



HAL
open science

Rôle de l'arginase dans l'atteinte vasculaire associée à l'arthrite chez le rat

Clément Prati

► **To cite this version:**

Clément Prati. Rôle de l'arginase dans l'atteinte vasculaire associée à l'arthrite chez le rat. Médecine humaine et pathologie. Université de Franche-Comté, 2012. Français. NNT : 2012BESA3017 . tel-01377836

HAL Id: tel-01377836

<https://theses.hal.science/tel-01377836>

Submitted on 7 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Rôle de l'arginase dans l'atteinte vasculaire associée à l'arthrite chez le rat

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE COMTE
(Ecole doctorale Homme, Environnement, Santé)
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement

Par

Clément PRATI
Le 14 décembre 2012

JURY

C. Demougeot (Directeur de thèse)	Professeur, Université de Franche-Comté
A. Berthelot (Membre invité)	Professeur, Université de Franche Comté
D. Wendling (Co-directeur de thèse)	Professeur, Université de Franche Comté
R. Lories (Examineur)	Professeur, Université de Leuven (Belgique)
J.F. Maillefert (rapporteur)	Professeur, Université de Bourgogne
N. Niederhoffer (rapporteur)	MCU-HDR, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de l'EA 4267 Fonctions et Dysfonctions Epithéliales et pour les analyses histologiques dans le laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Besançon.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire de physiologie qui m'ont accueilli chaleureusement

Je tiens à remercier tous les membres du service d'anatomie pathologique

Je tiens à remercier tous les membres du service de rhumatologie du CHU de Besançon, pour leurs encouragements et leur patience

Au **Professeur Céline Demougeot**, un grand merci d'avoir dirigé cette thèse avec rigueur et encouragement en étant toujours disponible et compréhensive

Au **Professeur Alain Berthelot**, un grand merci pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire

Au **Professeur Daniel Wendling**, un grand merci pour m'avoir permis de réaliser cette thèse, pour ses conseils toujours justes, son écoute et sa confiance

Au **Professeur Bernadette Kantelip**, un grand merci pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire

Je remercie **l'Association Franc Comtoise pour la Formation, la Recherche et l'Enseignement en Rhumatologie**

à Gwennaël,

pour son soutien sans faille quotidien, sa patience et son amour, qui j'espère continuera à être fier de moi,

à Arsène, Colette et Edgar,

ma fierté et ma source de motivation, pour le bonheur qu'ils m'apportent tous les jours,

à mes parents Françoise et Bruno,

pour leur soutien en toutes circonstances, pour l'éducation et les valeurs reçues, pour leur courage et leur gentillesse,

à ma sœur Aurélie et mon frère Victor et leurs jolies familles,

qui j'espère sont fiers de moi comme je suis fier d'eux,

à mes amis,

présents et disponibles en toutes occasions,
Alex, Anne, Benjamin, Benoît, Charles, Delphine, Estelle, Gaëlle, Jérôme, Julien, Laetitia,
Lily, Lionel, Ludo, Marie, Nathalie, Neness, P.O, Sabrina, Sophie, Yannos

