

# **Rapport de fin de contrat**

**mai 2009**

**CONVENTION DE RECHERCHE: 0000375**

**relative au Projet :**

**Prévention des effets de la canicule :  
optimiser la circulation cutanée chez les  
personnes à risque.**

**dans le cadre du Programme**

**GESTION ET IMPACT DU CHANGEMENT  
CLIMATIQUE (GICC):**

*Responsable scientifique:*

**Pr JL SAUMET**

**Université Claude Bernard Lyon 1**

**ISPB**

**Laboratoire de Physiologie - FRE 3075**

**8 avenue Rockefeller**

**69373 LYON CEDEX 08**

**Tél. : 04 78 77 72 44**

**Ligne directe 04 78 77 71 66**

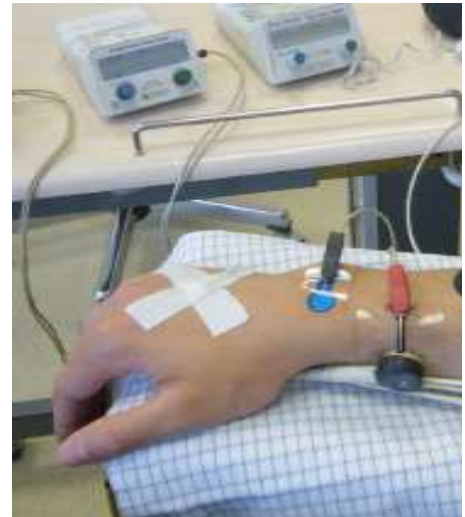
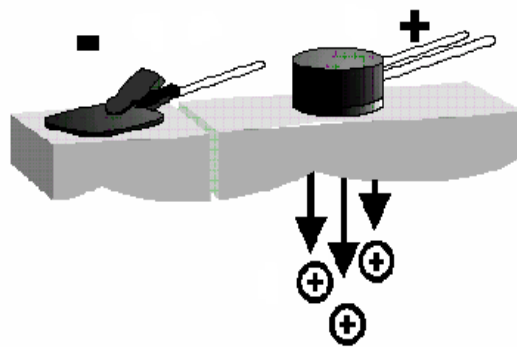
**Fax : 04 78 77 71 18**

**[jean-louis.saumet@univ-lyon1.fr](mailto:jean-louis.saumet@univ-lyon1.fr)**

# Introduction

En 2003, plus de 10 000 personnes âgées sont décédées au cours de la canicule. Ces décès ont en grande partie été impliqués par des fortes chaleurs et une mauvaise adaptation physiologique des sujets âgés à ces conditions climatiques particulières. La peau est un organe essentiel de contrôle de la thermorégulation. Il est donc légitime de penser que des modifications du débit sanguin cutané qui conditionne la sudation et les pertes thermiques puissent être à la base de cette mauvaise adaptation. De plus, il serait utile de préciser les déterminants (thérapeutiques, âge, poids...) qui jouent un rôle dans cette mauvaise adaptation chez les sujets âgés.

Notre laboratoire a développé des techniques d'étude de la physiologie microcirculatoire. Pour étudier la microcirculation cutanée, le laboratoire utilise l'iontophorèse couplée au laser Doppler (Figure 1).



## **Figure 1 : Couplage iontophorèse-laser Doppler au niveau anodal**

Le composé ionique chargé positivement est diffusé à travers la peau au niveau de l'anode (+) selon le principe de l'électrorépulsion des charges. Pour fermer le circuit électrique, la cathode (-) est fixée sur un patch de référence placé à distance.

La sonde laser Doppler est placée sur l'anode.

Celle-ci présente un double intérêt : c'est une méthode non invasive et elle teste différentes voies de régulation vasculaire grâce à l'utilisation locale de substances pharmacologiques spécifiques. Cette technique permet d'explorer deux types de réponses endothéliales : la réponse endothéliale-dépendante et la réponse endothéliale-indépendante. La réponse endothéliale dépendante est étudiée par l'intermédiaire de l'iontophorèse à l'acétylcholine (ACh) (Kvandal, Stefanovska et al. 2003) et du pic d'hyperhémie post-

occlusive (Yvonne-Tee, Rasool et al. 2005), (Cracowski, Minson et al. 2006) alors que la réponse endothéliale-indépendante est évaluée grâce aux molécules donneuses de NO notamment le nitroprussiate de sodium (SNP) (Kvandal, Stefanovska et al. 2003). Cependant, cette technique qui permet l'électro-répulsion de molécules chargées entraîne non seulement une réponse spécifique à la molécule utilisée mais aussi (pour certaines intensités ou modalités d'application du courant) une réponse non spécifique liée à l'effet du courant électrique monopolaire (dit « galvanique ») appliqué (Grossmann, Jamieson et al. 1995; Berliner 1997; Asberg, Holm et al. 1999). La réponse non spécifique liée à l'effet d'un courant anodal continu a été largement étudiée dans notre laboratoire (Durand, Fromy et al. 2002; Durand, Fromy et al. 2002; Durand, Fromy et al. 2002; Durand, Fromy et al. 2002), (Durand, Fromy et al. 2002; Durand, Fromy et al. 2002; Durand, Fromy et al. 2002; Durand, Fromy et al. 2002; Tartas, Durand et al. 2004) et est dénommée CIV pour « Current-Induced Vasodilatation ». Cette vasodilatation au courant se produirait par l'intermédiaire des fibres primaires afférentes (Berliner 1997; Hamdy, Abou-Elenin et al. 2001) Ces fibres afférentes libéreraient alors des neuropeptides comme le CGRP (Calcitonin gene-related peptid) ou la substance P, qui agiraient ensuite comme vasodilatateur (Holzer, 1997). Ces substances auraient aussi une action sur la fibre afférente elle-même et pourraient moduler la réponse neurale. Cette modulation se ferait notamment par l'intermédiaire de la voie des prostaglandines (Durand, Fromy et al. 2002). La nécessité d'un système nerveux fonctionnel semble être requise pour obtenir la CIV. La réponse au courant permet donc d'étudier l'intégrité neurovasculaire.

Lors de la soumission initiale de ce travail nous avons convenu de réaliser plusieurs protocoles :

### **1/ Etude de la vasodilatation cutanée chez le sujet jeune :**

Dans cette étude nous avons prévu de réaliser les tests après prise de 75 mg par jour d'aspirine, 75 mg par jour de plavix ou prise d'un placebo pendant quatre jours dans un groupe de 10 sujets sains jeunes. Les sujets devaient participer aux trois séries expérimentales séparées par une période sans traitement d'au moins trois semaines. L'âge des sujets est compris entre 18 et 35 ans. La capacité vasomotrice de la peau est évaluée par le test de vasodilatation galvanique mis au point au laboratoire. Ce test utilisé dans les travaux de Durand et coll (BJP 2002 et AJP 2003) n'entraîne ni douleur ni inflammation. Les pics de vasodilatation observés dans chaque groupe étaient comparés par un test de Student alors que l'évolution du débit sanguin cutané au cours du test sera analysée à l'aide d'un test ANOVA et s'il est significatif ( $p < 0,05$ ), il sera suivi d'un post test de N. Keuls.

### **2/ Etude de la vasodilatation cutanée chez le sujet âgé :**

Cette étude était prévue sur deux groupes d'âge de sujets. Selon la définition et les conventions de Gériatrie, l'âge des jeunes vieux, appelés « âgés » était compris entre 60 et 75 ans, alors que les plus de 75 ans seront appelés « très âgés ». Dans chacun de ces groupes d'âge, 20 sujets recevaient un traitement chronique avec un antiagrégant plaquettaire (aspirine ou plavix). Un groupe de 20 sujets non traités de chaque groupe d'âge servirait de groupe témoin pour s'assurer que l'effet observé serait lié au traitement et non à l'effet de l'âge sur la vasomotricité. Il y aurait donc six groupes : très âgés aspirine, très âgés plavix, très âgés sans traitement antiagrégant plaquettaire, âgés aspirine, âgés plavix, âgés sans traitement antiagrégant plaquettaire. Les pics de vasodilatation observés dans chaque groupe étaient comparés par un test de Student alors que l'évolution du débit sanguin cutané au cours du test

sera analysée à l'aide d'un test ANOVA et s'il est significatif ( $p < 0,05$ ), suivi d'un post test de N. Keuls.

En pratique, nous avons réalisé les protocoles prévus et d'autres études complémentaires détaillées ci dessous. Voici donc l'ensemble des protocoles que nous avons réalisé : Certains résultats sont publiés, d'autres en cours de publication, d'autres enfin non encore soumis)

- 1) **Etude chez des sujets entre 18 et 35 ans des modifications microcirculatoires engendrées par la prise de traitement antiagrégant antipyrétique (aspirine) et par la prise anti-agrégant non antipyrétique (clopidogrel). (*Publié dans American Journal of Physiology*)**
- 2) **Etude de la vasodilatation cutanée chez le sujet âgé: Celle-ci a été divisé en plusieurs sous études afin de préciser de nombreux mécanismes:**
  - a. Etude de la vasodilatation induite par la pression cutanée chez les sujets âgés. (*en révision favorable pour publication dans Journal of Investigative Dermatology*)
  - b. Etude de l'ensemble des réponses microcirculatoires testées par iontophorèses évaluant les réponses endothéliale-dépendante, endothéliale indépendante, et neurovasculaire dans une population générale de patients.
  - c. Etude des modifications engendrées par le diabète et la prise concomitante d'aspirine à faible dose (*En révision dans Microvascular Research*)

# **1) Etude chez des sujets entre 18 et 35 ans des modifications microcirculatoires engendrées par la prise de traitement antiagrégant antipyrétique (aspirine) et par la prise d'anti-agrégant non antipyrétique (clopidogrel).**

**Introduction :** Il existe des différents mécanismes permettant une vasodilatation cutanée chez l'homme. La vasodilatation cutanée endothéliale dépendante, testée par l'acétylcholine, la vasodilatation cutanée endothéliale indépendante testée par le nitroprussiate de sodium et la vasodilatation cutanée neurovasculaire testée par la réponse au courant. Y a-t-il chez des sujets sains d'âge compris entre 18 et 35 ans des modifications de ces différentes réponses en fonction de la prise soit d'un placebo soit d'un antiagrégant plaquettaire antipyrétique (aspirine) soit d'un antiagrégant plaquettaire non anti-pyrétique (clopidogrel) ?

**Matériels et méthodes :** Nous avons réalisés une étude cross-over prospective randomisée en double aveugle. Lors de la première étape, les sujets prenaient le placebo, puis lors de la deuxième l'aspirine (75mg, 1 prise) et enfin lors de la troisième du clopidogrel (98mg, 1prise). Les réponses microcirculatoires étaient ensuite mesurées.

**Résultats :** La réponse neurovasculaire testée par le courant notée CIV (Current induced vasodilatation) était différente entre les sujets sous aspirine et ceux sous placebo ainsi qu'entre ceux sous aspirine et ceux sous clopidogrel. Cependant, il n'y a avait pas de différence de réponse entre les sujets sous clopidogrel et ceux sous placebo. Ces résultats sont présentés dans la figure suivante:

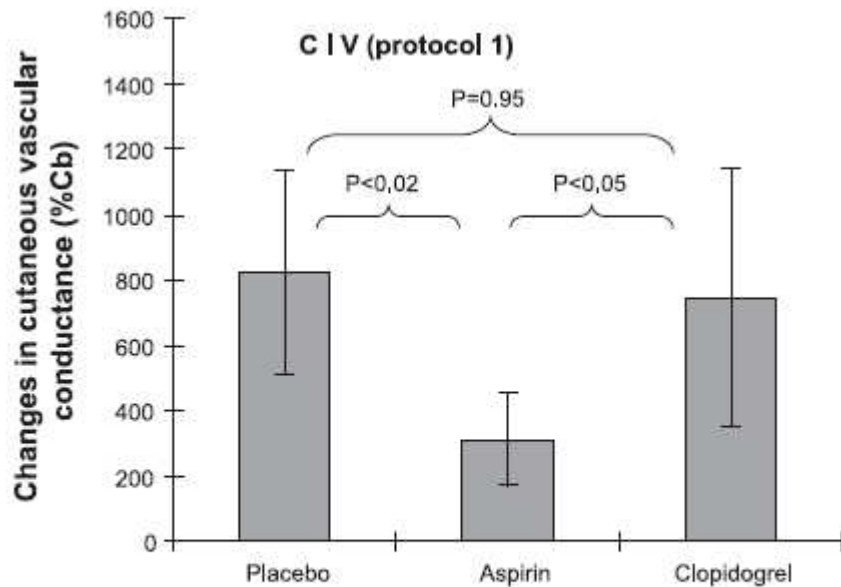


Fig. 1. Values are expressed as means  $\pm$  SE for responses of maximal cutaneous vascular conductance to two consecutive applications of 1-min monopolar anodal current (CIV) following placebo, aspirin, or clopidogrel in *protocol 1*. Results are presented as a percentage from baseline value.

