at 10 min				
Sensitivity	93.8*†	91.3	100.0	1.00
Specificity	23.2*‡	20.0*‡	25.2*‡	0.46
Positive predictive value	18.9	28.8	10.5	0.003
Negative predictive value	95.1	86.7	100.0	0.13
Neuropad at 20 min				
Sensitivity	68.8*	73.9	55.6	0.41
Specificity	57.7*	61.5*§	55.3*¶	0.52
Positive predictive value	23.7	40.5	9.8	0.001
Negative predictive value	90.7	87.0	93.4	0.32
Monofilament test				
Sensitivity	68.8†	65.2	77.8	0.68
Specificity	94.1‡	92.3*§	95.2*¶	0.51
Positive predictive value	68.8	75.0	58.3	0.44
Negative predictive value	94.1	88.2	98.0	0.02

P-values shown are for comparisons between patients with and without peripheral arterial occlusive disease.

Comparison between the Neuropad at 10 and 20 min: * $P < 0.0001$.

Comparison between the Neuropad at 10 min and the monofilament test: † $P < 0.04$ and ‡ $P < 0.0001$.

Comparison between the Neuropad at 20 min and the monofilament test: § $P < 0.0001$ and ¶ $P < 0.01$.

without (respectively, 40.5 and 9.8%, $P = 0.001$). Sensitivity and specificity seemed higher, and negative predictive value lower in the subgroup with peripheral arterial occlusive disease than without, but differences were not statistically significant.

Performance of the monofilament test

Sensitivity and positive predictive value were low and similar in the patients with and without peripheral arterial occlusive disease. Specificity was high and similar in both subgroups (respectively, 92.3 and 95.2%, $P = 0.51$), while negative predictive value was significantly higher in the patients with peripheral arterial occlusive disease than without (respectively, 98.0 and 88.2%, $P = 0.02$).

Differences of Neuropad performance between 10 and 20 min

At 20 min, specificity was significantly higher than at 10 min in all subgroups ($P < 0.0001$ for all). Conversely, sensitivity was lower at 20 min than at 10 min, with a significant difference only in the whole population ($P < 0.0001$).

Comparison of performance of the monofilament test and of the Neuropad at 10 min

The Neuropad at 10 min was more sensitive than the monofilament test (respectively, 93.8 and 68.8%, $P < 0.04$), but the difference was not significant in the subgroups with or without peripheral arterial occlusive disease. Conversely, the Neuropad at 10 min was less specific than the monofilament test in all groups (respectively, 20.0–25.2% and 92.3–95.2%, $P < 0.0001$).

Comparison of performance of the monofilament test and of the Neuropad at 20 min

Sensitivity of the Neuropad at 20 min and of the monofilament test was similar, while the monofilament test was more specific (difference significant in the subgroups with or without peripheral arterial occlusive disease but not in the whole population).

Concordance between the Neuropad at 10 min and the monofilament test

Table 3 presents the number and percentage of concordant and discordant results between the Neuropad at 10 min and the monofilament test. Results were concordant in 69 (34.5%) patients. Two (1.0%) patients had a normal Neuropad at 10 min with an abnormal monofilament test, while 129 (64.5%) had an abnormal Neuropad at 10 min with a normal monofilament test. Among the patients with a

Table 3 Concordance between the Neuropad at 10 min and the monofilament test

$n = 200$	Abnormal monofilament test	Normal monofilament test
Abnormal Neuropad at 10 min	30 (15), *18.9%	129 (64.5), *81.3%
Normal Neuropad at 10 min	2 (1.0), *4.9%	39 (19.5), *95.1%

Data are n (% of all), * are % of lines.

Concordant results: 69 (34.5%).

Discordant results: 139 (65.5%).

normal Neuropad at 10 min, the result was concordant with the monofilament test in 39 (95.1%) patients.

Discussion

In this study, we assessed the reliability of the Neuropad in the presence or absence of peripheral arterial occlusive disease and compared it with the performance of the monofilament test for screening peripheral neuropathy.

We found high sensitivity and negative predictive value of the Neuropad at 10 min, in concordance with previous studies [13,14,20,21,28–32]. Although sensitivity and negative predictive value seemed slightly higher in the subgroup with peripheral arterial occlusive disease than without, differences were not significant. This suggests that high sensitivity and negative predictive value of the Neuropad are not influenced by peripheral arterial occlusive disease. These findings are coherent, as skin dryness would slow down colour change and would therefore rather increase sensitivity and decrease specificity.

Conversely, specificity was very poor at 10 min (20.0–25.2%); previous studies also found lower specificity than sensitivity at 10 min, but obtained higher specificity than we did (ranges 32–78%) [13,14,20,21,28–32]. Positive predictive value seemed also generally poorer in our study than in previous works [13,14,20,21,28–32]; unlike specificity, it was significantly higher in subjects with peripheral arterial occlusive disease than without, which may be explained by the higher prevalence of peripheral neuropathy among these patients.

Discrepancies between our results and previous studies may come from differences in the tests chosen as reference for peripheral neuropathy. However, these may also be explained by the risk profile of our patients. It was indeed suggested that low specificity was actually not attributable to low performance of the Neuropad, but more to its ability to detect preclinical peripheral neuropathy; this is sustained by higher concordance of the test with the nerve conduction study than with clinical assessment [21,28], and by prospective data suggesting a predictive power of Neuropad for clinical peripheral neuropathy [19]. Therefore, as we studied a population at particularly high risk for cardiovascular disease, it is possible that our patients presented not only more macrovascular, but also more microvascular complications of diabetes; subclinical peripheral neuropathy may thus have been significantly more frequent among them and responsible for the high rate of false positive results. This hypothesis should nevertheless be confirmed by prospective data in a similar population.

Moving the cut-off point from 10 to 20 min allowed an important increase in specificity up to 56.0–67.9%, at the cost of a consequent loss of sensitivity reduced to 50–75%, in coherence with previous data [31]. Loss of sensitivity between 10 and 20 min seemed less important and gain in specificity conversely more marked in the subgroup with

peripheral arterial occlusive disease than without. Our findings suggest that it may be opportune, in patients with peripheral arterial occlusive disease specifically, to prolong the Neuropad length of observation, although this approach did not seem appropriate in people with newly diagnosed diabetes [31].

The Neuropad at 10 min was more sensitive than the monofilament test, producing a lower rate of false negative results. However, specificity was low, so that results should be confirmed by a validated test for diagnosing peripheral neuropathy. High concordance of a normal Neuropad at 10 min with the monofilament test (95.1%) suggests that the former could be appropriate as a self-triage test for pre-screening peripheral neuropathy, saving time for the clinician and adding educative value for the patient.

Sensitivity of the Neuropad at 20 min and of the monofilament test was not different, but specificity of the Neuropad was lower. This enhances further the fact that the 10-min cut-off point should be preferred to the 20-min cut-off point for peripheral neuropathy screening. However, an intermediate cut-off point should also be assessed.

Our study had several strengths, but also limitations. We assessed a high number of subjects, with a similar proportion of patients with peripheral arterial occlusive disease than without. The angiologists were experienced and blinded to clinical evaluation. A single physician, blinded to colour duplex ultrasonography results, performed all clinical evaluations, avoiding a possible inter-observer bias; however, interpretation of the Neuropad, performed last, may have been influenced by previous peripheral neuropathy clinical assessment; furthermore, skin temperature, which may modify Neuropad results, was not measured. We chose a neuropathy disability score ≥ 6 as a reference test, as this threshold has been associated with an increased risk for foot ulceration [24]; however, performance of the Neuropad and of the monofilament test may have been different with another neuropathy disability score cut-off point or with another reference test. Finally, we defined peripheral arterial occlusive disease as present or absent and did not assess a possible continuous relationship between Neuropad response and peripheral arterial occlusive disease severity. Our results may thus not be generalized to patients with particularly severe peripheral arterial occlusive disease; however, such patients should in any case be considered at high risk for complications and therefore closely observed, so the Neuropad would not be very relevant for them.