Je dédie cette thèse

PLAN de THESE

Résumé français/anglais	1
Liste des abréviations	3
Introduction générale	6
I. Données bibliographiques	8
I1. La polyarthrite rhumatoïde	8
I11. Epidémiologie et physiopathologie	8
a. Phase d'initiation	9
b. Phase de recrutement et inflammation	10
c. Angiogénèse - pannus	11
d. Phase de réparation	12
I12 Diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde	12
a. Manifestations cliniques de la polyarthrite rhumatoïde débutante	12
b. Diagnostics différentiels	16
c. Examens complémentaires	16
I13 Traitement	20
a. Information et éducation du patient	21
b. Traitements médicamenteux	21
c. Traitement non médicamenteux	30
I2. Modèles expérimentaux murins dans la polyarthrite rhumatoïde	32
I21. Arthrite induite à adjuvant	32
a. souches murines utilisées	32
b. Méthodologie	33
c. Evolution clinique, radiologique et histologique	33
d. Paramètres immuno-inflammatoires	35
e. avantages/inconvénients du modèle	35
f. Lien avec la PR humaine	36
I22. Arthrite induite à collagène	36
a. souches murines utilisées	36
b. Méthodologie	37
c. Evolution clinique, radiologique et histologique	37
d. Paramètres immuno-inflammatoires	38
e. avantages/inconvénients du modèle	38
f. Lien avec la PR humaine	39
I23. Autres modèles	39
a. Cartilage oligomérique matrix protéin induced arthritis	39
b. Avridine-induced arthritis	39
c. Pristane-induced arthritis	39
d. Oil-induced arthritis	39
e. Streptococcal cell wall arthritis	40
f. Souches génétiquement modifiées	40
g. Proteoglycan-induced arthritis	40
I3. Le risque cardiovasculaire dans la polyarthrite rhumatoïde	42
31. PR et risque cardiovasculaire	42
a. Prévalence	42
b. Complications cardiaques de la polyarthrite rhumatoïde	43
c. Facteur de risque cardiovasculaire et polyarthrite rhumatoïde	44
d. La polyarthrite rhumatoïde, facteur de risque indépendant ?	44

e. Evaluation clinique du risque cardiovasculaire	45
f. Effets cardiovasculaires des traitements utilisés dans la polyarthrite rhumatoïde	48
I32. Dysfonction endothéliale et polyarthrite rhumatoïde	55
a. Endothélium vasculaire	55
b. Facteurs endothéliaux	56
c. Dysfonction endothéliale et polyarthrite rhumatoïde : données chez l'Homme	63
d. Données dans les modèles murins	71
I4. Arginase	72
I41. Structure	72
I42. Fonction	73
I43. Arginase, monoxyde d'azote et fonction vasculaire	74
I44. Arginase et polyarthrite rhumatoïde	76
II. Objectifs du travail	78
III. Travaux personnels	79
A. Première étude	79
1. Introduction et objectifs de l'étude	80
2. Méthodologie	81
B. Deuxième étude	93
1. Introduction et objectifs de l'étude	94
2. Méthodologie	95
IV. Conclusions et perspectives	109
Bibliographie	116
Annexe	142

Résumé

Rôle de l'arginase dans l'atteinte vasculaire associée à l'arthrite chez le rat

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Les patients PR se caractérisent par une diminution de l'espérance de vie de 10 à 15 ans par rapport à la population générale. Le risque cardiovasculaire représente le premier facteur de mortalité de cette maladie, et la PR est aujourd'hui considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant. Cette augmentation de la mortalité d'origine cardiovasculaire semble liée à l'existence de processus athéromateux accélérés et exagérés chez le patient arthritique. Les données récentes s'accordent pour conférer à la dysfonction endothéliale (DE) un rôle clé dans l'initiation de ces processus mais ses mécanismes physiopathologiques sont aujourd'hui inconnus. Dans notre travail, nous avons formulé l'hypothèse qu'une augmentation de la voie de l'arginase vasculaire pouvait être impliquée dans la DE associée à la PR. L'arginase est une enzyme qui régule le niveau de monoxyde d'azote (NO) dans les cellules endothéliales par compétition avec la NO Synthase (NOS) pour leur substrat commun, la L-arginine. Nos travaux ont été conduits sur le modèle d'Arthrite Induite à Adjuvant (AIA) chez le rat Lewis, la fonction endothéliale étant étudiée sur des anneaux aortiques prélevés 21 jours après le début des symptômes.

Dans une première étude, nous avons montré que la vasodilatation Acétylcholine (ACh) dépendante était significativement altérée chez les rats AIA, témoignant de la présence d'une dysfonction endothéliale, tandis que la réponse à la noradrénaline et au sodium nitroprusside ne différait pas de celle des rats témoins. Le L-NAME (inhibiteur de NOS) a réduit la vasodilatation ACh dépendante dans une moindre mesure chez les rats AIA par rapport aux rats témoins. L'incubation des anneaux aortiques avec la nor-NOHA a amélioré la réponse vasculaire à l'ACh chez les rats AIA. Comparativement aux rats témoins, l'activité et l'expression vasculaire de l'arginase se sont révélées augmentées chez les rats AIA et corrélées positivement à la sévérité de l'arthrite.