La réponse endothéliale dépendante n'était pas statistiquement modifiée entre les sujets sous placebo, les sujets sous aspirine comme le montre la figure suivante:

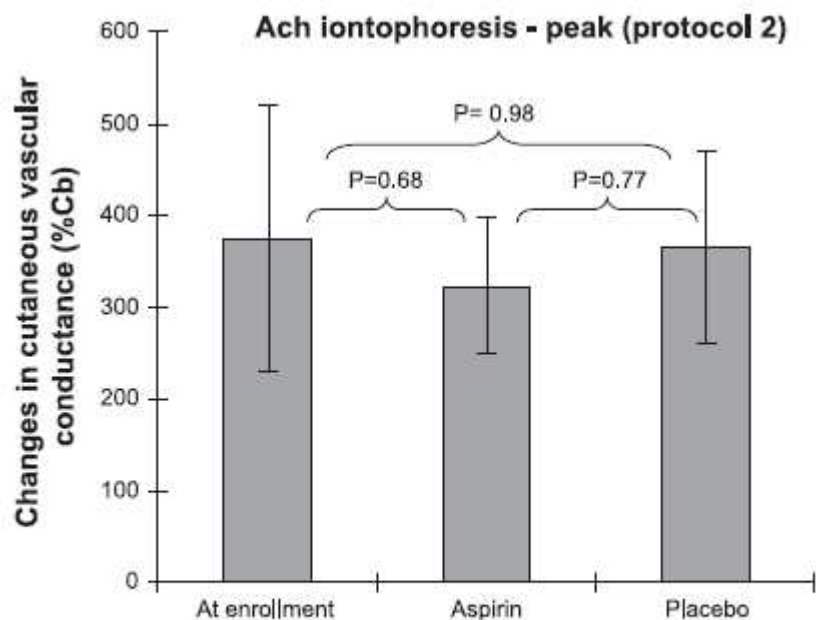


Fig. 3. Values are expressed as means  $\pm$  SE for responses of maximal cutaneous vascular conductance during ACh iontophoresis at enrollment and following aspirin or placebo in *protocol 2*. Results are presented as a percentage from baseline value.

Conclusion: La réponse neurovasculaire cutanée est diminuée chez des sujets jeunes prenant de l'aspirine alors qu'elle ne l'est pas sous clopidogrel.

Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale dont voici l'abstract :

## Platelet inhibition by low-dose aspirin but not by clopidogrel reduces the axon-reflex current-induced vasodilation in humans

P. Rousseau,<sup>1\*</sup> M. Tartas,<sup>1\*</sup> B. Fromy,<sup>4\*</sup> A. Godon,<sup>2</sup> M.-A. Custaud,<sup>1,3</sup> J. L. Saumet,<sup>1,4</sup> and P. Abraham<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Vascular Investigations, <sup>2</sup>Laboratory of Haemostasis University Hospital of Angers, France, <sup>3</sup>Integrative Neurovascular Biology, UMR Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 6214 - Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 771, Medical School, University of Angers, France; and <sup>4</sup>Neurovascular Interactions Formation de Recherche en Evolution CNRS 3075, University of Lyon 1, France

**Rousseau P, Tartas M, Fromy B, Godon A, Custaud M-A, Saumet JL, Abraham P.** Platelet inhibition by low-dose aspirin but not by clopidogrel reduces the axon-reflex current-induced vasodilation in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1420–R1426, 2008. First published February 6, 2008; doi:10.1152/ajpregu.00810.2007.—We previously showed a prolonged inhibition of current-induced vasodilation (CIV) after a single oral high dose of aspirin. In this study, we tested the hypothesis of platelet involvement in CIV. Nine healthy volunteers took 75 mg aspirin/day, 98 mg of clopidogrel bisulfate/day, or placebo for 4 days. CIV was induced by two consecutive 1-min anodal current applications (0.08 mA/cm<sup>2</sup>) through deionized water with a 10-min interval. CIV was measured with laser Doppler flowmetry and expressed as a percentage of baseline cutaneous vascular conductance: %C<sub>b</sub>. In a second experiment in 10 volunteers, aspirin and placebo were given as in *experiment 1*, but a 26-h delay from the last aspirin intake elapsed before ACh iontophoresis and postocclusive hyperemia were studied in parallel to CIV. In *experiment 1*, the means ± SE amplitude of CIV was 822 ± 314, 313 ± 144, and 746 ± 397%C<sub>b</sub> with placebo, aspirin ( $P < 0.05$  from placebo and clopidogrel), and clopidogrel (NS from placebo), respectively. In *experiment 2*, CIV impairment with aspirin was confirmed: CIV amplitudes were 300 ± 99, and 916 ± 528%C<sub>b</sub> under aspirin and placebo, respectively ( $P < 0.05$ ), whereas vasodilation to ACh iontophoresis (322 ± 74 and 365 ± 104%C<sub>b</sub>) and peak postocclusive hyperemia (491 ± 137 and 661 ± 248%C<sub>b</sub>) were not different between aspirin and placebo, respectively. Low-dose aspirin, even 26 h after oral administration, impairs CIV, while ACh-mediated vasodilation and postocclusive hyperemia are preserved. If platelets are involved in the neurovascular mechanism triggered by galvanic current application in humans, it is likely to occur through the cyclooxygenase but not the ADP pathway.

microcirculation; axon reflex; platelets; skin

### GRANTS

The present project was supported by the Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. The experiments were performed at, and promoted by, the University Hospital in Angers through Projet Hospitalier de Recherche Clinique 2005/03. P. Abraham benefits from a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique.

---

## 2°) Etude de la vasodilatation cutanée chez le sujet âgé:

a) Première étude : Etude de la vasodilatation induite par la pression cutanée chez les sujets âgés

EN REVISION POUR "J INVESTIG DERMATOL"

### **Aging alters the ability of the skin to resist to pressure-induced ischemia in humans**

Béregère Fromy<sup>1,2,3</sup>, PhD; Dominique Sigauco-Roussel<sup>1,2,3</sup>, PhD; Marie-Line Gaubert<sup>1,2,3</sup>, MD; Pascal Rousseau<sup>4</sup>, MD; Pierre Abraham<sup>4</sup>, MD, PhD; Daniel Benzoni<sup>1,2,3</sup>, PhD; Gilles Berrut<sup>5</sup>, MD, PhD; Jean Louis Saumet,<sup>1,2,3</sup> MD, PhD.

#### **Affiliations:**

<sup>1</sup>Neurovascular interactions, FRE CNRS 3075, Lyon, France.

<sup>2</sup>Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France.

<sup>3</sup>Institut des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (ISBP), Lyon, France.

<sup>4</sup>Laboratoire d'explorations vasculaires, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Angers, France.

<sup>5</sup>Pôle des soins gériatriques, Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) de Nantes, France.

**Correspondence to** Béregère Fromy, Neurovascular interactions, FRE CNRS 3075, University Claude Bernard Lyon 1, 8 avenue Rockefeller, F-69373 Lyon cedex 08, France. Telephone number: (33) 478 785690; Fax number: (33) 478 777118  
Email address: [berengere.fromy@recherche.univ-lyon1.fr](mailto:berengere.fromy@recherche.univ-lyon1.fr)

**Short title:** Aging alters pressure-induced vasodilation

## **ABSTRACT**

Aged skin is particularly exposed to pressure ulcers in contrast to healthy skin that is protected from pressure-induced ischemic damage because of the presence of pressure-induced vasodilation (PIV) relying on small sensory nerve fibers and endothelial function. Since aging alters both nervous and vascular systems, we aimed to test the ability of the skin to adapt to local applied pressure by assessing PIV in non-neuropathic and neuropathic older subjects compared to young subjects. We studied 34 subjects divided according to their age (20-35 or 60-75 years) and the presence of peripheral neuropathy. Laser Doppler flowmetry was used to evaluate the cutaneous responses to local pressure application, acetylcholine and local heating. Quantitative sensory tests were used to evaluate the sensory nerve fiber function. The non neuropathic older subjects had an impaired PIV (12±7%) compared to young subjects (62±4%). In presence of peripheral neuropathy, the older subjects were totally deprived of PIV, leading to an early pressure-induced cutaneous ischemia (-31±10%). This inability of the skin to adapt to localized pressure in older subjects is related to the severity of the sensory fiber dysfunction rather than the endothelial dysfunction that was comparable between the non neuropathic and neuropathic older subjects.



## Introduction

Elderly are particularly exposed for developing cutaneous pressure ulcers (Allman, 1989) that represents a major medical, social and worldwide economical problem to the health care system (Allman *et al.*, 1999). Susceptibility to pressure ulcers comes from a combination of external factors (pressure, friction, shear force, and moisture), and internal factors (e.g. fever, malnutrition, anaemia, and endothelial dysfunction). Although several risk factors for the formation of pressure ulcers continue to be elucidated in a recent experimental study (Saito *et al.*, 2008), the underlying pathophysiological mechanisms remain unclear and a better understanding of the physiological changes that occur with aging appears crucial to further reduce the incidence of pressure ulcer in elderly people, since the best strategy to avoid them is prevention. Besides the age-related endothelial dysfunction (Taddei *et al.*, 1997; Brandes *et al.*, 2005), aging markedly influences several morphological and functional features of the peripheral nervous system increasing the susceptibility to peripheral neuropathy (Verdu *et al.*, 2000; Melcangi *et al.*, 2003; Di Iorio *et al.*, 2006). In the cutaneous microcirculation, some human thermoregulatory studies reported diminished local sensory axon reflex-mediated vasodilation with aging (Minson *et al.*, 2001; Minson *et al.*, 2002).

We reported a novel relationship that exists between cutaneous mechanosensitivity and vasodilation, referred to as pressure-induced vasodilation (PIV). In healthy conditions, when a non-nociceptive external pressure is locally applied on the skin, the cutaneous microvessels vasodilate, as observed in humans (Fromy *et al.*, 1998) and in rodents (Fromy *et al.*, 2000b; Sigaudou-Roussel *et al.*, 2004). When this pressure-induced increase in cutaneous blood flow is present, it thereby protects the skin from pressure-induced ischemic damage by delaying the occurrence of tissue ischemia from direct pressure application. In contrast, subjects deprived of PIV such as diabetic patients (Fromy *et al.*, 2002; Koitka *et al.*, 2004) are exposed to severe cutaneous ischemia, which could lead to pressure ulcer formation. We recently demonstrated that PIV was altered in the skin of old mice without neuropathy that were thus exposed to pressure-induced severe ischemia compared to young adult mice (Gaubert *et al.*, 2007). An inability of the skin to resist to pressure-induced ischemia due to aging in humans could explain the higher risk for developing pressure ulcers in older subjects.

PIV depends on the activation by pressure of sensory C-fibers (Fromy *et al.*, 1998; Fromy *et al.*, 2000b), leading to the release of neurotransmitters (Fromy *et al.*, 2000b; Fizanne *et al.*, 2004) that acts at the endothelial level to synthesize and release endothelial factors (Fromy *et al.*, 1998; Fromy *et al.*, 2000b) inducing smooth muscle relaxation of the cutaneous microvessels to protect the skin against pressure. Since an intact neurovascular interaction is crucial for the PIV development, its assessment represents a good end-point measurement to test the ability or inability of the cutaneous blood flow to adapt to local applied pressure in a novel and integrative way.

The aim of this study was to test the ability or inability of the cutaneous blood flow to adapt to local applied pressure by assessing PIV in non-neuropathic and neuropathic older subjects (60-75 years) that were clinically discriminated by neuropathy symptom scores compared to young subjects (20-35 years).

## RESULTS

### General characteristics

The general characteristics of all included participants are presented in Table 1. There was no difference for weight, height, body mass index and MMS between the groups. Framingham score increased with aging. The diastolic ABP and HR were not different between the groups. Although an expected small increase in systolic ABP in older adults compared to young subjects was observed, all the values remained in the normal ranges showing no chronic arterial hypertension in the included participants. All these parameters did not change over the experiment within each group.