In conclusion, our results suggest that the high sensitivity and negative predictive value of the Neuropad make it usable for peripheral neuropathy screening, regardless of the presence of peripheral arterial occlusive disease in people with diabetes and at high risk for cardiovascular disease. However, specificity was very low, as previously described. Nevertheless, the Neuropad presents several advantages: high reproducibility, low inter-observer variability, ease of use, suitability for self-examination and educative value. It

could be appropriate for self-use as a triage test for peripheral neuropathy screening, thus saving time for the clinician [16–18]. However, whether the Neuropad can be used to predict diabetic foot complications, particularly in the presence of peripheral arterial occlusive disease, needs further prospective evaluation

Funding sources

This study was funded by Lilly Company, the University of Lausanne and Trigocare International GmbH, Wiehl-Drabenderhöhe, Germany.

Competing interests

None declared.

Acknowledgements

We thank Lilly Company and the University of Lausanne for supporting the doctoral research of CEA, Trigocare International GmbH, Wiehl-Drabenderhöhe, Germany for offering the Neuropad plasters, and the clinical staff of the Centre for Clinical Investigations Paris-Est, as well as the Diabetes and Cardiology Departments from the AP-HP Pitié-Salpêtrière Hospital in Paris for their participation in this project.

References

- Boulton AJ. The pathogenesis of diabetic foot problems: an overview. *Diabet Med* 1996; 13: S12–16.
- Vinik AI, Park TS, Stansberry KB, Pittenger GL. Diabetic neuropathies. *Diabetologia* 2000; 43: 957–973.
- Boulton AJM. The diabetic foot: from art to science. The 18th Camillo Golgi lecture. *Diabetologia* 2004; 47: 1343–1353.
- Boulton AJM. Management of diabetic peripheral neuropathy. *Clin Diabetes* 2005; 23: xx–xx.
- Fosse S, Hartemann-Heurtier A, Jacqueminet S, Ha Van G, Grimaldi A, Fagot-Campagna A. Incidence and characteristics of lower limb amputations in people with diabetes. *Diabet Med* 2009; 26: 391–396.
- Jeffcoate WJ, Rasmussen LM, Hofbauer LC, Game FL. Medial arterial calcification in diabetes and its relationship to neuropathy. *Diabetologia* 2009; 52: 2478–2488.
- Morbach S, Furchert H, Gröblichhoff U, Hoffmeier H, Kersten K, Klauke G-T *et al.* Long-term prognosis of diabetic foot patients and their limbs: amputation and death over the course of a decade. *Diabetes Care* 2012; 35: 2021–2027.
- International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF). *International Consensus on the Diabetic Foot*. Mainz: Kirchheim, 1999.
- Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R *et al.* Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2005; 28: 956–962.
- Tentolouris N, Marinou K, Kokotis P, Karanti A, Diakoumopoulou E, Katsilambros N. Sudomotor dysfunction is associated with foot ulceration in diabetes. *Diabet Med* 2009; 26: 302–305.
- De Berardis G, Pellegrini F, Franciosi M, Belfiglio M, Di Nardo B, Greenfield S *et al.* Are Type 2 diabetic patients offered adequate foot care? The role of physician and patient characteristics. *J Diabetes Complications* 2005; 19: 319–327.
- Papanas N, Boulton AJM, Malik RA, Manes C, Schnell O, Spallone V *et al.* Neuropad[®]: A simple new non-invasive sweat indicator test for the diagnosis of diabetic neuropathy. *Diabet Med* 2012; doi: 10.1111/dme.12000.
- Quattrini C, Jeziorska M, Tavakoli M, Begum P, Boulton AJM, Malik RA. The Neuropad test: a visual indicator test for human diabetic neuropathy. *Diabetologia* 2008; 51: 1046–1050.
- Spallone V, Morganti R, Siampli M, Fedele T, D'Amato C, Cacciotti L *et al.* Neuropad as a diagnostic tool for diabetic autonomic and sensorimotor neuropathy. *Diabet Med* 2009; 26: 686–692.
- Tentolouris N, Kokkinos A, Diakoumopoulou E, Eleftheriadou I, Alexiadou K. The association between Neuropad testing with peripheral neuropathy in diabetes: a meta-analysis. *Diabetologia* 2011; 54: A1154.
- Tentolouris N, Achtsidis V, Marinou K, Katsilambros N. Evaluation of the self-administered indicator plaster neuropad for the diagnosis of neuropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2008; 31: 236–237.
- Papanas N, Papatheodorou K, Papazoglou D, Christakidis D, Monastiriotis C, Maltzos E. Reproducibility of the new indicator test for sudomotor function (Neuropad) in patients with type 2 diabetes mellitus: short communication. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005; 113: 577–581.
- Papanas N, Paschos P, Papazoglou D, Papatheodorou K, Paletas K, Maltzos E *et al.* Accuracy of the Neuropad test for the diagnosis of distal symmetric polyneuropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011; 34: 1378–1382.
- Papanas N, Papatheodorou K, Papazoglou D, Kotsiou S, Maltzos E. A prospective study on the use of the indicator test Neuropad[®] for the early diagnosis of peripheral neuropathy in type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2011; 119: 122–125.
- Papanas N, Papatheodorou K, Papazoglou D, Christakidis D, Monastiriotis C, Maltzos E. The new indicator test (Neuropad): a valuable diagnostic tool for small-fiber impairment in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Educ* 2007; 33: 257–262.
- Papanas N, Papatheodorou K, Christakidis D, Papazoglou D, Giassakis G, Piperidou H *et al.* Evaluation of a new indicator test for sudomotor function (Neuropad) in the diagnosis of peripheral neuropathy in type 2 diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005; 113: 195–198.
- Tentolouris N, Voulgari C, Liatis S, Kokkinos A, Eleftheriadou I, Makrilakis K *et al.* Moisture status of the skin of the feet assessed by the visual test neuropad correlates with foot ulceration in diabetes. *Diabetes Care* 2010; 33: 1112–1114.
- Haroon TS. Diabetes and skin—a review. *Scott Med J* 1974; 19: 257–267.
- Abbott CA, Carrington AL, Ashe H, Bath S, Every LC, Griffiths J *et al.* The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort. *Diabet Med* 2002; 19: 377–384.
- Kumar S, Fernando DJ, Veves A, Knowlcs EA, Young MJ, Boulton AJ. Semmes–Weinstein monofilaments: a simple, effective and inexpensive screening device for identifying diabetic patients at risk of foot ulceration. *Diabetes Res Clin Pract* 1991; 13: 63–67.
- Schaper NC, Andros G, Apelqvist J, Bakker K, Lammer J, Lepantalo M *et al.* Diagnosis and treatment of peripheral arterial disease in diabetic patients with a foot ulcer. A progress report of the International Working Group on the Diabetic Foot. *Diabetes Metab Res Rev* 2012; 28: S218–224.
- Williams DT, Harding KG, Price P. An evaluation of the efficacy of methods used in screening for lower-limb arterial disease in diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 2206–2210.
- Papanas N, Giassakis G, Papatheodorou K, Papazoglou D, Monastiriotis C, Christakidis D *et al.* Sensitivity and specificity of a new indicator test (Neuropad) for the diagnosis of peripheral neuropathy.