Dans une deuxième étude, nous avons caractérisé les mécanismes impliqués dans la DE du rat AIA. Nos résultats ont montré que la DE mettait en jeu une diminution de l'activité de la NO synthase, un déficit en EDHF, une suractivité de la COX-2, de la thromboxane synthase et de la prostacycline synthase, ainsi qu'une production excessive des anions superoxydes. Le traitement curatif des rats AIA par un inhibiteur sélectif d'arginase, la nor-NOHA (40 mg/kg/j pendant 3 semaines, ip), a permis de restaurer complètement la fonction endothéliale, via une diminution de l'activité de la COX-2, de la thromboxane synthase et des prostacyclines, une diminution du stress oxydant et une augmentation de l'activité NOS et d'EDHF. En revanche, l'inhibition de l'activité de l'arginase n'a pas modifié l'évolution pondérale, le diamètre des chevilles, l'atteinte radiologique ou histologique articulaire des rats AIA.

En conclusion, nos travaux ont permis de mieux comprendre la physiopathologie de la DE associée à la polyarthrite rhumatoïde et ont déterminé pour la première fois le rôle délétère de l'arginase dans cette anomalie. Ils ouvrent des perspectives quant à l'utilisation des inhibiteurs d'arginase comme futurs traitements pharmacologiques de l'atteinte vasculaire du patient PR.

Abstract

Role of arginase in vascular disease associated with arthritis in rats

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common chronic inflammatory rheumatism. RA patients are characterized by a decrease in life expectancy of 10 to 15 years compared with the general population. Cardiovascular risk represents the first cause of mortality from this disease, and RA is now considered as an independent cardiovascular risk factor. This increase in mortality from cardiovascular etiology seems to be related to the existence of atheroma process accelerated in patients with arthritis. Recent data show that endothelial dysfunction (ED) has a key role in the initiation of these processes but its pathophysiological mechanisms are currently unknown. In our work, we hypothesized that increased arginase pathway could be involved in vascular ED associated with RA. The arginase is an enzyme which regulates the level of nitric oxide (NO) in the endothelial cells by competing with the NO synthase (NOS) to their common substrate, L-arginine. Our work has been done on the model of Adjuvant Induced Arthritis (AIA) in Lewis rats, endothelial function was studied in aortic rings, 21 days after onset of articular symptoms.

In a first study, we showed that acetylcholine (ACh) dependent vasodilation was significantly altered in AIA rats, indicating the presence of endothelial dysfunction, whereas the response to norepinephrine and sodium nitroprusside did not differ from that control rats. L-NAME (NOS inhibitor) reduced ACh-dependent vasodilation lesser in AIA rats than control rats. The incubation of aortic rings with nor-NOHA has improved the vascular response to ACh in AIA rats. Compared with control rats, the activity and expression of vascular arginase are increased in AIA rats and positively correlated with the severity of arthritis.

In a second study, we characterized the mechanisms involved in DE in AIA rats. Our results showed that ED involved a decrease of activity of NO synthase, a decrease of EDHF, overactivity of COX-2, thromboxane synthase and prostacyclin synthase, as well as excessive superoxide anions. The cure of AIA rats by a selective inhibitor of arginase, nor-NOHA (40 mg / kg / day for 3 weeks, ip), has completely restored endothelial function via a decrease in the activity of COX-2, thromboxane synthase and prostacyclin, decreased oxidative stress and increased NOS activity and EDHF. In contrast, inhibition of arginase activity did not change the weight, the diameter of ankles, radiological or histological articular damage in AIA rats.