**Table 1. Subject characteristics**

	young ( <i>n</i> =12)	non neuropathic older ( <i>n</i> =12)	neuropathic older ( <i>n</i> =10)
Age (years)	26±1	64±1 ***	68±2 ***
Height (cm)	171±2	163±3	165±4
Weight (kg)	65±2	76±5	68±5
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22±1	26±1	25±1
MMS	30±0	30±0	29±1
Framingham score	0±0	19±3***	15±2***
Systolic ABP (mmHg)	119±2	133±4 **	130±4 *
Diastolic ABP (mmHg)	72±2	77±3	74±2
Heart rate (bpm)	70±3	67±2	70±3
Total cholesterol (mmol/L)	4.7±0.2	5.4±0.3	5.4±0.2
HDL cholesterol (mmol/L)	1.7±0.1	1.8±0.1	1.6±0.1
Triglycerides (mmol/L)	0.9±0.1	1.3±0.1	1.2±0.2
Glucose (mmol/L)	4.7±0.1	5.0±0.2	5.0±0.3
Fibrinogen (mmol/L)	3.0±0.2	3.9±0.2	3.7±0.3
CRP (nmol/L)	36.7±5.9	41.2±3.4	40.2±9.1
Proteins (g/L)	0.08±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01
Basal cutaneous temperature (°C)	34.9±0.1	34.7±0.1	34.9±0.1
Basal CVC (probe 415) (a.u./mmHg)	0.75±0.05	0.58±0.04	0.60±0.08
Basal CVC (probe 481-1) (a.u./mmHg)	0.11±0.01	0.13±0.01	0.13±0.02

Statistically significant changes relative to young subjects (\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ ) are indicated using one-way ANOVA. Data are expressed as mean±SEM for continuous variables. MMS and CVC indicate mini-mental state and cutaneous vascular conductance, respectively.

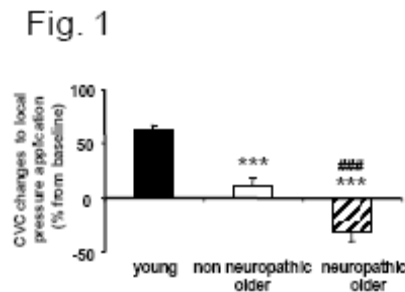
Total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides and glucose levels were not different between the groups showing no hyperlipidemia in the included participants. The levels of

fibrinogen, C-reactive protein (CRP) and proteins remained in the normal ranges in all groups, excluding complications such as coagulation and inflammatory disorders.

For each type of laser Doppler probe, basal cutaneous vascular conductance (CVC) was not different between groups. The difference in the index of CVC was due to the use of two different kinds of laser Doppler probes (481-1 and 415). There was no difference in the basal cutaneous temperature.

### PIV assessment

In young subjects, CVC increased progressively in response to a local applied pressure and reached a maximal increase from baseline at  $4.2 \pm 0.3$  kPa corresponding to a PIV of  $62 \pm 4\%$  (Figure 1).



**Figure 1.** Percentage of vasodilation in response to local pressure application (4.2 kPa) in young ( $n=12$ ), non neuropathic older ( $n=12$ ) and neuropathic older ( $n=10$ ) subjects. Statistically significant changes relative to young subjects ( $*** P<0.001$ ) and non neuropathic older subjects ( $#### P<0.001$ ) are indicated using one-way ANOVA. CVC, cutaneous vascular conductance. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

At 4.2 kPa, CVC in older subjects without neuropathy was not different from the basal CVC, representing a change in the CVC of  $12 \pm 7\%$  (Figure 1), which was reduced compared to young subjects ( $P<0.001$ ).

In neuropathic older subjects, CVC directly decreased in response to local pressure application. At 4.2 kPa (corresponding to the local applied pressure to obtain the maximal PIV in young subjects), the decrease in CVC from baseline was  $-31 \pm 10\%$  (Figure 1), which was different compared to young subjects ( $P<0.001$ ) and older subjects without neuropathy ( $P<0.001$ ).

### Assessment of the sensory function

The Neuropathy Symptom Score (NSS) and Neuropathy Disability Score (NDS) were increased in non neuropathic older subjects and further increased in neuropathic older subjects compared to young subjects (Table 2). Compared to young subjects, the relative warm

detection threshold was increased in non neuropathic older subjects ( $P<0.05$ ) and further increased in neuropathic older subjects ( $P<0.001$ ) (Table 2). In contrast, the tactile, vibratory and relative cool detection thresholds were only increased in neuropathic older subjects compared to young subjects (Table 2).

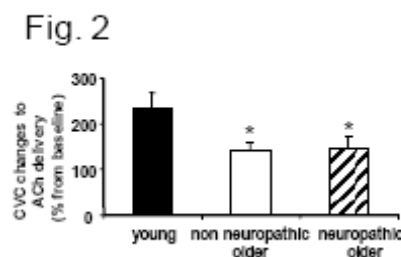
**Table 2. Results of sensory function assessment**

	young ( $n=12$ )	non neuropathic older ( $n=12$ )	neuropathic older ( $n=10$ )
NSS	0.5±0.3	2.5±0.6***	6.8±1.0* ###
NDS	0.1±0.1	2.2±0.6***	4.0±0.7** ##
Tactile threshold (g/mm <sup>2</sup> )	1.7±0.1	1.9±0.1	2.3±0.2*
Vibratory threshold (μm)	3.9±0.2	9.2±1.6	11.9±4.7*
Basal cutaneous temperature (°C)	31.5±0.4	31.1±0.3	31.5±0.2
Warm detection threshold (°C)	2.0±0.2	5.7±1.2*	10.2±2.0*** #
Cool detection threshold (°C)	0.5±0.1	1.0±0.2	2.3±1.0*

Statistically significant changes relative to young subjects (\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$ ) and non neuropathic older subjects (#  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ , ###  $P<0.001$ ) are indicated using one-way ANOVA. Data are expressed as mean±SEM for all variables. NSS and NDS indicate Neuropathy Symptom Score and Neuropathy Disability Score, respectively.

### Acetylcholine (ACh)-mediated vasodilation assessment

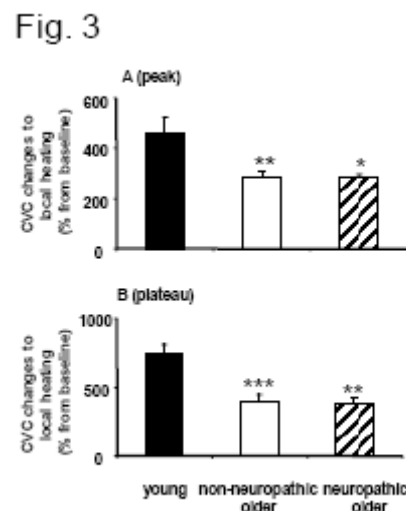
The iontophoretic delivery of ACh increased CVC in all groups. However the corresponding endothelium-dependent vasodilation was reduced in non neuropathic ( $141±19%$ ,  $P<0.05$ ) and neuropathic ( $145±28%$ ,  $P<0.05$ ) older subjects compared to that in young subjects ( $234±35%$ , Figure 2).



**Figure 2.** Percentage of vasodilation in response to iontophoretic delivery of acetylcholine (ACh) in young ( $n=12$ ), non neuropathic older ( $n=12$ ) and neuropathic older ( $n=10$ ) subjects. Statistically significant changes relative to young subjects (\*  $P<0.05$ ) are indicated using one-way ANOVA. CVC, cutaneous vascular conductance. Data are expressed as mean±SEM.

## Local heating-mediated vasodilation assessment

Local heating to 44°C increased CVC in all groups in two phases. The first phase (peak) of the vasodilatation in response to local heating was reduced in older subjects without neuropathy ( $282\pm 28\%$ ,  $p<0.01$ ) and neuropathic older subjects ( $283\pm 14\%$ ,  $p<0.05$ ) compared to that in young subjects ( $461\pm 62\%$ , Figure 3a). The second phase (plateau) of the vasodilatation in response to local heating was reduced in older subjects without neuropathy ( $392\pm 51\%$ ,  $p<0.01$ ) and neuropathic older subjects ( $377\pm 41\%$ ,  $p<0.01$ ) compared to that in young subjects ( $736\pm 70\%$ , Figure 3b).



**Figure 3a.** Percentage of the initial vasodilation (peak) in response to local heating to 44°C in young ( $n=12$ ), non neuropathic older ( $n=12$ ) and neuropathic older ( $n=10$ ) subjects.

**3b.** Percentage of the prolonged vasodilation (plateau) in response to local heating to 44°C in young ( $n=12$ ), non neuropathic older ( $n=12$ ) and neuropathic older ( $n=10$ ) subjects.

Statistically significant changes relative to young subjects (\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ) are indicated using one-way ANOVA. CVC, cutaneous vascular conductance. Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

## Sodium nitroprusside (SNP)-mediated vasodilation assessment

Iontophoretic delivery of SNP, an exogenous NO donor, increased CVC in young subjects ( $345\pm 55\%$ ), non neuropathic ( $305\pm 38\%$ ) and neuropathic ( $308\pm 83\%$ ) older subjects, showing no difference in endothelium-independent vasodilation between the groups.

## DISCUSSION

Our findings demonstrated that the older subjects clinically diagnosed non neuropathic had an impaired PIV ( $12\pm 7\%$ ) compared to young subjects ( $62\pm 4\%$ ), showing a reduced ability of the skin to adapt to local pressure with aging. In presence of peripheral neuropathy, the older subjects were totally deprived of PIV, leading to an early pressure-induced cutaneous ischemia ( $-31\pm 10\%$ ). The non neuropathic older subjects had a functional abnormality of

small sensory fibers, whereas the neuropathic older subjects had a severe sensory deficit affecting both small and large sensory fiber function. The cutaneous endothelium-dependent responses to acetylcholine and local heating were equally reduced in both groups of older subjects, showing a comparable endothelial dysfunction at this stage of aging.

The neuropathy scores and clinical routine tests that are advocated to define neuropathic state focus on the function of large myelinated fibers and do not reflect small fiber dysfunction. Therefore, even in presence of small sensory fiber dysfunction, the NSS and NDS scores may be normal unless larger fibers are altered. Although the quantitative sensory testing is limited by the subjectiveness of the individual's responses, it is admitted that the sensitivities to vibration and tactile stimulation are used to assess the function of large myelinated fibers, whereas the cool and warm detection thresholds assess the function of small myelinated A $\delta$  fibers and unmyelinated C fibers, respectively (Verdugo *et al.*, 1992; Campero *et al.*, 1996). In the non neuropathic older subjects (NNS and NDS < 5), we showed that in contrast to cool, tactile and vibratory thresholds, the relative warm detection thresholds were significantly increased, confirming the age-related thermal hypoalgesia (Rolke *et al.*, 2006). Aging induced fiber density reductions that occurred among all types of innervation, with epidermal C fiber endings preferentially diminishing earlier than presumptive A $\delta$  fiber endings (Pare *et al.*, 2007). The thermal hypoalgesia reflecting a dysfunction of unmyelinated C fibers in the non neuropathic older subjects could be associated with this loss of epidermal C fiber terminals, as reported in diabetic patients (Levy *et al.*, 1989). The dysfunction of unmyelinated C fibers was strengthened by the altered initial phase observed in the biphasic response to local heating of the skin in older subjects. Indeed this initial phase of the local heating-mediated vasodilation appears to be mediated by axon reflexes depending on antidromic release of neurotransmitter release by afferent sensory nerves, such as calcitonin gene-related peptide and substance P (Kellogg *et al.*, 1999; Minson *et al.*, 2001). We previously demonstrated that PIV involves the capsaicin-sensitive sensory fibers (mainly C fibers) and neurotransmitters such as calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (Fromy *et al.*, 1998; Fromy *et al.*, 2000b; Fizanne *et al.*, 2004; Demiot *et al.*, 2006). Therefore, the age-related impairment of these C fibers and/or associated neuromediators likely participated to the reduction of PIV (12%) in the non neuropathic older subjects. We cannot exclude that the age-related reduction in the epidermal thickness (Waller *et al.*, 2005) participated to the reduction of PIV in the older subjects. In contrast, the age was matched in non neuropathic and neuropathic older subjects, showing that the age-related thinning of the skin cannot explain the dramatic PIV alteration in the neuropathic older subjects compared to the non neuropathic ones.

In the neuropathic older subjects (NNS and/or NDS>5), the cool, tactile and vibratory thresholds were increased as expected, showing the functional abnormality of large and small myelinated fibers. In parallel, the relative warm detection threshold was further increased, showing an aggravation in the dysfunction of unmyelinated C fibers that could explain the dramatic aggravation of PIV response (-31%) in the neuropathic older subjects compared to the non neuropathic older subjects. Accordingly, the impairment of the PIV was much more dramatic in diabetic mice with severe neuropathy (-33%) than in diabetic mice without neuropathy (-8%) (Demiot *et al.*, 2006). In young healthy subjects, the local blockade of capsaicin-sensitive C fiber activity by prolonged application of capsaicin cream for 48 to 56 hours totally abolished PIV (-45%), which was comparable to the one observed following local anesthesia by prolonged application of lidocaine-prilocaine (EMLA) cream for 90 to 100 minutes (Fromy *et al.*, 1998). Since an alteration of large nerve fiber function did not modify PIV development (Demiot *et al.*, 2006), it suggested that the aggravation of C fiber

dysfunction was mainly responsible for the aggravation of PIV rather than the associated myelinated fiber dysfunction. Since it is known that the cutaneous innervation exerts influence on the thickness of the epidermis (Huang *et al.*, 1999), we cannot exclude that the aggravation of the inability of the skin to adapt to pressure could be associated with a thinning of the skin that could be emphasized in the neuropathic older subjects.