- athy in type 2 diabetes patients: a comparison with clinical examination and nerve conduction study. *J Diabetes Complications* 2007; 21: 353–358.
- 29 Liatis S, Marinou K, Tentolouris N, Pagoni S, Katsilambros N. Usefulness of a new indicator test for the diagnosis of peripheral and autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus. *Diabet Med* 2007; 24: 1375–1380.
- 30 Papanas N, Papatheodorou K, Papazoglou D, Monastiriotis C, Christakidis D, Maltezos E. A comparison of the new indicator test for sudomotor function (Neuropad) with the vibration perception threshold and the clinical examination in the diagnosis of peripheral neuropathy in subjects with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116: 135–138.
- 31 Ziegler D, Papanas N, Roden M. Neuropad: evaluation of three cut-off points of sudomotor dysfunction for early detection of polyneuropathy in recently diagnosed diabetes. *Diabet Med* 2011; 28: 1412–1415.
- 32 Kamenov ZA, Petrova JJ, Christov VG. Diagnosis of diabetic neuropathy using simple somatic and a new autonomic (neuropad) tests in the clinical practice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010; 118: 226–233.

3. Relationship between peripheral vascular calcification and accuracy of pulse palpation and ankle brachial index as screening methods for peripheral arterial occlusive disease in patients with diabetes – a cross-sectional study

Submitted to Diabetic Medicine on March 4th 2013, under review.

Running title: Vascular calcification and screening for arteriopathy in diabetes.

C.E. AUBERT^{1,2}, P. CLUZEL^{3,4}, S. KEMEL⁴, P.-L. MICHEL⁵, F. LAJAT-KISS⁶, M. DADON⁶, A. HARTEMANN^{1,3}, O. BOURRON^{1,3}.

¹Diabetes and Metabolic Diseases Department, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France; ²Internal Medicine Department, Fribourg Cantonal Hospital, Fribourg, Switzerland; ³University Pierre and Marie Curie, Paris, France; ⁴Radiology Department, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France; ⁵Cardiology Department, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France; ⁶Vascular Surgery Department, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France.

Corresponding author:

Carole Elodie AUBERT

E-mail: caroleaubert@bluewin.ch

Novelty statement:

- Screening for peripheral arterial occlusive disease is very important in patients with diabetes. Pulse palpation and ankle brachial index are recommended for this purpose. However, their accuracy is bad in these patients, probably because of vascular calcification, but this has never been directly studied.
- The novelty of our study was to objectively assess the relationship between vascular calcification, measured by the mean of CT-scan, and sensitivity of pulse palpation and ankle brachial index for screening peripheral arterial occlusive disease.
- We also aimed at assessing the usefulness of associating both tests in order to improve accuracy of this screening.

ABSTRACT

AIMS

Accuracy of pulse palpation and ankle brachial index is discussed for screening peripheral arterial occlusive disease in patients with diabetes. Vascular calcification may indeed be associated with false negative tests. The aim of this study was to objectively assess the association between peripheral vascular calcification and false negative screening tests for peripheral arterial occlusive disease in patients with diabetes.

METHODS

This was a cross-sectional study including 200 patients with diabetes (400 lower limbs). The main exclusion criterion was severe renal disease. Peripheral arterial occlusive disease was diagnosed by color duplex ultrasonography. Vascular calcification was assessed by CT-scan below-knee arteries calcification score.

RESULTS

Accuracy of pulse palpation and ankle brachial index was low (69.5-72.5%) and not improved by combining both. Below-knee arteries calcification score was significantly higher in patients with false negative tests, than in those with true negative tests, for both pulse palpation and ankle brachial index ($p < 0.0001$ for all).

CONCLUSIONS

False negative results of pulse palpation and ankle brachial index for screening peripheral arterial occlusive disease is associated with below-knee vascular calcification in patients with diabetes. Combination of both tests does not improve accuracy.

Keywords: peripheral arterial occlusive disease, screening, ankle brachial index, pulse palpation, vascular calcification.

Abbreviations: ABI, ankle brachial index; PAOD, peripheral arterial occlusive disease; PP, pulse palpation.

INTRODUCTION

Peripheral arterial occlusive disease (PAOD) is a main risk factor for major lower-limb amputation in diabetes (1). In comparison with the general population, patients with diabetes have a 4-10 times higher risk for PAOD and a 10-20 times higher risk for amputation (2–4). PAOD begins earlier, progresses more quickly, and is associated with poor prognosis and reduced life expectancy in the presence of diabetes (2,5–7). As the concomitant presence of peripheral neuropathy may mask intermittent claudication, PAOD is often asymptomatic in patients with diabetes (2,8). Screening for PAOD is therefore particularly important in this population, to make a better selection of which patients need further vascular evaluation, more intensive treatment, as well as educative measures, in order to reduce the prevalence and burden of diabetic foot disease.

Foot pulses palpation (PP) and ankle brachial index (ABI) are simple methods for PAOD screening and diagnosis, that are recommended by the International Working Group on the Diabetic Foot (9) and by the American Diabetes Association (10). An ABI ≤ 0.90 is highly sensitive and specific for PAOD in the general population (11). However, there is concern about the reliability of these screening tests in the presence of diabetes. Vascular calcification, which is particularly frequent in diabetes, increases artery wall rigidity and may therefore make pulses difficult to palpate and ABI pathologically high or falsely normal, with the consecutive risk of underestimating PAOD prevalence (12–15). The 0.90 ABI threshold may therefore be inappropriate in the presence of diabetes (12,16–18). Nevertheless, to the best of our knowledge, the association between vascular calcification and accuracy of PP and ABI for PAOD screening has never been directly assessed. Furthermore, PP and ABI have mostly been studied separately in patients with diabetes, and data about the performance of their combination are missing.

The novelties of our study were therefore 1) to objectively assess the relationship between peripheral vascular calcification and sensitivity of PP and ABI for PAOD screening, by the mean of CT-scan below-knee arteries calcification score, which is a validated method to assess vascular calcification (19–22), and 2) to assess the usefulness of associating PP and ABI in order to improve the accuracy of PAOD screening in patients with diabetes.

PATIENTS AND METHODS

Patient population

This was a cross-sectional ancillary study to the DIACART (*“Diabète et Calcification ARTérielle”*) study (being written) which aimed at studying the physiopathology of PAOD in a population with diabetes and high risk for vascular complications (coronary artery disease, PAOD, age). Between November 2011 and July 2012, 200 patients (400 lower limbs) from the Diabetes and Cardiology Departments of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France) were included in the study. The number of patients was calculated according to the main outcome criteria of the DIACART study. In the DIACART study,

inclusion criteria were: 1) diabetes with coronary artery disease and/or 2) diabetes with PAOD and/or 3) type 2 diabetes with age >50 years for men and age >60 years for women. Exclusion criteria were 1) an estimated glomerular filtration rate by the Modification of Diet in Renal Disease equation <30ml/min and/or 2) a history of infrapopliteal angioplasty and/or bypass. The study was approved by the local ethics committee and all patients gave written informed consent.

Clinical evaluation

Blood and urine samples were collected after an overnight fast. All clinical tests were performed by a physician blinded to the results of color duplex ultrasonography and calcification score. Dorsalis pedis and posterior tibial pulses were palpated. PP was defined as normal when both foot pulses could be tasted. Dorsalis pedis, posterior tibial and humeral arterial pressures were measured with a Doppler probe (Parks Medical Electronics). ABI was calculated separately for each limb by dividing the lowest ankle by the highest humeral pressure, in order to increase sensitivity of the test (23). ABI was considered abnormal when ≤ 0.90 . Peripheral neuropathy was evaluated by the neuropathy disability score, as previously described (24), and by the Semmes-Weinstein 10g-monofilament test (25).

All limbs were examined by the same physician, in order to avoid a bias linked to interobserver variability, that has been reported previously (28). The physician was blinded to duplex ultrasonography and CT-scan results, in order to avoid an influence bias.

Imaging

A detailed color duplex ultrasonography was conducted from the abdominal tree down to the foot arteries. PAOD was defined as the presence of at least one >70% stenosis or occlusion in any studied artery (aorto-ilio-femoral segment, popliteal artery, tibio-peroneal trunk, and anterior tibial, posterior tibial, peroneal and dorsalis pedis arteries). Color duplex was performed by physicians blinded to the results of calcification score and clinical examination.