In conclusion, our work has led to a better understanding of pathophysiology of ED associated with rheumatoid arthritis and determined for the first time the deleterious role of arginase in this vascular anomaly. These results open prospects for the use of arginase inhibitors as future pharmacological treatment of vascular patient PR.

Liste des abréviations

5-HT	sérotonine
A-I	Anti-apolipoprotéine
AA	acide arachidonique
AAN	Anticorps Anti-Nucléaire
ABH	2(S)-amino-6-boronoheptanoic acid
ACh	AcétylCholine
ACPA	Anti-Citrullinated Peptide Antibody
ADA	Adalimumab
ADMA	asymmetric dimethylarginine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AGEs	Advanced Glycation End Products
AIA	Arthrite Induite à Adjuvant
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
AIx	Augmentation Index
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ATII	Angiotensine II
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BEC	[(S)-(2-Boronoethyl)-L-cysteine]
BH4	tétrahydrobioptérine
BK	Bradykinine
CCP	Citric Citrullinated Peptid
CD	Cluster of Differentiation
CFA	Adjuvant Complet de Freund
CIA	Collagen-induced arthritis
CMH	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
COMP	Cartilage Oligoméric Matrix Protéin
COX	Cyclo-Oxygénase
CPA	Cellules Présentatrices d’antigènes
CRP	Protéine C Réactive
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CV	Cardiovasculaire
DA	Dark Agouti
DE	Dysfonction Endothéliale
DMARDs	Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs
DRBB	Diabetic Resistant BB
ECAM-1	endothelial cell adhesion molecule-1
ECE	enzyme de conversion de l’endothéline
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
EDRF	Facteur Relaxant Dérivé de l’Endothélium
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ET-1	Endothéline-1
ETN	Etanercept
EULAR	European League Against Rheumatism
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FBF	Forearm Blood Flow
FGF	Fibroblast Growth Factors

FMD	Flow Mediated Dilation
FMN	flavin mononucleotide
FR	Facteur Rhumatoïde
G6PI	Glucose-6-phosphate isomerase
GC	Glucocorticoïdes
GMPc	Cyclique Guanosine MonoPhosphate
HAQ	Health Assessment Questionnaire
HAS	Haute Autorité de Santé
HDL	High Density Lipoprotein
HES	Hematoxylin Erythrosin Saffron
HEV	High endothelial veinule
HLA	Human Leucocyte Antigen
HR	Hazard Ratio
Hsp	Heat Shock Protein
HTA	Hyper Tension Artérielle
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IEC	Inhibiteurs Enzyme de Conversion
IFN	Interféron
IFX	Infliximab
Ig	Immunoglobuline
IL	interleukine
i.p.	Intra Péritonéal
IPD	Articulation Inter Phalangienne Distale
IRM	Imagerie par résonance magnétique
IV	Intra Veineux
Km	The Michaelis constant
L-arg	L-arginine
L-cit	L-citrulline
L-NAME	L-NG-Nitroarginine Methyl Ester
LB	Lymphocyte B
LDL	Low Density Lipoprotein
LEI	Limitante Elastique Interne
LEE	Limitante Elastique Externe
LEW	Lewis
LPS	lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
MB	<i>Mycobacterium Butyricum</i>
MCP	Articulation Méta-Carpo-Phalangienne
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MT	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
MTX	Methotrexate
NA	Noradrénaline
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NMD	nitroglycerine-mediated vasodilation
NO	Nitric Oxide (Monoxyde d'azote)
NOS	Nitric Oxide Synthase
Nor-NOHA	N ω -hydroxy-nor-L-arginine
NT-proBNP	N-terminal pro-brain natriuretic peptide
OIA	Oil-Induced Arthritis
OR	Odds Ratio

P	purines
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PGE2	prostaglandines E2
PGI2	prostacycline
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
RA	Rheumatoid arthritis
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand
ROS	reactive oxygen species
RP	Rhumatisme Psoriasique
RR	Risque Relatif
SA	Spondylarthrite ankylosante
SC	Sous Cutané
SCORE	systematic coronary risk evaluation
SOD	SuperOxyde Dismutase
SSZ	Sulfasalazine
t-PA	Activateur du Plasminogène
TCR	T Cell Receptor
TGFβ	Transforming Growth Factor β
Th	T Helper
TNF	Tumor Necrosis Factor
TXA2	Thromboxane A2
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VP	vasopressine
VS	Vitesse de sédimentation