The initial rise of the local heating response was equally reduced in both groups of older subjects, showing a comparable alteration of the axon reflex-mediated mechanisms triggered by the local heating and cannot explain the aggravation of the inability of the skin to adapt to pressure in the aging process in presence of peripheral neuropathy.

Regarding the cutaneous microcirculation, we showed that the SNP-mediated vasodilation was unchanged in older subjects, showing that its overall vasodilator capacity was preserved with aging as already reported (Taddei *et al.*, 1995; Cernadas *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 2002; Gaubert *et al.*, 2007), although some studies reported that the cutaneous vessel reactivity to nitroprusside was diminished later in the aging process (Algotsson *et al.*, 1995; Minson *et al.*, 2002). In the present study, the preservation of SNP-mediated response at this stage of aging indicated that altered vasodilator responses would not reflect a non-specific reduction in vessel dilatory responsiveness discarding a possible disturbance in guanylate cyclase activity.

We observed that the cutaneous ACh-mediated vasodilation was equally impaired in both groups of older subjects, showing a comparable reduction (about 40%) of the endothelial function. In our previous experimental study, we reported a reduction of 46% of the cutaneous ACh-mediated vasodilation with aging in absence of peripheral neuropathy (Gaubert *et al.*, 2007). This endothelial dysfunction with aging, as well as the increased Framingham's score (Table 1), demonstrated a comparable age-related increased incidence of cardiovascular diseases whatever the state of the nervous functions (DeSouza *et al.*, 2000; Taddei *et al.*, 2001). Accordingly, a mild endothelial dysfunction in the cutaneous microcirculation was previously reported in elderly subjects (>65 years) compared to subjects younger than 50 years (Rossi *et al.*, 2002). This age-related impairment of endothelium-dependent vasodilation was also shown by measuring forearm blood flow responses to intra-arterial infusions of ACh (Taddei *et al.*, 1995; Taddei *et al.*, 1997; DeSouza *et al.*, 2000). In addition, we also showed that the prolonged plateau phase of the biphasic vasodilation observed in response to local heating of the skin to 44°C was decreased in the two groups of older subjects compared to young adults, as previously reported after 30 minutes of prolonged local heating at 42°C in the older sedentary subjects (about 60 years old) compared to young subjects (26 years) (Black *et al.*, 2008). The plateau in response to local heating of the skin appears to be mediated by NO generation (Kellogg *et al.*, 1999; Minson *et al.*, 2001) largely attributed to endothelial NOS (Kellogg *et al.*, 2008). Therefore, the equally reduced ACh-mediated vasodilation and the impaired plateau to local heating in the two groups of older subjects demonstrated a comparable endothelial dysfunction likely based on an alteration of the NO pathway. This comparable age-related endothelial dysfunction could partially explain the reduction of PIV observed in older subjects, since we recently reported that the impairment of PIV was linked to an endothelial dysfunction without neuropathy in old and short-term diabetic mice (Sigaucho-Roussel *et al.*, 2004; Gaubert *et al.*, 2007), but it cannot explain the dramatic PIV alteration in the neuropathic older subjects compared to the non neuropathic ones. This strengthens the critical role of the severity in the sensory deficit in the total inability of the skin to adapt to localized pressure in the aging process.

In conclusion, the physiological ability to protect the skin against localized pressures is altered in the 60-75 year-old subjects leading to early ischemia. Our results showed that for a comparable endothelial dysfunction, the greater the functional abnormality of the small sensory fibers in older subjects, the greater the danger to the skin from localized pressure application. Older subjects who present a severe sensory deficit are particularly at risk for pressure ulcer occurrence because of impaired local pressure-induced vasodilation (PIV) combined with the lack of “warning” system which would normally occur via paresthesia with prolonged local pressure application. Thus, these individuals are at the greatest risk for pressure-induced cutaneous lesions because of combined dysfunction in many of the cutaneous physiological mechanisms that protect healthy skin from pressure-induced ischemic damage.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Participants**

A prospective study was conducted among 34 subjects that were divided according to their age and the presence of peripheral neuropathy. The presence of peripheral neuropathy was clinically diagnosed using the Neuropathy Symptom Score (NSS) and the Neuropathy Disability Score (NDS) (1988). Three groups of subjects were then studied: 1) young subjects (20-35 years) without peripheral neuropathy (NSS and NDS less than five) (8 men; 4 women); 2) older subjects (60-75 years) without peripheral neuropathy (NSS and NDS less than five) (6 men; 6 women); 3) older subjects (60-75 years) with peripheral neuropathy (NSS and/or NDS of five or more) (4 men; 6 women). All healthy young and some older volunteers were recruited by press advertising among. Some older subjects were also recruited from the Department of Geriatrics of the University Hospital of Angers, France. The included volunteers had not taken any non-steroidal anti-inflammatory drugs in the week before the beginning of this study to prevent direct pharmacological effects on PIV (Fromy *et al.*, 2000b). The subjects taken psychoactive drugs, which impair attention and could particularly influence the measurements of the sensory function, were not included.

The investigation conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. The study was approved by the local scientific and ethics committees (n°2005/18 CPP) and registered with the American National Institutes of Health database under reference No. NCT00266071. All participants gave their written, informed consent.

### **Medical visit**

One day prior inclusion, all participants underwent a complete medical screening including urinary and blood chemistry in order to exclude any history or clinical sign of respiratory or cardiac failure, inflammatory disorders, peripheral macrovascular disease, vascular claudication, psychological disorder or tremor. In addition, the exclusion criteria were diabetes, chronic arterial hypertension and smoking.

To evaluate cardiovascular risk, the Framingham score was calculated in all participants using baseline cardiac risk factors including age, sex, smoking status and history, total and HDL cholesterol, diabetes history and blood pressure. The cognitive function was evaluated by the mini-mental state (MMS) examination in all subjects. Subjects with severe (MMS<17) or mild cognitive impairment ( $18 < \text{or} = \text{MMS} < \text{or} = 23$ ) were not included in the present study.



### **Assessment of the cutaneous microcirculation**

To assess the cutaneous microcirculation, experiments were performed in a quiet warm temperature-controlled room (27.5-29.5°C) with the subjects in the supine position, and after at least 45 min of rest and acclimatization. For 30 minutes, the local cutaneous temperature was continuously recorded close to the cutaneous blood flow measurement site (forearm). The systolic and diastolic arterial blood pressure (ABP), as well as heart rate (HR), was monitored non-invasively on one finger of the left hand (opposite to the one used for the cutaneous blood flow measurements) every 10 minutes during the protocol. The laser Doppler signal expressed in arbitrary units (a.u.) was digitized with a 200 Hz sampling frequency using a computerized acquisition system (Biopac, Santa Barbara, CA, USA) and cutaneous blood flow was then expressed in cutaneous vascular conductance (CVC). Data collection started with a 1-min control period prior to the onset of increasing pressure, local heating to 44°C or iontophoretic delivery of acetylcholine (ACh) or sodium nitroprusside (SNP), and was continued for 30 minutes. In the same time that PIV assessment was performed on the dorsal aspect of the right hand, the cutaneous blood flow in response to ACh, local heating and SNP was recorded at three different sites on the volar aspect of the right forearm using a laser Doppler probe (481-1, Perimed, Sweden) placed at 3 cm from each other. The duration of iontophoretic stimulations was chosen for having no (anodal) or the smallest (cathodal) current-induced vasodilation at the reading point of ACh and SNP-induced maximal vasodilation, respectively.

### **PIV assessment for the neurovascular interaction testing**

To assess PIV, the cutaneous blood flow was continuously recorded in response to the local pressure application (11.1 Pa/s rate of pressure increase) in all groups. The local pressure application was applied on the 2<sup>nd</sup> or 3<sup>rd</sup> finger of the right hand using a laser Doppler probe (415, Perimed, Sweden) that was attached to an apparatus previously described in details (Fromy *et al.*, 2000a).

### **ACh-dependent vasodilation assessment**

To verify the endothelium-dependent capacities of the cutaneous microvessels to dilate, the cutaneous blood flow was measured in response to anodal iontophoretic delivery (100 µA; 20 s) of ACh (2%, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) in all groups.

### **Local heating-dependent vasodilation assessment**

The cutaneous blood flow was measured in response to the local heating at 44°C (Peritemp PF4005, Perimed, Sweden) in all groups.

### **Endothelium-independent vasodilation assessment**

The cutaneous blood flow was measured in response to cathodal iontophoretic delivery (100 µA; 20 s) of SNP (1%, Nitrate; SERB, Paris, France) in all groups.

### **Assessment of the sensory function**

To study the effect of aging on the sensory function at the site corresponding to microvascular assessment (right finger and forearm), a quantitative sensory testing (QST) including tactile, vibratory, warm and cool detection thresholds was assessed on the right upper extremities of all participants. The QST included a demonstration of each test at a practice area. Subjects looked at a spot on the wall or kept their eyes closed throughout the QST procedure. For all participants, the QST procedures were always performed by the same trained observer using the same equipment and standardized instructions to the subjects. The quantitative evaluation was tested using the Computer-Assisted Sensory Examination system IV (CASE IV system, Medical Electronics CO., Stillwater, USA) with the 4, 2, and 1 stepping algorithm with null stimuli (Dyck *et al.*, 1993a). The design, components, and software of CASE IV have been described previously (Dyck *et al.*, 1993b). To evaluate the vibration perception threshold the

mean of the three lowest voltages at which the patient could perceive the vibration stimulus on the distal part of the cubitus bone was recorded. The warm detection threshold was tested and the mean of the three lowest temperature perceived by the subjects of the dorsum of the hand was considered. The relative warm detection threshold, which was obtained by subtracting the basal cutaneous temperature, was used for analysis. The same procedures were made to evaluate the relative cool detection threshold.

In addition, the cutaneous tactile perception threshold using Semmes-Weinstein monofilaments was evaluated (three different tests) on the dorsum of the hand. The best of the three tests was considered for analysis.

### **Data analysis**

The laser Doppler signals were averaged every 30 s to reduce the variability due to instantaneous vasomotion. Baseline CVC were calculated as the average over the 1 min baseline period prior to the onset of increasing local pressure, local heating or iontophoretic delivery of ACh or SNP. All vasodilatory responses to local pressure application, ACh, local heating and SNP were reported as the maximal percent increase in CVC from baseline. In the absence of a significant increase in CVC in response to local pressure application, the percent change in CVC from baseline was calculated at the local applied pressure corresponding to the maximal amplitude of PIV in young adults and could be expressed as a negative percent to report a decrease in CVC from baseline induced by the local applied pressure.

Results in the text and the figures are presented as mean $\pm$ SEM. They were first subjected to Bartlett's test for homogeneity of variances. To test for significant differences among groups, we performed one-way ANOVA with Newman-Keuls multiple-comparison test. Student's paired t-test was used to evaluate the significance of changes within a group. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

**Conflict of interest:** The authors state no conflict of interest.

**Acknowledgements:** The authors thank Lydie Gascoin and Sandra Merzeau for helpful technical assistance. This work was supported by grants from the Hospital University of Angers (PHRC 2005-541) and by the French government, Ministère de l'écologie et du développement durable (MEDD), convention recherche 0000375.

### **REFERENCES**

(1988). Report and recommendations of the San Antonio conference on diabetic neuropathy. Consensus statement. *Diabetes* 37: 1000-1004.

Algotsson A, Nordberg A, Winblad B (1995). Influence of age and gender on skin vessel reactivity to endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators tested with iontophoresis and a laser Doppler perfusion imager. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50: M121-127.

Allman RM (1989). Pressure ulcers among the elderly. *N Engl J Med* 320: 850-853.

Allman RM, Goode PS, Burst N, Bartolucci AA, Thomas DR (1999). Pressure ulcers, hospital complications, and disease severity: impact on hospital costs and length of stay. *Adv Wound Care* 12: 22-30.