Below-knee arteries calcification score was performed on a 128-slice multidetector CT scanner (Somatom Definition Flash, Siemens Healthcare, Forchheim, Germany) and acquired without contrast, in craniocaudal direction, from the bottom of the patella down to the ankle region. Analysis was performed by radiologists blinded to the results of color duplex and clinical examination, using a commercially available software package (Heartbeat CaScore, Philips Healthcare, Eindhoven, Netherlands). On cross-sectional images, areas of calcification along below-knee arteries with a density ≥ 130 Hounsfield units attenuation and a surface $>1\text{mm}^2$ were identified automatically. Calcification scores, determined according to the method described by Agatston et al. (19), were obtained separately for each of the main below-knee arteries (distal popliteal, anterior tibial, posterior tibial and peroneal arteries) and summed to obtain the calcification score.

In order to avoid an influence bias, the angiologists were blinded to clinical examination and CT-scan results, and the radiologists to clinical examination and duplex ultrasonography results.

Statistical analysis

Data were assessed for normal distribution using the Shapiro-Wilk test. Continuous variables were described as median (minimum-maximum). Categorical variables were described as frequency (percentage).

Univariate linear regression was used to study the factors associated with calcification score.

Contingency tables were built to assess sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, likelihood ratios and accuracy of ABI and PP for PAOD screening. The McNemar test was used to compare sensitivity and specificity.

Lower limbs with false negative and true negative results for ABI and PP were isolated and compared. The non-parametric Mann-Whitney U test was used for continuous variables, and the X^2 test or Fisher's exact test for proportions, as appropriate.

Patients with missing data for ABI, PP, duplex ultrasonography or CT-scan were excluded of the study.

A p-value <0.05 was considered statistically significant. Data were analyzed using JMP 10 (SAS institute) and GraphPad 2012 softwares for Windows.

RESULTS

Table 1 presents the characteristics of the population. 30 lower limbs had missing data for ABI, PP, duplex ultrasonography or CT-scan, so that a remaining number of 400 lower limbs were analyzed, without any missing data for the other variables of interest. PP was abnormal in 166 (41.5%), and ABI in 77 (19.3%) lower limbs. Prevalence of PAOD was 32.5% (n=130).

Median calcification score was 248 (0-9216). Calcification score was negatively associated with estimated glomerular filtration rate, and positively with age, diabetes duration, type 1 diabetes, male gender, neuropathy disability score, abnormal monofilament test, PAOD, ABI ≤ 0.90 , ABI ≥ 1.30 , abnormal PP, smoking history and urinary albumin/creatinine ratio $>3\text{mg}/\text{mmol}$.

ABI and PP performance for PAOD screening

Table 2 presents the performance of ABI, PP, and combination of both tests for PAOD screening. Accuracy was 71.3% and 71.0% for ABI and PP respectively. Combination of both tests was still associated with about 30% inaccurate results.

The sensitivity of ABI was low (35.4%), while its specificity was rather high (88.5%). PP was significantly more sensitive than ABI (69.2%, $p < 0.0001$), but less specific (71.9%, $p < 0.0001$).

Considering both PP *and* ABI abnormal as an indicator for PAOD led to an increase in specificity (92.2%), with a consequent loss of sensitivity (31.5%). Considering at least one test (PP *and/or* ABI) abnormal was more sensitive (73.1%, $p < 0.0001$), but less specific (67.8%, $p < 0.0001$), than association of both.

Table 1. Characteristics of the population (n=400) and their association with below-knee arteries calcification score.

Variable	Distribution	p-value*
Age (years)	64.5 (43-83)	<0.0001
Diabetes duration (years)	13 (0-67)	<0.0001
Men, n (%)	320 (80.0)	<0.0001
Type 2 diabetes, n (%)	392 (98.0)	<0.0001
Smoking history, n (%)	206 (51.5)	0.04
Hypertension, n (%)	328 (82.0)	0.15
Body mass index (kg/m ²)	28.4 (17.1-48.8)	0.43
Waist (cm)	102.0 (70.0-147.5)	0.69
Neuropathy disability score	2 (0-10)	<0.0001
Abnormal monofilament test, n (%)	58 (14.5)	0.0009
ABI	1.06 (0.42-1.74)	0.08
ABI ≤0.90, n (%)	77 (19.3)	0.0001
ABI ≥1.30, n (%)	32 (0.08)	0.006
PP abnormal, n (%)	166 (41.5)	<0.0001
PAOD, n (%)	130 (32.5)	<0.0001
Calcification score	248 (0-9216)	-
Glycated haemoglobin (mmol/l); (%)	58 (27-123); 7.5 (4.6-13.4)	0.82
Estimated glomerular filtration rate (ml/min)	76.5 (33-153)	0.03
Urinary albumin/creatinine ratio >3mg/mmol, n (%)	136 (34.0)	0.03

Data are median (minimum-maximum) or n (%).

*p-value for the association with below-knee arteries calcification score.

ABI, ankle brachial index; PAOD, peripheral arterial occlusive disease; PP, pulse palpation.

Table 2. Performance and accuracy of ABI, PP, PP + ABI (both tests abnormal), PP +/- ABI (at least one test abnormal) for PAOD screening.

n=400	ABI	PP	PP+ABI	PP +/-ABI
Sensitivity	35.4*	69.2*	31.5 [§]	73.1 [§]
Specificity	88.5*	71.9*	92.2 [§]	67.8 [§]
Positive predictive value	59.7	54.2	66.1	52.2
Negative predictive value	74.0	82.9	73.7	83.9
Accuracy	71.3	71.0	72.5	69.5
Likelihood ratio positive	3.07	2.46	4.03	2.27
Likelihood ratio negative	0.73	0.43	0.74	0.40

PAOD prevalence: 32.5% (n=130).

Comparison between ABI and PP: *p<0.0001

Comparison between PP + ABI and PP +/- ABI: [§]p<0.0001.

ABI, ankle brachial index; PAOD, peripheral arterial occlusive disease; PP, pulse palpation.

Influence of calcification on accuracy of ABI and PP

Table 3 compares lower limbs with false negative and true negative results for ABI and PP respectively. The calcification score was significantly higher in lower limbs with false negative results than in those with true negative results obtained as well for ABI as for PP (p<0.0001 for all).

Table 3. Limbs with normal ABI and limbs with normal PP. Comparison of calcification scores in patients with false negative and true negative results for ABI and PP respectively.

	Normal ABI, n=323 (80.5)			Normal PP, n=234 (58.5)		
	False negative, n=84 (21.0)	True negative, n=239 (59.8)	p-value	False negative n=40 (10.0)	True negative, n=194 (48.5)	p-value
Calcification score	725 (0-6326)	102 (0-7205)	<0.0001	625 (0-6326)	71 (0-6452)	<0.0001

Data are median (minimum-maximum) or n (%).

ABI, ankle brachial index; PP, pulse palpation.

DISCUSSION

Our data, obtained from a high number of observations, show that ABI and PP are little accurate for PAOD screening in patients with diabetes, which is concordant with previous studies on smaller samples (12,15,26). ABI has a particularly poor sensitivity; therefore, as a low ABI may relatively well inform on the presence of PAOD, a normal result should not be used to exclude it.

To this day, PP and ABI have mostly been evaluated separately for PAOD screening in patients with diabetes, while data on their combination are lacking. In our study, associating both tests was still associated with about 30% unreliable results; this approach was therefore not more accurate than each test in isolation. Considering both tests abnormal for suspecting PAOD led to an important drop in sensitivity (38.1%), thus producing a high rate of false negative results, which is not tolerable for PAOD screening: a high sensitivity is indeed the most important parameter in order to avoid missing patients at risk for limb ischemia and needing preventive and educative measures, which could reduce the prevalence of diabetic foot ulceration by 50% (27).