Introduction générale

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Il existe une diminution de l'espérance de vie de 10 à 15 ans chez ces patients par rapport à la population générale, en particulier dans les formes associant aux synovites et arthrites, une atteinte extra-articulaire (1). Le risque cardiovasculaire représente le premier facteur de mortalité de cette maladie, et la PR est aujourd'hui considérée comme un facteur de risque cardiovasculaire indépendant (2). Cette augmentation de la mortalité d'origine cardiovasculaire semble liée à la présence de processus athéromateux accélérés et exagérés chez le patient arthritique, se traduisant par une prévalence accrue d'infarctus du myocarde, d'insuffisance cardiaque congestive et d'accidents vasculaires cérébraux. La présence d'une inflammation systémique chronique serait l'un des facteurs responsable de l'accélération de l'athérogenèse chez ces patients arthritiques (3). Il est bien établi que la dysfonction endothéliale (DE) est l'étape la plus importante dans l'athérogenèse précoce et contribue également au développement dans les stades ultérieurs de la maladie vasculaire, à la progression de la plaque d'athérome (4). Il a été démontré que la DE se produit précocement chez les patients atteints de PR (5), cependant, les mécanismes physiopathologiques de la DE associée à la PR sont mal compris.

L'arginase est une enzyme clé du cycle de l'urée, qui transforme la L-arginine en urée et ornithine. Initialement découverte dans le foie, des études ont montré sa localisation au niveau de l'endothélium vasculaire et des cellules musculaires lisses vasculaires. La L-arginine est également le substrat de la NO synthase endothéliale, qui synthétise le monoxyde d'azote (NO), agent vasorelaxant, médiateur de la régulation du tonus vasculaire basal. Compte-tenu de la compétition possible entre l'arginase et la NO synthase pour leur substrat commun, la L-arginine, une augmentation d'activité de l'arginase pourrait diminuer la disponibilité en L-arginine pour la NO synthase et participer alors à la DE qui traduit une anomalie de disponibilité endothéliale en NO. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que l'expression et l'activité de l'arginase pouvaient être augmentées par des stimuli pro-inflammatoires (6). Alors que les données dans le domaine cardio-vasculaire s'accordent pour établir l'arginase comme une cible thérapeutique importante, il existe très peu d'études dans la PR.

Aussi, l'ensemble de ces données nous incite à évaluer le rôle de l'arginase dans la DE associée à la PR.

Le travail a été conduit chez le rat sur le modèle d'Arthrite Induite à Adjuvant (AIA) mimant la PR chez l'Homme. Sur ce modèle, nous avons caractérisé les anomalies de l'arginase au niveau artériel et étudié l'effet d'un inhibiteur d'arginase, la N ω -hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA), sur la DE, les cytokines inflammatoires et endothéliales plasmatiques et l'atteinte clinique, radiologique et histologique articulaire.

La mise en évidence de l'implication de cette enzyme dans cette anomalie endothéliale contribuant aux complications cardiovasculaires du patient arthritique constituerait une découverte originale, permettant l'élucidation d'un nouveau mécanisme physiopathologique et l'identification d'une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

I. Données bibliographiques

I1. La polyarthrite rhumatoïde

I11 Epidémiologie et physiopathologie

La polyarthrite rhumatoïde est un rhumatisme inflammatoire chronique entraînant une destruction articulaire progressive et des répercussions fonctionnelles, psychologiques, sociales et professionnelles parfois graves pour le patient. Il s'agit du rhumatisme inflammatoire le plus fréquent, touchant 0,3 à 0,5% de la population française et le plus sévère. Les manifestations initiales sont caractérisées par des douleurs articulaires associées à un enraidissement matinal et un gonflement articulaire (synovite). Il existe typiquement un syndrome inflammatoire, une atteinte articulaire (érosions, voire destructions articulaires) et inconstamment des manifestations extra-articulaires tels que des nodules rhumatoïdes. L'évolution de cette affection se fait par poussées et, en l'absence de prise en charge, entraîne un handicap. (7. Définition HAS 2008)