- Black MA, Green DJ, Cable NT (2008). Exercise prevents age-related decline in nitric-oxide-mediated vasodilator function in cutaneous microvessels. *J Physiol* 586: 3511-3524.
- Brandes RP, Fleming I, Busse R (2005). Endothelial aging. *Cardiovasc Res* 66: 286-294.
- Campero M, Serra J, Ochoa JL (1996). C-polymodal nociceptors activated by noxious low temperature in human skin. *J Physiol* 497 (Pt 2): 565-572.
- Cernadas MR, Sanchez de Miguel L, Garcia-Duran M, Gonzalez-Fernandez F, Millas I, Monton M *et al.* (1998). Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res* 83: 279-286.
- Demiot C, Tartas M, Fromy B, Abraham P, Saumet JL, Sigaudou-Roussel D (2006). Aldose reductase pathway inhibition improved vascular and C-fiber functions, allowing for pressure-induced vasodilation restoration during severe diabetic neuropathy. *Diabetes* 55: 1478-1483.
- DeSouza CA, Shapiro LF, Clevenger CM, Dinunno FA, Monahan KD, Tanaka H *et al.* (2000). Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation* 102: 1351-1357.
- Di Iorio A, Cherubini A, Volpato S, Sparvieri E, Lauretani F, Franceschi C *et al.* (2006). Markers of inflammation, Vitamin E and peripheral nervous system function The InCHIANTI study. *Neurobiol Aging* 27: 1280-1288.
- Dyck PJ, O'Brien PC, Kosanke JL, Gillen DA, Karnes JL (1993a). A 4, 2, and 1 stepping algorithm for quick and accurate estimation of cutaneous sensation threshold. *Neurology* 43: 1508-1512.
- Dyck PJ, Zimmerman I, Gillen DA, Johnson D, Karnes JL, O'Brien PC (1993b). Cool, warm, and heat-pain detection thresholds: testing methods and inferences about anatomic distribution of receptors. *Neurology* 43: 1500-1508.
- Fizanne L, Sigaudou-Roussel D, Saumet JL, Fromy B (2004). Evidence for the involvement of VPAC1 and VPAC2 receptors in pressure-induced vasodilatation in rodents. *J Physiol* 554: 519-528.
- Fromy B, Abraham P, Bouvet C, Bouhanick B, Fressinaud P, Saumet JL (2002). Early decrease of skin blood flow in response to locally applied pressure in diabetic subjects. *Diabetes* 51: 1214-1217.
- Fromy B, Abraham P, Saumet JL (1998). Non-nociceptive capsaicin-sensitive nerve terminal stimulation allows for an original vasodilatory reflex in the human skin. *Brain Res* 811: 166-168.
- Fromy B, Abraham P, Saumet JL (2000a). Progressive calibrated pressure device to measure cutaneous blood flow changes to external pressure strain. *Brain Res Protocols* 5: 198-203.

- Fromy B, Merzeau S, Abraham P, Saumet JL (2000b). Mechanisms of the cutaneous vasodilator response to local external pressure application in rats: involvement of CGRP, neurokinins, prostaglandins and NO. *Br J Pharmacol* 131: 1161-1171.
- Gaubert ML, Sigaucho-Roussel D, Tartas M, Berrut G, Saumet JL, Fromy B (2007). Endothelium-derived hyperpolarizing factor as an in vivo back-up mechanism in the cutaneous microcirculation in old mice. *J Physiol* 585: 617-626.
- Huang IT, Lin WM, Shun CT, Hsieh ST (1999). Influence of cutaneous nerves on keratinocyte proliferation and epidermal thickness in mice. *Neuroscience* 94: 965-973.
- Kellogg DL, Jr., Liu Y, Kosiba IF, O'Donnell D (1999). Role of nitric oxide in the vascular effects of local warming of the skin in humans. *J Appl Physiol* 86: 1185-1190.
- Kellogg DL, Jr., Zhao JL, Wu Y (2008). Neuronal nitric oxide synthase control mechanisms in the cutaneous vasculature of humans in vivo. *J Physiol* 586: 847-857.
- Koitka A, Abraham P, Bouhanick B, Sigaucho-Roussel D, Demiot C, Saumet JL (2004). Impaired pressure-induced vasodilation at the foot in young adults with type 1 diabetes. *Diabetes* 53: 721-725.
- Levy DM, Karanth SS, Springall DR, Polak JM (1989). Depletion of cutaneous nerves and neuropeptides in diabetes mellitus: an immunocytochemical study. *Diabetologia* 32: 427-433.
- Melcangi RC, Azcoitia I, Ballabio M, Cavarretta I, Gonzalez LC, Leonelli E *et al.* (2003). Neuroactive steroids influence peripheral myelination: a promising opportunity for preventing or treating age-dependent dysfunctions of peripheral nerves. *Prog Neurobiol* 71: 57-66.
- Minson CT, Berry LT, Joyner MJ (2001). Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *J Appl Physiol* 91: 1619-1626.
- Minson CT, Holowatz LA, Wong BJ, Kenney WL, Wilkins BW (2002). Decreased nitric oxide- and axon reflex-mediated cutaneous vasodilation with age during local heating. *J Appl Physiol* 93: 1644-1649.
- Pare M, Albrecht PJ, Noto CJ, Bodkin NL, Pittenger GL, Schreyer DJ *et al.* (2007). Differential hypertrophy and atrophy among all types of cutaneous innervation in the glabrous skin of the monkey hand during aging and naturally occurring type 2 diabetes. *J Comp Neurol* 501: 543-567.
- Rolke R, Baron R, Maier C, Tolle TR, Treede RD, Beyer A *et al.* (2006). Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Pain* 123: 231-243.
- Rossi M, Cupisti A, Mariani S, Santoro G, Pentimone F (2002). Endothelium-dependent and endothelium-independent skin vasoreactivity in the elderly. *Aging Clin Exp Res* 14: 343-346.

- Saito Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Horikawa M, Takenaka M *et al.* (2008). The loss of MCP-1 attenuates cutaneous ischemia-reperfusion injury in a mouse model of pressure ulcer. *J Invest Dermatol* 128: 1838-1851.
- Sigauo-Roussel D, Demiot C, Fromy B, Koitka A, Leftheriotis G, Abraham P *et al.* (2004). Early endothelial dysfunction severely impairs skin blood flow response to local pressure application in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 53: 1564-1569.
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Bernini G, Magagna A *et al.* (2001). Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension* 38: 274-279.
- Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Fasolo CB, Sudano I *et al.* (1997). Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans. *Hypertension* 29: 736-743.
- Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB *et al.* (1995). Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* 91: 1981-1987.
- Verdu E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X (2000). Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst* 5: 191-208.
- Verdugo R, Ochoa JL (1992). Quantitative somatosensory thermotest. A key method for functional evaluation of small calibre afferent channels. *Brain* 115 (Pt 3): 893-913.
- Waller JM, Maibach HI (2005). Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. *Skin Res Technol* 11: 221-235.

b) Deuxième étude : Etude de l'ensemble des réponses microcirculatoires testées par iontophorèses évaluant les réponses endothéliale-dépendante, endothéliale indépendante, et neurovasculaire dans une population générale de patients.

*b.1 Population étudiée*

Cette étude a été commencée en mars 2007 et a inclus à ce jour 100 sujets recrutés parmi des patients hospitalisés au centre hospitalier universitaire d'Angers et dans des associations angevines. Les caractéristiques générales sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 1) :

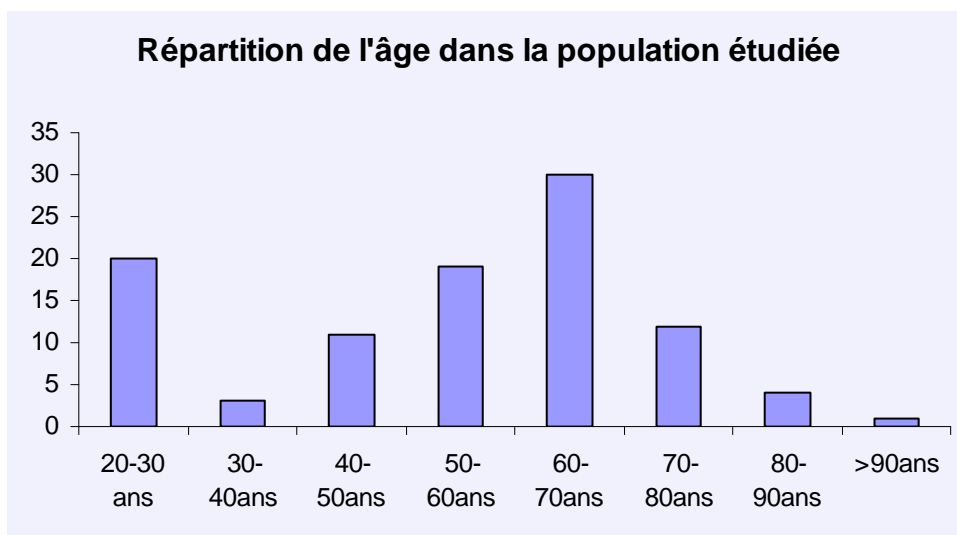
Tableau 1 : Caractéristiques générales de la population

	Population de l'étude	Valeurs normales
Age (en années)	53+/-18	—
Sexe h/f	52/48	—
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25+/-5	18-25
Glycémie (en mmol/L)	6,05+/-3,44	4,1-6,1
Cholestérol total (en mmol/L)	5,33+/-1,41	3,9-5,1
LDL cholestérol (en mmol/L)	2,76+/-2,03	<4,1
HDL cholestérol (en mmol/L)	0,91+/-0,41	0,9-2,3

*IMC: indice de masse corporelle. Les valeurs sont exprimées en moyenne +/- écart-type.*

Cette population comprend 100 sujets et est composée à 52% d'homme et 48% de femme. L'indice de masse corporelle (IMC) moyenne dans notre population traduit un léger surpoids car cette valeur est supérieure à 25 (cf infra). Cet IMC est en accord avec les valeurs retrouvées dans la population moyenne française puisqu'il était proche de 26 en 2006. La glycémie dans notre population est dans la limite supérieure de la normale en raison de la présence de sujets diabétique dans cette population. Il y a enfin une hypercholestérolémie totale dans notre population et celle-ci s'explique par la présence de nombreux sujets âgés.

La répartition des sujets en fonction de leur âge dans la population étudiée est la suivante :

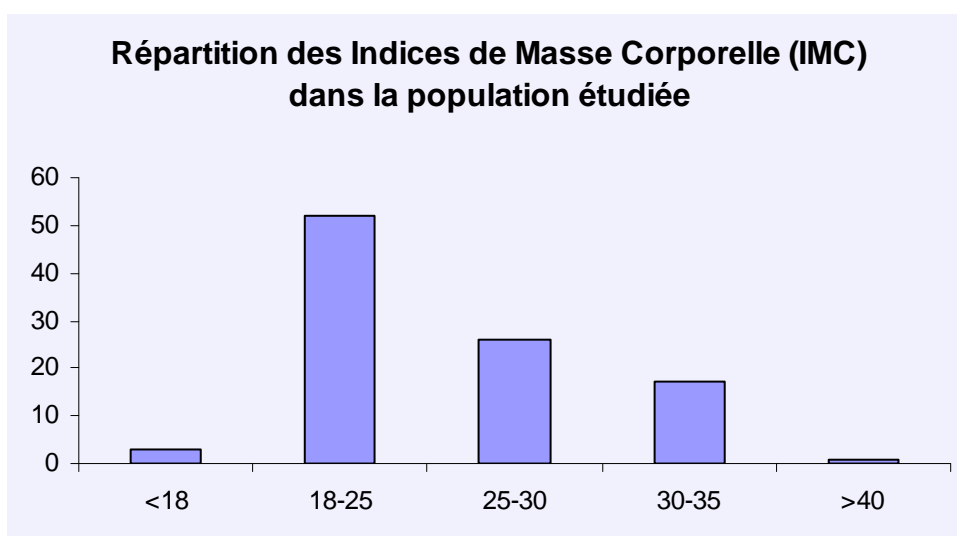


*En abscisse, les catégories d'âge et en ordonnées le nombre de sujets.*

Il existe dans cette population une majorité de sujets compris entre 50 et 70 ans. Cela s'explique par le recrutement qui est essentiellement hospitalisé. La tranche d'âge 20-30ans est aussi bien représenté et est constitué majoritairement par des étudiants du service.

La répartition des indices de masse corporelle dans notre population est représentée par l'histogramme ci-dessous. Les définitions des différentes catégories sont les suivantes :

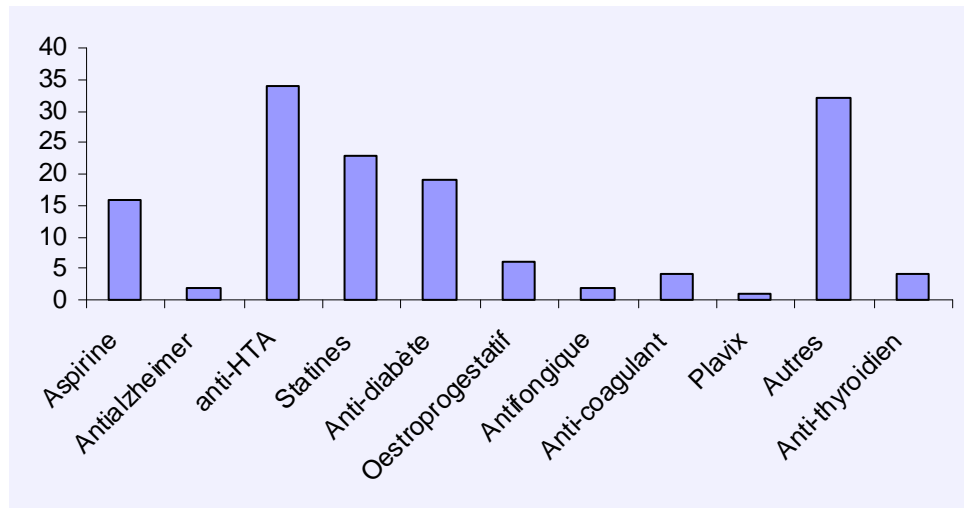
- IMC < 18 : dénutrition
- IMC entre 18 et 25 : poids normal
- IMC entre 25 et 30 : surpoids
- IMC entre 30 et 40 : obésité
- IMC > 40 : obésité morbide



*En abscisse les catégories d'IMC et en ordonnée le nombre de sujets.*

Cette population est majoritairement constituée de sujets ayant un indice de masse corporelle normal. Dans cette population, il n'y avait quasiment pas de sujets présentant une obésité morbide (n=1) ni de dénutrition (n=3).