Therefore, as combination of ABI and PP does not seem to improve the performance of PAOD screening in the presence of diabetes, we suggest examining regularly these patients with a safe mean like color duplex ultrasonography, regardless of the results of these screening tests, in order to avoid missing patients at risk for complications. However, a problem of this approach is the situation in countries where duplex ultrasonography is not currently available, like in emerging countries, where the burden of diabetic foot disease remains particularly high, and PAOD screening therefore especially critical. Therefore, criteria should be determined to exactly define which patients are at particularly high risk for PAOD and thus need this evaluation, and to assess how often ultrasonography should be performed.

In a previous study, Williams obtained lower sensitivity for ABI in patients with peripheral neuropathy than in those without, and hypothesized that this was due to vascular calcification (12). In our study, we objectively assessed lower limb vascular calcification by the mean of CT-scan, and we found that patients with false negative results had significantly higher calcification scores than those with true negative results, as well for ABI as for PP; furthermore, the calcification score was

positively and independently associated with peripheral neuropathy. Our results are therefore in coherence with previous observations and objectively confirm the previous assumption that vascular calcification would be responsible for inaccurate PAOD screening (11–13).

The current study has several strengths and limitations. The sample represents a large population, compared with previous studies (12,15,26). The physician who performed clinical examination was blinded to duplex ultrasonography and CT-scan results, the angiologists to clinical examination and CT-scan results, and the radiologists to clinical examination and duplex ultrasonography results. All limbs were examined by the same physician, which can have avoided a bias linked to interobserver variability, that has been reported previously (28); however, PP would probably have been more accurate if evaluated by at least two persons. Color duplex ultrasonography was performed by angiologists experienced on assessing PAOD with this method; however, as it was performed by 4 different physicians, an interobserver bias cannot be excluded. Finally, our results provide from a population at high risk for cardiovascular disease, so that they may not be generalized to all patients with diabetes.

In conclusion, we showed that peripheral vascular calcification is associated with false negative screening tests for PAOD in patients with diabetes. Therefore, ABI and PP should be used very carefully in the presence of diabetes, since they may be inadequate to exclude PAOD. We therefore suggest performing color duplex ultrasonography, every four years for example, regardless of the clinical examination, in patients at high risk for PAOD. Although this approach is more expensive and time-consuming than performing clinical examination with ABI and PP alone, these costs should be compared with the potential impact on lowering the burden of diabetic foot disease. Nevertheless, this approach remains problematic in emerging countries, where duplex ultrasonography is not currently available, while complications of diabetic foot disease are particularly frequent. Finally, further studies are needed 1) to define and validate criteria to select which patients should be examined by duplex ultrasonography, 2) to assess how often duplex ultrasonography should be repeated in these patients, and 3) to assess the cost-effectiveness and prospective impact of this approach.

FUNDING

This study was supported by a fund from Lilly Company. The company was involved neither in the design of the study nor in data collection. The research activities of C.E. Aubert were supported by a doctoral research scholarship from the University of Lausanne.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Lilly Company, the University of Lausanne, and the clinical staff of the Center for Clinical Investigations Paris-Est, as well as the Diabetes and Cardiology Departments from the AP-HP Pitié-Salpêtrière Hospital in Paris for their participation in this project.

CONFLICT OF INTEREST

Nothing to declare.

REFERENCES

1. Armstrong DG, Lavery LA, Harkless LB. Validation of a diabetic wound classification system. The contribution of depth, infection, and ischemia to risk of amputation. *Diabetes Care*. 1998;21(5):855-859.
2. Jude EB, Oyibo SO, Chalmers N, Boulton AJ. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes Care*. 2001;24(8):1433-1437.
3. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*. 1979;241(19):2035-2038.
4. Fosse S, Hartemann-Heurtier A, Jacqueminet S, Ha Van G, Grimaldi A, Fagot-Campagna A. Incidence and characteristics of lower limb amputations in people with diabetes. *Diabet. Med*. 2009;26(4):391-396.
5. Cheng SW, Ting AC, Lau H, Wong J. Survival in patients with chronic lower extremity ischemia: a risk factor analysis. *Ann Vasc Surg*. 2000;14(2):158-165.
6. Dormandy J, Heeck L, Vig S. The natural history of claudication: risk to life and limb. *Semin Vasc Surg*. 1999;12(2):123-137.
7. Donahue RP, Orchard TJ. Diabetes mellitus and macrovascular complications. An epidemiological perspective. *Diabetes Care*. 1992;15(9):1141-1155.
8. Dolan NC, Liu K, Criqui MH, Greenland P, Guralnik JM, Chan C, et al. Peripheral artery disease, diabetes, and reduced lower extremity functioning. *Diabetes Care*. 2002;25(1):113-120.
9. Schaper NC, Andros G, Apelqvist J, Bakker K, Lammer J, Lepantalo M, et al. Diagnosis and treatment of peripheral arterial disease in diabetic patients with a foot ulcer. A progress report of the International Working Group on the Diabetic Foot. *Diabetes Metab. Res. Rev*. 2012;28 Suppl 1:218-224.
10. Standards of medical care in diabetes--2012. *Diabetes Care*. 2012;35 Suppl 1:S11-63.
11. Baxter GM, Polak JF. Lower limb colour flow imaging: a comparison with ankle: brachial measurements and angiography. *Clin Radiol*. 1993;47(2):91-95.
12. Williams DT, Harding KG, Price P. An evaluation of the efficacy of methods used in screening for lower-limb arterial disease in diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28(9):2206-2210.
13. Emanuele MA, Buchanan BJ, Abaira C. Elevated leg systolic pressures and arterial calcification in diabetic occlusive vascular disease. *Diabetes Care*. 1981;4(2):289-292.
14. Faglia E, Favales F, Quarantiello A, Calia P, Clelia P, Brambilla G, et al. Angiographic evaluation of peripheral arterial occlusive disease and its role as a prognostic determinant for major amputation in diabetic subjects with foot ulcers. *Diabetes Care*. 1998;21(4):625-630.

15. Potier L, Halbron M, Bouilloud F, Dadon M, Le Doeuff J, Ha Van G, et al. Ankle-to-brachial ratio index underestimates the prevalence of peripheral occlusive disease in diabetic patients at high risk for arterial disease. *Diabetes Care*. 2009;32(4):e44.
16. Goebel FD, Füessler HS. Mönckeberg's sclerosis after sympathetic denervation in diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia*. 1983;24(5):347-350.
17. Jeffcoate WJ, Rasmussen LM, Hofbauer LC, Game FL. Medial arterial calcification in diabetes and its relationship to neuropathy. *Diabetologia*. 2009;52(12):2478-2488.
18. Strandness D Jr, Priest R, Gibbons G. Combined clinical and pathologic study of diabetic and nondiabetic peripheral arterial disease. *Diabetes*. 1964;13:366-372.
19. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M Jr, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1990;15(4):827-832.
20. Guzman RJ, Brinkley DM, Schumacher PM, Donahue RMJ, Beavers H, Qin X. Tibial artery calcification as a marker of amputation risk in patients with peripheral arterial disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008;51(20):1967-1974.
21. Ohtake T, Oka M, Ikee R, Mochida Y, Ishioka K, Moriya H, et al. Impact of lower limbs' arterial calcification on the prevalence and severity of PAD in patients on hemodialysis. *J. Vasc. Surg.* 2011;53(3):676-683.
22. Singh DK, Winocour P, Summerhayes B, Kaniyur S, Viljoen A, Sivakumar G, et al. Prevalence and progression of peripheral vascular calcification in type 2 diabetes subjects with preserved kidney function. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2012;97(1):158-165.
23. Schröder F, Diehm N, Kareem S, Ames M, Pira A, Zwettler U, et al. A modified calculation of ankle-brachial pressure index is far more sensitive in the detection of peripheral arterial disease. *J. Vasc. Surg.* 2006;44(3):531-536.
24. Boulton A J M. Management of Diabetic Peripheral Neuropathy. *Clinical Diabetes*. 2005;23(1).
25. Kumar S, Fernando DJ, Veves A, Knowles EA, Young MJ, Boulton AJ. Semmes-Weinstein monofilaments: a simple, effective and inexpensive screening device for identifying diabetic patients at risk of foot ulceration. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1991;13(1-2):63-67.
26. Clairotte C, Retout S, Potier L, Roussel R, Escoubet B. Automated ankle-brachial pressure index measurement by clinical staff for peripheral arterial disease diagnosis in nondiabetic and diabetic patients. *Diabetes Care*. 2009;32(7):1231-1236.
27. International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF): International Consensus on the Diabetic Foot. Kirchheim, Mainz; 1999.
28. Brearley S, Shearman CP, Simms MH. Peripheral pulse palpation: an unreliable physical sign. *Ann R Coll Surg Engl.* 1992;74(3):169-171.

4. Association of peripheral neuropathy with circulating advanced glycation end products, soluble receptor for advanced glycation end products and other risk factors in patients with type 2 diabetes

Submitted to Acta Diabetologica on March 7th 2013, under review.

Running title: Advanced glycation and peripheral neuropathy in type 2 diabetes.

C.E. AUBERT^{1, 2}, P.-L. MICHEL³, P. GILLERY^{4,5}, S. JAISSON^{4,5}, M. FONFREDE⁶, F. MOREL⁶, A. HARTEMANN^{1,7}, O. BOURRON^{1,7}.

¹Diabetes and Metabolic Diseases Department, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France; ²Internal Medicine Department, Fribourg Cantonal Hospital, Fribourg, Switzerland; ³Cardiology Department, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France; ⁴Laboratory of Pediatric Biology and Research, University Hospital, Reims, France; ⁵Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, FRE CNRS/URCA n°3481, Reims, France; ⁶Laboratory of Biochemistry, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France; ⁷University Pierre and Marie Curie, Paris, France.

Corresponding author:

Carole Elodie AUBERT

E-mail: caroleaubert@bluewin.ch

ABSTRACT

AIMS

Pathogenesis of peripheral neuropathy is still discussed and nonenzymatic glycooxidation is one of the contributing mechanisms. The aim of this study was to assess the respective relationship of peripheral neuropathy with glycooxidation, compared with other identified risk factors, in patients with type 2 diabetes.

METHODS

We included 198 patients with type 2 diabetes. Serum concentrations of 3 advanced glycation end products (carboxymethyllysine, methyl-glyoxal-hydroimidazolone-1, pentosidine) and of their soluble receptor (sRAGE) were measured. Peripheral neuropathy was assessed by the neuropathy disability score and by the monofilament test, and defined as either abnormal monofilament test and/or neuropathy disability score ≥ 6 . Multivariate regression analyses were performed adjusting for potential confounding factors for neuropathy: age, gender, diabetes duration, current smoking, systolic blood pressure, waist, height, peripheral arterial occlusive disease, glycated haemoglobin and lipid profile.

RESULTS

Prevalence of peripheral neuropathy was 20.7%. sRAGE was independently and positively associated with severity and presence of peripheral neuropathy assessed by the neuropathy disability score or by the monofilament test. Carboxymethyllysine was independently and positively associated with the monofilament test. No significant association was found between peripheral neuropathy and methyl-glyoxal-hydroimidazolone-1 or pentosidine. Waist, height, current smoking, glycated haemoglobin and peripheral arterial occlusive disease were independently associated with peripheral neuropathy.

CONCLUSIONS

Carboxymethyllysine and sRAGE were independently associated with peripheral neuropathy. This study confirms the relationship between advanced glycooxidation and peripheral neuropathy, independently of other risk factors, in patients with type 2 diabetes.

Keywords: peripheral neuropathy, type 2 diabetes, advanced glycation, advanced glycation end products, risk factors.

Abbreviations: AGEs: advanced glycation end products; CML: carboxymethyllysine; esRAGE: endogenous soluble receptor for advanced glycation end products; HbA1c: glycated haemoglobin; MG-H1: methyl-glyoxal-hydroimidazolone-1; NDS: neuropathy disability score; PAOD: peripheral arterial occlusive disease; PN: peripheral neuropathy; sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end products.

INTRODUCTION

Peripheral neuropathy (PN) is an important long-term complication of diabetes: it affects up to 50% of patients with type 2 diabetes (1), represents the main risk factor for foot ulceration (2,3) and greatly affects quality of life when painful. PN may begin before the onset of diabetes: its prevalence is higher in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose than in healthy subjects (4–6). Nevertheless, its pathogenesis is not yet fully understood (7) and the respective role of hyperglycemia compared with other metabolic dysfunctions remains unclear (4).

Several mechanisms have been proposed to explain PN pathophysiology, among which hyperglycemia, hypoinsulinemia, dyslipidemia, genetic factors, smoking, alcohol consumption, autoimmunity and microvascular insufficiency (7). Hyperglycemia could be involved in PN physiopathology through different ways, among which nonenzymatic glycation (8,9); the latter, in association with oxidation (glycoxidation), leads to the irreversible formation of advanced glycation end products (AGEs), like carboxymethyllysine (CML) or pentosidine (10,11). Unlike pentosidine, CML also results from lipid peroxidation (11). Conversely, other AGEs, like methyl-glyoxal-hydroimidazolone-1 (MG-H1), are directly formed by binding of reactive carbonyl compounds (10,11).

The soluble forms of RAGE correspond to both a cleaved-form of the cellular receptor (sRAGE) and a secreted splice variant, namely endogenous secretory RAGE (esRAGE) (12). As decoy receptors, they bind AGEs without activating cellular signalling.

Experimental studies showed the role of AGEs in PN pathogenesis (17,18), but clinical data about PN and AGEs (13–16), and specially about PN and sRAGE (17–19), are scarce and discordant in type 2 diabetes.

Novelties of our study were to evaluate the relationship of both AGEs and sRAGE with PN, and to assess the respective relationship of PN with the glycation pathway compared with other previously described risk factors for PN.

PATIENTS AND METHODS

Patient population

This was a cross-sectional ancillary study to the DIACART (*“Diabète et Calcification ARTérielle”*) study (being written) which aimed at studying the pathophysiology of peripheral arterial occlusive disease (PAOD) in patients with diabetes and high risk for vascular complications (coronary artery disease, PAOD, age). Over an 8-months period, we recruited 198 patients from the Diabetes and Cardiology Departments of the Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France). Inclusion criteria were: type 2 diabetes with 1) coronary artery disease and/or 2) PAOD and/or 3) age >50 years for men or >60 years for women. Exclusion criteria were: 1) an estimate glomerular filtration rate by Modification of Diet in

Renal Disease equation $<30\text{ml/min}$ and/or 2) a history of infrapopliteal angioplasty and/or bypass. The study was approved by the local ethics committee and all patients gave written informed consent.

Biological measurements

Blood and urine samples were collected after an overnight fast. sRAGE was measured with a commercially available ELISA kit (Quantikine Human RAGE Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA). CML, MG-H1 and pentosidine were determined by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (API4000 system ABSciex, Les Ulis, France). AGEs concentrations were expressed as a ratio to total protein concentrations.

Clinical evaluation

All patients were assessed by a physician blinded to the results of laboratory. The neuropathy disability score (NDS) was performed as previously described (20); temperature perception was tested with tubes of cold and warm water, pallesthesia with a tuning fork at 128Hz at the top of the big toes, and pin-prick perception with a toothpick (for pain) and a cotton stretch (for light touch). The NDS was used as a continuous variable to assess PN severity, and with a cutoff at ≥ 6 for PN diagnosis. The Semmes-Weinstein 10g-monofilament (21) was applied three times randomly on the following plantar sites of each foot: pulp of hallux, heel, and first and fifth metatarsal heads; inability to perceive the monofilament at any site was defined as abnormal.