La répartition des différents traitements dans la population de cette étude était la suivante :

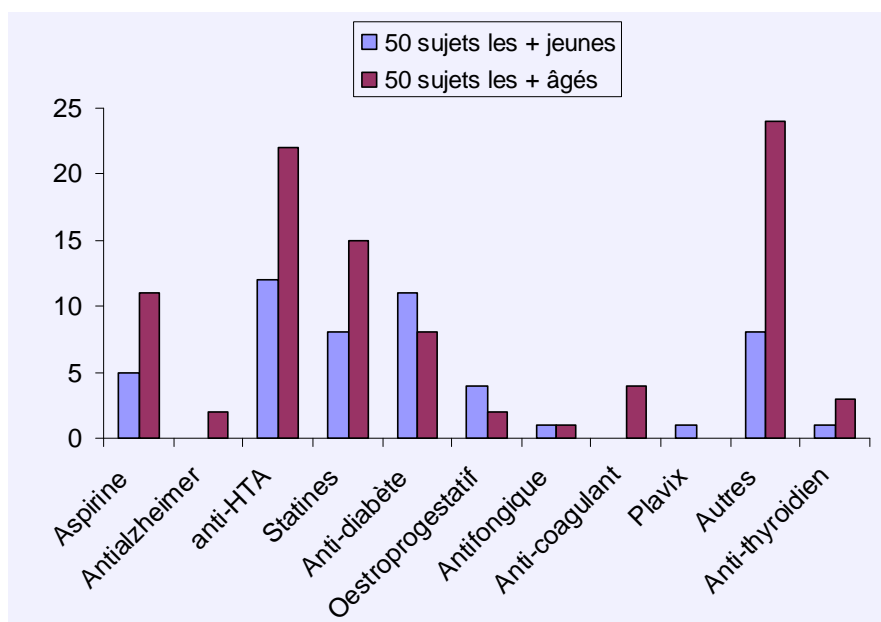


*Légende: Anti-HTA: traitements anti-hypertenseurs, Statines: traitements hypocholestérolémians, Anti-diabète: traitements anti-diabétiques comprenant l'insuline et les antidiabétiques oraux, Autres : traitements tels que le paracétamol, laxatifs, inhibiteurs de la pompe à protons...*

Les traitements anti-hypertenseurs étaient les plus retrouvés dans cette population. Cela s'explique par un dépistage important réalisé pour l'hypertension et par l'âge de notre population.

Dans cette population, nous avons étudié les traitements des 50 sujets les plus jeunes et ceux des 50 sujets les plus âgés dont voici le graphique :

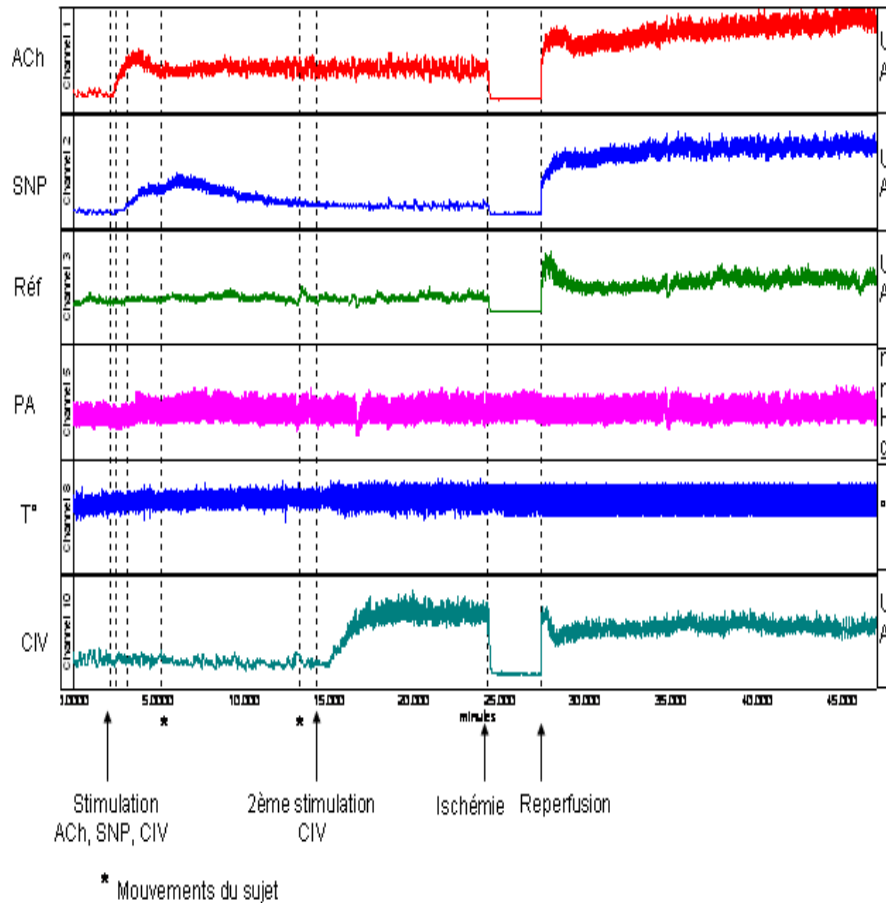




Il y a une augmentation de la prise de traitement avec l'âge. En effet, en moyenne, les sujets de moins de 50 ans prennent 1 traitement par sujet alors que les sujets de plus de 50ans prennent 1.82 traitement par sujet.

## b.2 Résultats microcirculatoires

Le tracé typique obtenu lors de ce protocole est représenté par la photo d'écran



suivante:

La première voie (en rouge) notée "ACh" représente la réponse à l'acétylcholine. On observe, deux minutes de repos qui sont stables. Après stimulation à 0.1mA pendant 20s, il y a une ascension de la courbe traduisant une augmentation du flux en réponse à l'acétylcholine. A la 25<sup>ème</sup> minute, une ischémie est réalisée avec le brassard à tension. Cette ischémie entraîne une chute de la courbe. Cette chute dure pendant 3 minutes c'est-à-dire le temps de l'ischémie puis s'ensuit une phase de ré-ascension en rapport avec la reperfusion.

La seconde courbe (en bleue) correspond à la voie 2 et étudie la réponse au SNP. La aussi, après 2 minutes de repos, la stimulation entraîne une ascension de la courbe en réponse au SNP. A la 25<sup>ème</sup> minute, une ischémie est réalisée avec le brassard à tension. Cette

ischémie entraîne une chute de la courbe. Cette chute dure pendant 3 minutes c'est-à-dire le temps de l'ischémie puis s'ensuit une phase de ré-ascension en rapport avec la reperfusion.

La troisième voie (en vert) est la sonde de référence. Elle est notée "Ref". Celle-ci ne contient aucune molécule et aucune stimulation électrique n'est réalisée. Elle permet d'étudier pendant toute la durée de l'expérimentation la stabilité de la microcirculation cutanée et d'évaluer l'hyperhémie post-occlusive après les 3 minutes d'ischémie réalisée avec le brassard à tension.

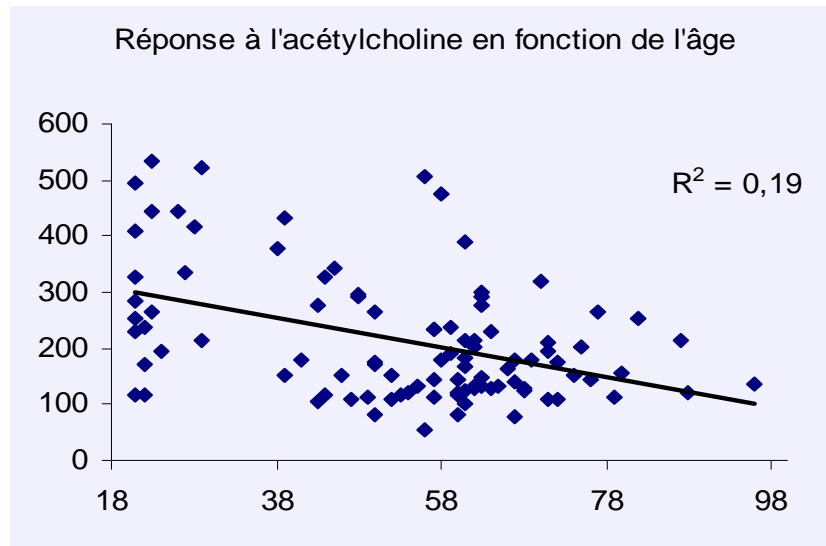
La quatrième voie (en rose) représente la pression artérielle. Elle est notée "PA". Celle-ci permet d'évaluer en continu la pression artérielle du sujet. En effet, des modifications au niveau de la pression artérielle risqueraient d'engendrer des modifications microcirculatoires et donc d'influencer les réponses microcirculatoires. Sur cette courbe, on observe une bonne stabilité pendant toute la durée de expérimentation.

La cinquième voie (en bleue) représente la température cutanée mesurée en continu. Elle est notée "T°". On constate une variabilité du signal mais celle-ci est liée à l'échelle de valeurs et correspond en fait à des bruits associés à la mesure. Là encore, des modifications thermiques risqueraient de modifier les réponses microcirculatoires puisque la peau est un organe essentiel dans le contrôle thermique. Ici, on observe une excellente stabilité thermique.

La sixième et dernière courbe (en bleu vert) représente la réponse au courant. Elle est notée "CIV". Après 2 minutes de repos, une première stimulation de 0.1mA pendant 60s est réalisée. Il n'y a pas ou peu de modifications du tracé. Dix minutes après, une deuxième stimulation de même intensité et de même durée est réalisée. Il y a alors une ascension de la courbe suivit d'un plateau. Cette réponse est caractéristique de l'effet courant (CIV). A la 25<sup>ème</sup> minute, une ischémie est réalisée avec le brassard à tension. Cette ischémie entraîne une chute de la courbe. Cette chute dure pendant 3 minutes c'est-à-dire le temps de l'ischémie puis s'ensuit une phase de ré-ascension en rapport avec la reperfusion.

Les graphes suivants montrent la réponse aux différentes molécules en fonction de l'âge chez l'ensemble des sujets (sans distinction d'une éventuelle pathologie) :

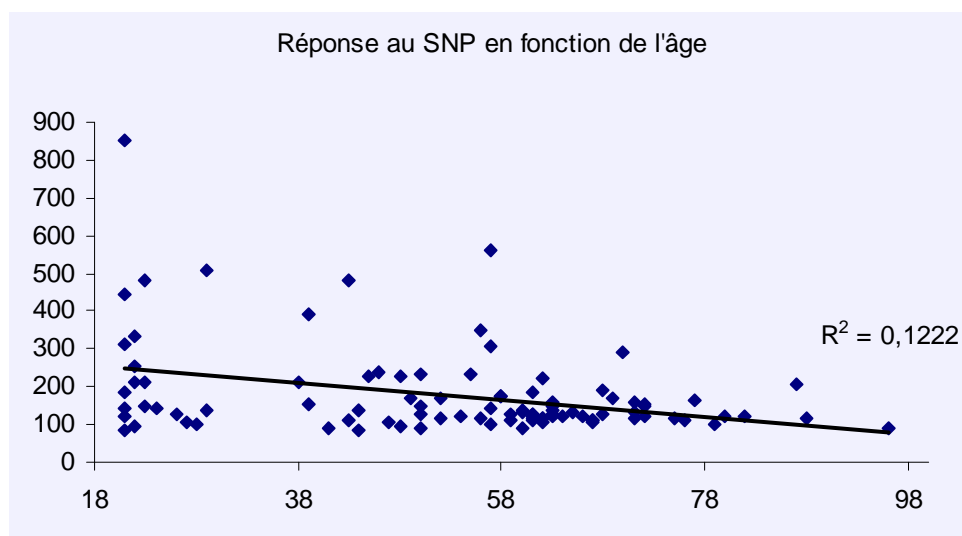
### b.2.1 La réponse à l'acétylcholine :



*En abscisse, l'âge des sujets et en ordonnée, l'amplitude de réponse.*

Ce graphique met bien en évidence que plus les sujets sont jeunes plus la réponse à l'acétylcholine est élevée et qu'inversement plus les sujets sont âgés plus la réponse à l'acétylcholine est diminuée. De plus, on observe une grande variabilité entre les sujets puisqu'à un âge situé entre 20 et 25 ans des sujets peuvent avoir une réponse à 110% de la baseline jusqu'à 550% alors même que ces sujets sont considérés comme sains.