PAOD was evaluated by color duplex ultrasonography and defined as at least one $>70\%$ stenosis and/or occlusion in any artery studied (aorto-ilio-femoral segment, popliteal artery, tibio-peroneal trunk, and anterior tibial, posterior tibial, peroneal and dorsalis pedis arteries).

Statistical analysis

Continuous variables were described as median (minimum-maximum) and categorical variables as number (percentage).

Data were assessed for normal distribution with the Shapiro-Wilk test. Skewed variables were logarithmically transformed before performing analyses.

Linear and logistic regression analyses for continuous and categorical dependent variables respectively were performed to determine factors associated with PN. Dependent variables were: NDS, $\text{NDS} \geq 6$, abnormal monofilament test. Independent variables were: age, gender, diabetes duration, body mass index, waist, height, current smoking, systolic blood pressure, PAOD, glycated haemoglobin (HbA1c), sRAGE, CML, MG-H1 and pentosidine. sRAGE, CML, MG-H1 and pentosidine were included in the multivariate analysis if the univariate p-value was <0.20 . Each multivariate model was adjusted for potential confounding risk factors for neuropathy: age, gender, diabetes

duration, current smoking, systolic blood pressure, PAOD, waist, height, HbA1c, triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol.

A p-value <0.05 (two-sided) was considered statistically significant. Data were analyzed using JMP 10 (SAS Institute) software for Windows.

RESULTS

Table 1 presents the clinical and biological characteristics of the 198 patients with type 2 diabetes who were included. Median (minimum-maximum) age was 65 years (43-85) and diabetes duration 13 years (0-40). Thirty-one (15.7%) patients had a NDS ≥ 6 and 31 (15.7%) had an abnormal monofilament test. Forty-one (20.7%) had either test abnormal.

Median sRAGE was 832pg/ml (217-3513), CML 0.15 μ mol/g prot. (0.09-0.24), MG-H1 2.79 μ mol/g prot. (1.97-7.13) and pentosidine 1.10nmol/g prot. (0.34-7.64).

Table 1. Characteristics of the patients (n=198).

Variable	Distribution
Age (years)	65 (43-85)
Diabetes duration (years)	13 (0-40)
Men, n (%)	158 (79.8)
Current smoking, n (%)	27 (13.6)
Hypertension, n (%)	263 (82.3)
History of foot ulceration, n (%)	11 (5.5)
Coronary artery disease, n (%)	150 (75.8)
PAOD, n (%)	85 (43.4)
Systolic blood pressure (mmHg)	125 (92-200)
Body mass index (kg/m ²)	28.4 (17.1-48.8)
Height (cm)	171 (147-190)
Waist (cm)	102.0 (70.0-147.5)
NDS	2 (0-10)
NDS ≥ 6 , n (%)	31 (15.7)
Abnormal monofilament test, n (%)	31 (15.7)
HbA1c (mmol/mol); (%)	58 (27-123); 7.5 (4.6-13.4)
Estimated glomerular filtration rate (ml/min)	76 (33-153)
Urinary albumin/creatinine ratio >3mg/mmol, n (%)	71 (35.9)
Total cholesterol (mmol/l)	3.65 (2.02-7.23)
HDL cholesterol (mmol/l)	1.06 (0.31-2.38)
LDL cholesterol (mmol/l)	1.82 (0.77-5.05)
Triglycerides (mmol/l)	1.27 (0.41-7.82)
sRAGE (pg/ml)	832 (217-3513)
CML (μ mol/g prot.)	0.15 (0.09-0.24)
MG-H1 (μ mol/g prot.)	2.79 (1.97-7.13)
Pentosidine (nmol/g prot.)	1.10 (0.34-7.64)

Data are median (minimum-maximum) or n (%).

CML: carboxymethyllysine; HbA1c: glycated haemoglobin; MG-H1: methyl-glyoxal-hydroimidazolone-1; NDS: neuropathy disability score; PAOD: peripheral arterial occlusive disease; sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end products.

Factors associated with PN

Table 2 presents univariate and multivariate regression analyses. The multivariate models explained 26% of the variance of the NDS, 24% of the variance of a NDS ≥ 6 and 22% of the variance of the monofilament test.

Table 2. Factors associated with neuropathy, according to NDS, NDS ≥ 6 and monofilament test, in univariate and multivariate regression analyses.

	NDS		NDS ≥ 6		Monofilament test	
	univariate p-value	multivariate p-value	univariate p-value	multivariate p-value	univariate p-value	multivariate p-value
Age	0.37	0.08	0.68	0.99	0.67	0.60
Diabetes duration	0.67	0.14	0.99	0.22	0.09	0.63
Gender (male)	0.30	0.47	0.54	0.42	0.90	0.59
Body mass index	0.21		0.22		0.97	
Waist	0.02	0.05	0.04	0.04	0.16	0.08
Height	0.0004	0.001	0.01	0.02	0.06	0.06
Current smoking	0.01	0.02	0.12	0.14	0.12	0.22
Systolic blood pressure	0.74	0.68	0.82	0.51	0.55	0.15
PAOD	0.0008	0.01	0.001	0.003	0.03	0.11
Log HbA1c	0.003	0.006	0.08	0.14	0.002	0.08
Log sRAGE	0.04	0.02	0.08	0.04	0.03	0.06
Log CML	0.09	0.66	0.53		0.001	0.03
Log MG-H1	0.47		0.14	0.14	0.41	
Log pentosidine	0.41		0.73		0.24	

All multivariate analyses are adjusted for age, gender, diabetes duration, current smoking, waist, height, systolic blood pressure, PAOD, HbA1c, triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol and LDL cholesterol.

Coefficient of determination (R^2): 26, 24 and 22% for NDS, NDS ≥ 6 and monofilament test respectively. CML: carboxymethyllysine; HbA1c: glycated haemoglobin; MG-H1: methyl-glyoxal-hydroimidazolone-1; NDS: neuropathy disability score; PAOD: peripheral arterial occlusive disease; sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end products.

Presence of PN (NDS ≥ 6 or abnormal monofilament test)

No significant association was found between presence of PN and age, diabetes duration, gender, body mass index, systolic blood pressure, current smoking, blood lipids (data not shown), MG-H1 and pentosidine.

Waist, height and PAOD were independently associated with a NDS ≥ 6 .

sRAGE was independently and positively associated with a NDS ≥ 6 ($p= 0.04$), while the relationship with the monofilament test reached the limit of significance ($p=0.06$). CML was positively and independently associated with the monofilament test ($p=0.03$).

Severity of PN (NDS)

Height, current smoking, PAOD and log HbA1c were independently associated with the NDS ($p < 0.03$ for all).

sRAGE was independently and positively associated with the NDS ($p = 0.02$).

DISCUSSION

In this cross-sectional study, we assessed the associations of serum AGEs, sRAGE and several risk factors with the prevalence and severity of PN in patients with type 2 diabetes and high risk for vascular complications (coronary artery disease, PAOD, age).

Previous clinical data about sRAGE and PN are scarce and discordant. Humpert found no association of PN with sRAGE or esRAGE, which may be due to a lack of power of the study ($n = 108$) (19). Conversely, in men with type 2 diabetes, El-Mesallamy found higher sRAGE in patients without foot ulceration compared with patients with foot ulceration or healthy subjects (17), while Witzke found lower sRAGE in patients with diabetes and severe PN compared with controls (18). In our study, sRAGE was associated with the presence and severity of PN, while complications of PN were rare among our population (only 5.5% of our 198 patients had a history of foot ulceration).

Overall, these results suggest that sRAGE, as a decoy receptor for AGEs, could initially increase to counteract AGEs deleterious effects, although not enough to prevent the development of PN; it may then decrease in complicated PN, as if the reactive mechanism was exhausted. But high sRAGE could also result from an increased production of RAGE cleaved-form, as membrane-bound RAGE is upregulated by AGEs stimulation (22); sRAGE concentration may thus be a marker of risk and reflect AGEs' noxiousness. Finally, high sRAGE may partially result from decreased renal clearance, although little is known about its elimination (23). Further studies are thus warranted to clarify these relationships and to determine whether sRAGE is only a marker of diabetes complications or if it has real protective effects as in animal models, which may have therapeutic implications (24).