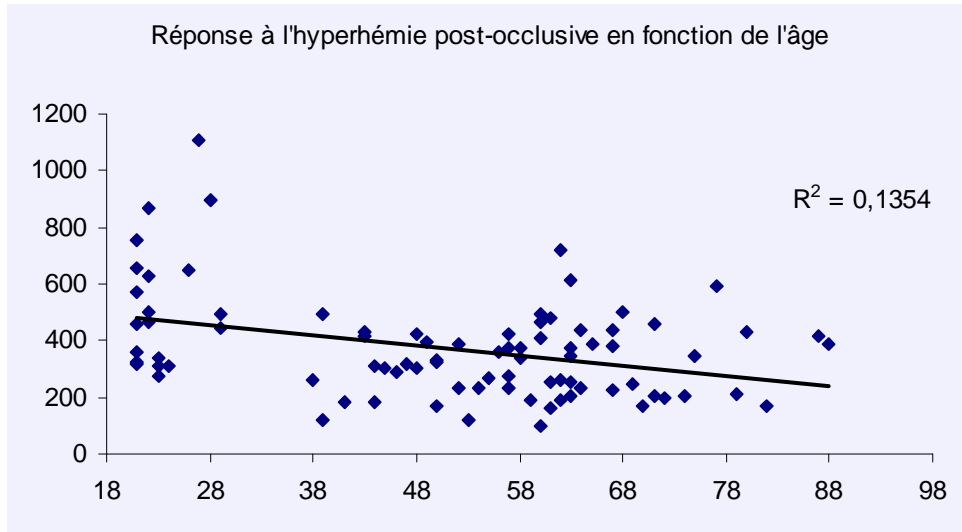
La réponse au nitroprussiate de sodium (SNP) :



*En abscisse, l'âge des sujets et en ordonnée, l'amplitude de réponse.*

Ce graphe met en évidence qu'il existe une légère tendance à la diminution de la réponse au nitroprussiate de sodium. Mais cette réponse est moins bien corrélée à l'âge que celle à l'acétylcholine.

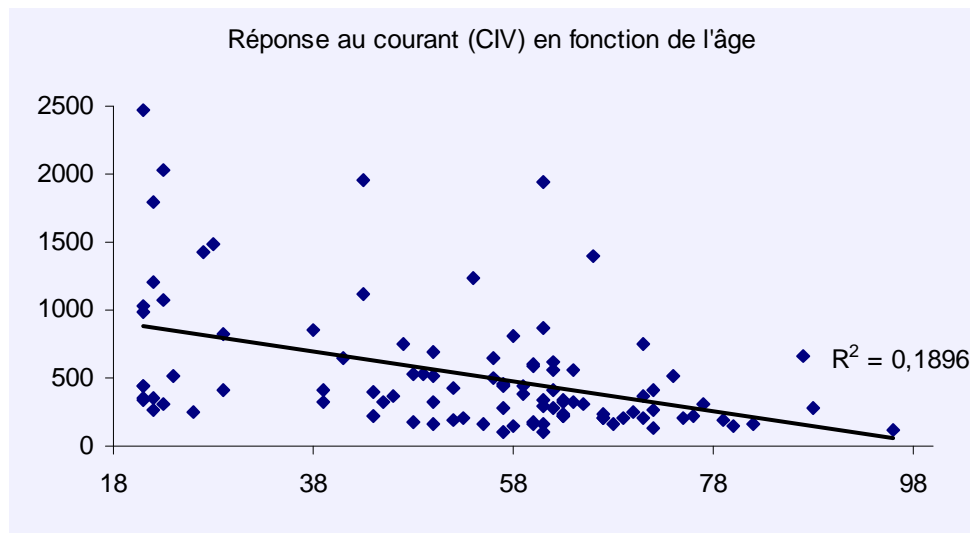
### b.2.2 La réponse à l'hyperhémie post-occlusive :



*En abscisse, l'âge des sujets et en ordonnée, l'amplitude de réponse.*

Ce graphe met en évidence qu'il existe une tendance à la diminution de la réponse à l'hyperhémie post-occlusive.

### 3.2.3 La réponse au courant (CIV) :



*En abscisse, l'âge des sujets et en ordonnée, l'amplitude de réponse.*

Ce graphe met en évidence qu'il existe une tendance à la diminution de la réponse au courant.

Ces résultats mettent donc en évidence une diminution des réponses microcirculatoires avec l'âge. Différents déterminants propres à chaque patient peuvent aussi influencer cette réponse microcirculatoire liée à l'acétylcholine. Les déterminants peuvent être des facteurs non modifiables comme l'âge, le sexe et des facteurs modifiables comme l'indice de masse corporelle (cet indice permet de déterminer le surpoids), la glycémie et le bilan lipidique et les différents traitements (les traitements anti-hypertenseurs, antidiabétiques, l'aspirine, les traitements contre la maladie d'Alzheimer, les traitements hypocholestérolémiant). En effet, les traitements ont des effets souhaités et des effets indésirables. Les réponses microcirculatoires sont-elles modifiées par les principaux traitements pris par les sujets âgés? Les traitements relevés étaient les traitements les plus fréquemment retrouvés dans une population âgée. Pour juger de la part de chacun dans les modifications de la réponse microcirculatoire, nous avons utilisé la méthode statistique de régression linéaire pas à pas. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

#### **b.2.4 Les déterminants de la réponse à l'acétylcholine c'est-à-dire de la réponse endothéliale:**

Variables	Bêta dans	Signification	Corrélation partielle
Age	-0,400	0,000	—
Sexe	-0,186	0,056	-0,200
IMC	-0,096	0,332	-0,102
TTT Oestroprogestatifs	0,105	0,283	0,113
TTT antidiabétiques	-0,099	0,307	-0,108
TTT hypocholestérolémiant	-0,079	0,423	-0,085
TTT antihypertenseurs	0,031	0,770	0,031
TTT antialzheimer	-0,028	0,777	-0,030
Aspirine	0,046	0,643	0,049
Plavix	-0,155	0,107	-0,169
TTT antithyroidien	0,074	0,447	0,080

*TTT : Traitement et IMC = indice de masse corporelle.*

Le facteur expliquant la diminution de la réponse à l'acétylcholine est donc l'âge. Les autres déterminants et en particulier les différents traitements pris par les sujets ne semblent pas avoir une influence sur cette réponse.

## b.2.5 Les déterminants de la réponse au courant (CIV) c'est-à-dire de la réponse neurovasculaire :

Variabiles	Bêta dans	Signification	Corrélation partielle
Age	-0,233	0,026	–
Sexe	-0,192	0,050	-0,206
IMC	-0,046	0,645	-0,049
TTT Oestroprogestatifs	0,088	0,359	0,097
TTT antidiabétiques	-0,177	0,085	-0,182
TTT hypocholestérolémians	-0,11	0,346	-0,100
TTT antihypertenseurs	-0,313	0,003	–
TTT antialzheimer	-0,057	0,548	-0,064
Aspirine	-0,133	0,230	-0,127
Plavix	-0,085	0,376	-0,094
TTT antithyroidien	0,055	0,568	0,061

*TTT : Traitement et IMC = indice de masse corporelle.*

Deux facteurs expliquent la diminution de la réponse au courant. Ce sont les traitements anti-hypertenseurs et l'âge. Les autres déterminants et en particulier les autres traitements ne semblent pas avoir une influence sur cette réponse. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'aspirine sont connus pour diminuer considérablement la réponse liée au courant comme cela a été mis en évidence par de nombreuses publications du laboratoire chez les sujets jeunes.. Cependant, la prise d'anti-inflammatoires ne ressort pas dans l'analyse statistique par régression linéaire. Cela peut probablement s'expliquer par le fait que dans notre population la plupart des sujets prenant un traitement antihypertenseurs sont aussi sous aspirine et donc que l'influence de la prise d'aspirine est masquée par la prise de traitements anti-hypertenseurs. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons alors étudiés 3 groupes de sujets appariés en âge, en sexe et en indice de masse corporelle (IMC):

- Un groupe sans aspirine et sans traitement antihypertenseur (n=15), noté "Pas Asp, pas HTA"
- Un groupe sans aspirine et avec traitement anti-hypertenseur (n=15), noté "Pas Asp, HTA"
- Un groupe avec aspirine et traitement anti-hypertenseur (n=15), noté "Asp, HTA".

Les résultats attendus devaient montrer qu'il n'y a pas de différence significative au niveau des réponses au courant (CIV) entre le groupe "Pas Asp, Pas HTA" et entre le groupe "Pas Asp, HTA". Par contre, il devrait y avoir une différence statistiquement significative au

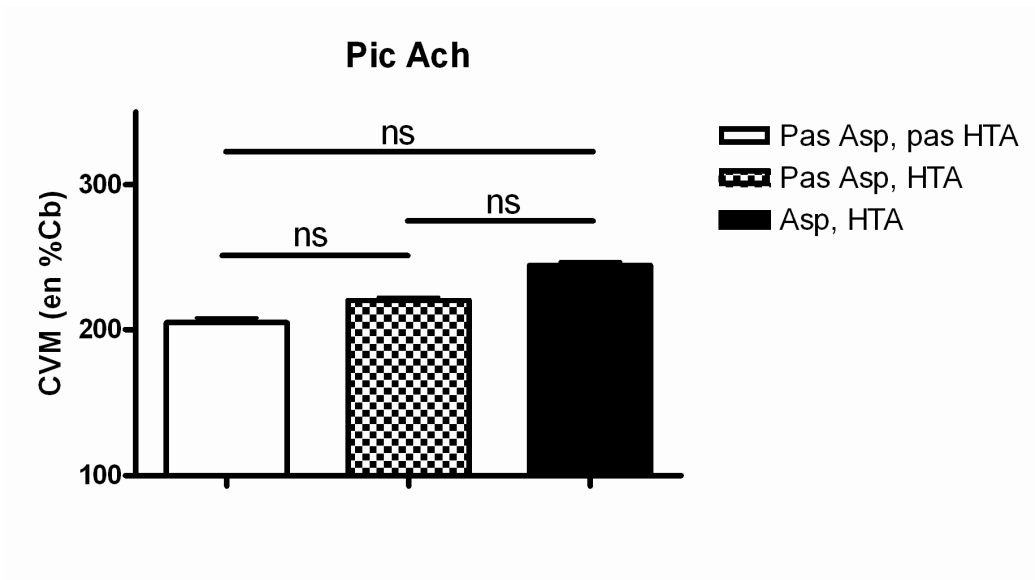
niveau des réponses au courant (CIV) entre le groupe "Pas Asp, HTA" et "le groupe "Asp, HTA". Il ne devrait pas enfin y avoir de modifications au niveau de la réponse endothéliale au niveau des 3 groupes.

Tableau des caractéristiques générales des 3 groupes :

	<b>Pas Asp, Pas HTA (n=15)</b>	<b>Pas Asp, HTA (n=15)</b>	<b>Asp, HTA (n=15)</b>
IMC	26,0+/-2,8	28,3+/-5,3	29,4+/-6,1
Age	61+/-8	62+/-12	64+/-11
Sexe h/f	10/5	11/4	11/4

*IMC: indice de masse corporelle.*

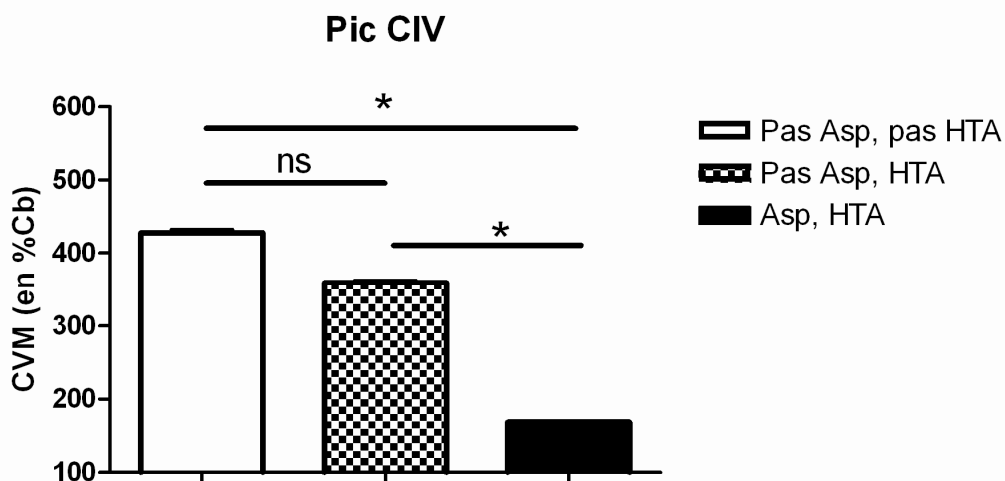
Les trois groupes étant appariés en âge, en sexe et en IMC, les résultats microcirculatoires sont les suivants :



*CVM : Conductance vasculaire maximale exprimée en % de multiple de conductance de base. Test statistique utilisé est l'ANOVA, ns : non significatif, \* :  $p < 0.05$ .*

Il n'y a pas de différence significative de réponse à l'acétylcholine entre les 3 groupes. Les patients prenant un traitement antihypertenseur et ceux prenant un traitement anti-hypertenseur associé à un traitement par aspirine n'ont pas de différence de réponse à l'acétylcholine. Leurs réponses endothéliales ne sont pas différentes.





*CVM : Conductance vasculaire maximale exprimée en % de multiple de conductance de base. Test statistique utilisé est l'ANOVA, ns : non significatif, \* :  $p < 0.05$ .*

La réponse au courant n'apparaît statistiquement différente entre le groupe "Pas Asp, pas HTA" et le groupe "Pas Asp, HTA" traduisant le fait que les traitements anti-hypertenseurs ne semblent pas modifier la réponse au courant. A contrario, il apparaît une différence statistiquement significative entre le groupe "Pas Asp, HTA" et le groupe "Asp, HTA" mettant en évidence que l'aspirine est le facteur modifiant la réponse au courant. Compte tenu de ces résultats, il semblerait donc que la réponse au courant soit essentiellement influencée par l'aspirine et non par les traitements anti-hypertenseurs.

Au total, dans cette population étudiée, les modifications microcirculatoires retrouvées au niveau des réponses à l'acétylcholine et au courant semblent être liées en grande partie à l'effet de l'âge mais aussi pour la réponse au courant à l'effet de l'aspirine. Afin de mieux comprendre l'effet de l'âge et son influence sur les différentes réponses microcirculatoires en dehors de toute pathologie, nous avons réalisé une publication ne prenant en compte que les sujets totalement exempts de toute pathologie connue, soit seulement 30 sujets.

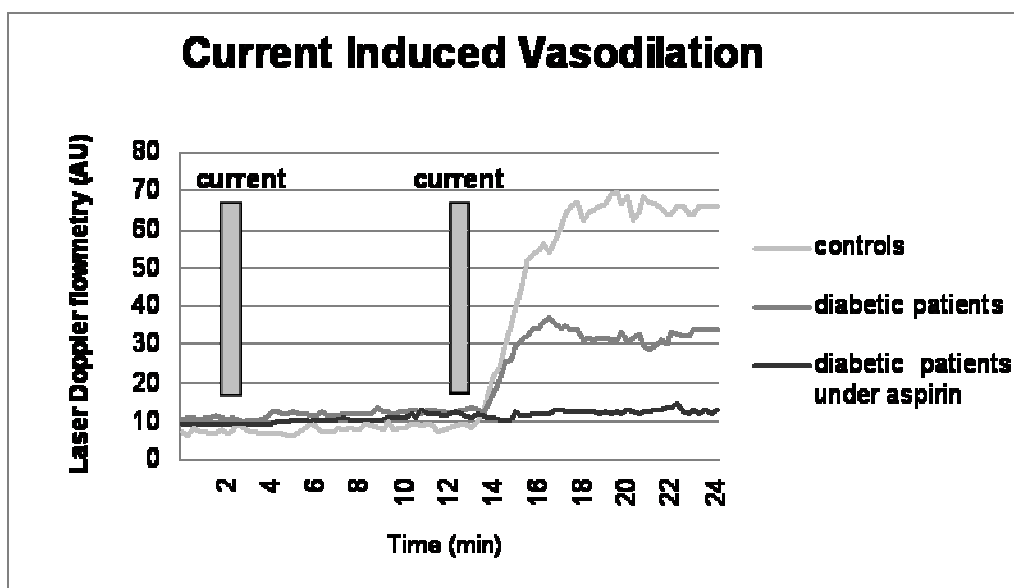
Publications : Une partie de ce travail est en préparation pour publication afin de mettre en évidence le vieillissement des différentes voies de vasodilatation cutanée chez des sujets sains.

c) Troisième étude: Etude des modifications engendrées par le diabète et la prise concomitante d'un anti-agrégant antiplaquettaire (aspirine)

**Introduction :** Le nombre de patients diabétiques est en augmentation importante. Le diabète est connu pour engendrer des neuropathies. De plus, les patients diabétiques ont très souvent une prescription d'un anti-agrégant plaquettaire antiplaquettaire (aspirine 75mg) en prévention primaire. Y a-t-il des modifications des réponses microcirculatoires cutanées avec le diabète? Quels ont les effets des traitements pris par les diabétiques sur ces différentes réponses microcirculatoires?

**Matériels et méthodes :** Nous avons comparés des réponses à des tests neurologiques et les réponses microcirculatoires de 3 groupes de sujets: 1 groupe de sujets non diabétiques, un groupe de sujets diabétiques sans aspirine et un groupe de sujets diabétiques sous aspirine.

**Résultats :** 34 sujets ont été inclus soit 10 dans chaque groupe. Les groupes étaient appariés en âge sexe et indice de masse corporelle pour éliminer un éventuel facteur confondant. La réponse endothéliale et la réponse neurovasculaire étaient diminuées chez les patients diabétiques comparés aux sujets sains. Entre les 2 groupes de patients diabétiques, aucune différence n'était mise en évidence au niveau des réponses aux tests neurologiques. Cependant, les patients diabétiques sous aspirine avaient une réponse neurovasculaire diminuée de façon statistiquement significative par rapport aux patients diabétiques sans aspirine comme le montre la figure suivante :



Légende de la figure 1: Current induced vasodilation : vasodilatation induite par le courant, current : courant, laser Doppler fowmetry: laser Doppler fluxmètre, controls : sujets contrôles,

diabetic patients : patients diabétiques, diabetic patients under aspirin : patient diabétique sous aspirine, Time : temps.

**Conclusion :**

Les patients diabétiques ont une réponse endothéliale dépendante et neurovasculaire diminuées par rapport à des sujets sains. Chez les diabétiques qui ont déjà des réponses diminuées, l'aspirine abolie quasiment la réponse neurovasculaire. Une étude comparant la prévalence des ulcères chez des patients diabétiques sous aspirine à ceux sans aspirine semblerait intéressante. L'article est en cours de révision pour la revue *Microvascular Research* et voici l'abstract initialement soumis :

Title: Axon-reflex cutaneous vasodilatation is impaired in type 2 diabetic patients receiving chronic low-dose aspirin

Article Type: Regular Article

Keywords: Small fiber neuropathy; diabetes; iontophoresis; current stimulation; vasodilatation; Salicylic acid.

Corresponding Author: Dr. Pierre Abraham,

Corresponding Author's Institution: Univ. Hospital

First Author: pascal rousseau, MD

Order of Authors: pascal rousseau, MD; guillaume mahe, MD; berengere fromy, PhD; pierre-henri ducluzeau, MD; jean-louis saumet, MD, PhD; Pierre Abraham

Abstract: Low-dose aspirin is largely but non-homogeneously used in primary prevention of cardiovascular complication in type-2 diabetic patients. We hypothesised that low-dose aspirin could interfere with the cutaneous neurovascular responses in type-2 diabetic patients. In healthy subjects, galvanic current-induced vasodilatation (CIV) is an easy original non-noxious integrative model of neurovascular interaction which was recently proved to be impaired under low-dose aspirin. Twenty type-2 diabetic patients (10 not receiving aspirin: D-NA and 10 regularly receiving  $\leq 150$  mg/day aspirin: D-A), underwent macro- and micro-vascular investigations, including: CIV, acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) iontophoresis, post-occlusive hyperemia (POH), neuropathy symptom (NSS) and disability (NDS) scores, thermal and vibration sensory thresholds. Results are presented as median [25-75 centiles] and microvascular results are expressed in multiple from baseline conductance (%Cb). CIV was 251[190-355] %Cb in D-NA and 159[136-202] %Cb in D-A ( $p < 0.05$ ). No Differences were observed between the two groups for Ach and SNP iontophoresis, POH, NSS, NDS, thermal and vibration sensory thresholds and macrovascular investigations. In conclusion, CIV is impaired in diabetic patients regularly receiving low-dose aspirin as compared with those not receiving aspirin, while other

macrovascular, microvascular and clinical-sensitivity investigations show no significant difference. Potential clinical markers for the impairment of the neurovascular interaction are still required in diabetes. Correlation of the CIV-response with the risk of cutaneous complications in diabetic patients remains to be tested.

#### CONCLUSION et PERSPECTIVES:

Nos travaux ouvrent des voies originales et réalistes pour lutter rapidement contre les effets de la canicule chez des personnes fragiles. Il suffirait de changer certains traitements pendant la canicule. Avant d'en faire une consigne il est prudent d'en regarder la faisabilité dans un service de malades à risque vis-à-vis de la canicule. C'est ce que nous proposerons dans un prochain appel d'offre. Nous avons présenté nos résultats récemment dans le congrès Experimental Biology (avril 2009) et à plusieurs chefs de service de gériatrie ou de médecine physique. Ils ont permis la thèse de l'université de Lyon 1 soutenue par un jeune médecin gériatre qui envisage une carrière universitaire et des réunions (une en avril, l'autre en juin 2009) pour travailler sur le concept de fragilité de la personne âgée.

## **RESUME:**

**Introduction :** Les études épidémiologiques des effets de la canicule ont permis d'identifier des populations à risque : personnes âgées ou ayant une maladie cardiovasculaire, un diabète, une affection neuropsychiatrique avec prise de neuroleptique. Ces différentes populations font fréquemment l'objet de traitements médicamenteux divers pouvant influencer leur thermorégulation. Bien que l'organisme humain présente des moyens physiologiques de lutte contre une chaleur environnementale excessive, ceux-ci sont altérés dans les populations à risque. Un des moyens de lutte de l'organisme consiste à faire varier le débit sanguin cutané (en parallèle de la sudation) ce qui permet d'ajuster les pertes thermiques de l'organisme. L'étude de l'effet, sur le débit sanguin cutané, du vieillissement et des médicaments fréquemment utilisés chez les personnes âgées devrait permettre une meilleure prescription médicamenteuse. Il peut s'agir d'un changement de posologie ou d'interruption des traitements dangereux en cas d'alerte en prévision d'une nouvelle canicule car ayant des effets secondaires sur la thermorégulation.

**Objectifs :** Pour répondre à cette problématique, nous avons réalisé 5 études. Une sur les sujets jeunes de 18 à 35 ans comparant l'effet d'antiagrégant plaquettaire antipyrétique (aspirine) à des antiagrégants plaquettaire non antipyrétique (clopidogrel). Puis, nous avons évalué les réponses microcirculatoires à la pression et à l'iontophorèse de sujets âgés représentant la population générale lors de 2 autres études. La population âgée diabétique étant en augmentation, nous avons aussi étudiés lors d'une 4<sup>ème</sup> étude les modifications de leurs réponses cutanées microcirculatoires sous antiagrégant plaquettaire antipyrétique (aspirine). Enfin, lors d'une cinquième étude, nous avons développé une nouvelle méthode d'analyse de la réponse endothéliale dépendante.

**Résultats :** Ces différentes études mettent en évidence que la plupart des réponses microcirculatoires cutanées diminuent avec l'âge et de d'autant plus avec certaines pathologies notamment cardiovasculaires. Une partie de la réponse neurovasculaire semble être conservée mais celle-ci peut être inhibée par l'aspirine (antipyrétique largement utilisé) même à très faible dose (antiagrégant plaquettaire) à la fois chez les sujets jeunes et chez les sujets âgés.

**Conclusion :** La thermorégulation qui s'effectue en grande partie grâce au bon fonctionnement cutané est en partie perturbée par l'âge et différentes pathologies. Cependant, bien que certaines réponses micro-circulatoires soient diminuées celles-ci sont encore partiellement efficaces. Mais, la prescription de certains traitements et notamment d'antiagrégant plaquettaire antipyrétique comme l'aspirine 75mg qui est très largement prescrit inhibe quasi totalement la réponse neurovasculaire. Celle-ci ne semble pas modifiée par le clopidogrel. Il serait donc sans doute souhaitable en période de canicule d'envisager un remplacement de l'aspirine par du clopidogrel pour les patients âgés qui doivent pour raison de santé bénéficier d'un traitement anti-agrégant.