While the role of AGEs in PN pathophysiology has been shown in experimental studies (17,18), clinical data are scarce. Two studies found higher skin autofluorescence (an extrapolation of AGEs tissue accumulation) in patients with type 2 diabetes with microvascular complications, but without isolating PN from retinopathy and nephropathy (13,14). AGEs were related to PN severity in a small cross-sectional study (15), while prospective data associated skin autofluorescence with the development of PN in primary care patients with a short history of diabetes (OR 1.50, 95% CI 1.05-2.14) (16).

In our study, we found an independent association between CML and the monofilament test. Surprisingly, CML was not associated with the NDS. It is possible that CML better correlates with

large fibers PN, which is more specifically assessed by the monofilament test, but this hypothesis warrants further evaluation.

Conversely, we found no association between PN and MG-H1 or pentosidine. This may be explained by the fact that CML, unlike pentosidine and MG-H1, also directly arises from lipid peroxidation, and could therefore reflect oxidative stress more than hyperglycemia (11). Moreover, AGEs are also correlated to various other metabolic and age-related diseases, which may distort the relationship with hyperglycemia (10).

Finally, our multivariate models explained only 22-26% of PN variance, although multiple risk factors for PN were assessed. This further enhances the fact that PN pathogenesis is multifactorial, involving several other mechanisms that we did not directly assess, like for example endothelial dysfunction, oxidative stress, growth factors, immunity, polyol pathway or changes in aldose reductase or protein kinase C activity (7).

Our study had several strengths: 1) clinical examination was performed by the same physician, blinded to biological test results, avoiding both an interobserver bias and an influence by biochemical results; 2) biological measurements were performed by professionals blinded to clinical evaluation; 3) a large number of factors associated with PN were assessed; 4) our multivariate models were adjusted for all these potential confounding variables.

Nevertheless, we must mention some limitations: 1) we had no control population; 2) our patients were selected as having a high risk for vascular complications, so that our results may not be inferred to all the patients with diabetes; this selection most probably explains why age and male gender were not found as risk factors for PN in our study; 3) we can only present associations and not cause-to-effect relationships because of the cross-sectional nature of our study; 4) we measured serum and not tissue AGEs.

In conclusion, we showed an independent association of PN with CML, sRAGE, waist, height, smoking, HbA1c and PAOD. Our results confirm the important relationship of PN with glycoxidation and glycemic balance in patients with type 2 diabetes, independently of many other risk factors.

FUNDING

This study was supported by a fund from Lilly Company. The company was involved neither in the design of the study nor in data collection. The research activities of C.E. Aubert were supported by a doctoral research scholarship from the University of Lausanne.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Lilly Company, the University of Lausanne, and the clinical staff of the Center for Clinical Investigations Paris-Est, as well as the Diabetes and Cardiology Departments from the AP-HP Pitié-Salpêtrière Hospital in Paris for their participation in this project.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Young MJ, Boulton AJ, MacLeod AF, Williams DR, Sonksen PH. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia*. 1993;36(2):150-154.
2. Boulton AJ. The pathogenesis of diabetic foot problems: an overview. *Diabet. Med.* 1996;13 Suppl 1:S12-16.
3. Carrington AL, Shaw JE, Van Schie CHM, Abbott CA, Vileikyte L, Boulton AJM. Can motor nerve conduction velocity predict foot problems in diabetic subjects over a 6-year outcome period? *Diabetes Care*. 2002;25(11):2010-2015.
4. Dyck PJ, Dyck PJB, Klein CJ, Weigand SD. Does impaired glucose metabolism cause polyneuropathy? Review of previous studies and design of a prospective controlled population-based study. *Muscle Nerve*. 2007;36(4):536-541.
5. Ziegler D, Rathmann W, Dickhaus T, Meisinger C, Mielck A. Prevalence of polyneuropathy in pre-diabetes and diabetes is associated with abdominal obesity and macroangiopathy: the MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3. *Diabetes Care*. 2008;31(3):464-469.
6. Tapp RJ, Shaw JE, De Courten MP, Dunstan DW, Welborn TA, Zimmet PZ. Foot complications in Type 2 diabetes: an Australian population-based study. *Diabet. Med.* 2003;20(2):105-113.
7. Vinik AI, Park TS, Stansberry KB, Pittenger GL. Diabetic neuropathies. *Diabetologia*. 2000;43(8):957-973.
8. Boulton AJM, Malik RA, Arezzo JC, Sosenko JM. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care*. 2004;27(6):1458-1486.
9. Sima AA, Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia*. 1999;42(7):773-788.
10. Jaisson S, Gillery P. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. *Clin. Chem.* 2010;56(9):1401-1412.
11. Busch M, Franke S, Rüster C, Wolf G. Advanced glycation end-products and the kidney. *Eur. J. Clin. Invest.* 2010;40(8):742-755.
12. Yang SJ, Kim S, Hwang SY, Kim TN, Choi HY, Yoo HJ, et al. Association between sRAGE, esRAGE levels and vascular inflammation: analysis with (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Atherosclerosis*. 2012;220(2):402-406.

13. Lutgers HL, Graaff R, Links TP, Ubink-Veltmaat LJ, Bilo HJ, Gans RO, et al. Skin autofluorescence as a noninvasive marker of vascular damage in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29(12):2654-2659.
14. Noordzij MJ, Mulder DJ, Oomen PHN, Brouwer T, Jager J, Castro Cabezas M, et al. Skin autofluorescence and risk of micro- and macrovascular complications in patients with Type 2 diabetes mellitus-a multi-centre study. *Diabet. Med.* 2012; ;29(12):1556-61. doi: 10.1111/dme.12005.
15. Meerwaldt R, Links TP, Graaff R, Hoogenberg K, Lefrandt JD, Baynes JW, et al. Increased accumulation of skin advanced glycation end-products precedes and correlates with clinical manifestation of diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 2005;48(8):1637-1644.
16. Gerrits EG, Lutgers HL, Kleefstra N, Graaff R, Groenier KH, Smit AJ, et al. Skin autofluorescence: a tool to identify type 2 diabetic patients at risk for developing microvascular complications. *Diabetes Care*. 2008;31(3):517-521.
17. El-Mesallamy HO, Hamdy NM, Ezzat OA, Reda AM. Levels of soluble advanced glycation end product-receptors and other soluble serum markers as indicators of diabetic neuropathy in the foot. *J. Investig. Med.* 2011;59(8):1233-1238.
18. Witzke KA, Vinik AI, Grant LM, Grant WP, Parson HK, Pittenger GL, et al. Loss of RAGE defense: a cause of Charcot neuroarthropathy? *Diabetes Care*. 2011;34(7):1617-1621.
19. Humpert PM, Papadopoulos G, Schaefer K, Djuric Z, Konrade I, Morcos M, et al. sRAGE and esRAGE are not associated with peripheral or autonomic neuropathy in type 2 diabetes. *Horm. Metab. Res.* 2007;39(12):899-902.
20. Boulton A J M. Management of Diabetic Peripheral Neuropathy. *Clinical Diabetes*. 2005;23(1).
21. Kumar S, Fernando DJ, Veves A, Knowles EA, Young MJ, Boulton AJ. Semmes-Weinstein monofilaments: a simple, effective and inexpensive screening device for identifying diabetic patients at risk of foot ulceration. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1991;13(1-2):63-67.
22. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114(6):597-605.
23. Tan KCB, Shiu SWM, Chow WS, Leng L, Bucala R, Betteridge DJ. Association between serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and circulating advanced glycation end products in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2006;49(11):2756-2762.
24. Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, et al. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation*. 2002;106(22):2827-2835.