La synovite (inflammation de la membrane synoviale) est la lésion élémentaire responsable de la destruction articulaire. Elle est liée à des anomalies de l'immunité à médiation cellulaire, avec activation des lymphocytes T. Plusieurs phases caractérisent l'évolution de la synovite rhumatoïde : initiation, recrutement cellulaire et inflammation, prolifération synoviale, destruction de l'articulation et réparation. Elles peuvent être individualisées de manière schématique (figure 1), mais sont en réalité très intriquées.

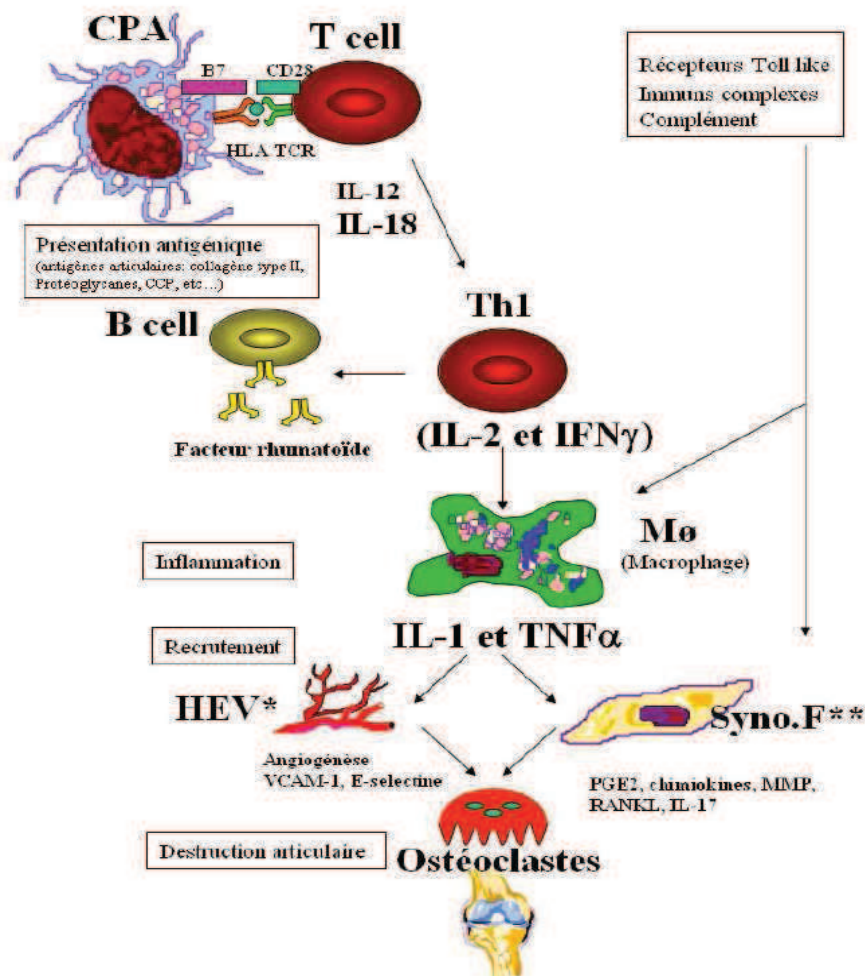


Figure 1 : Schéma général récapitulatif de la physiopathologie de la PR. Sous l'effet des facteurs environnementaux, les peptides subissent une citrullination. Ces peptides citrullinés seraient anormalement présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) aboutissant à une activation des lymphocytes T et B. Ces lymphocytes stimulerait par l'intermédiaire de cytokines les synoviocytes et les macrophages. Les molécules (cytokines, enzymes) produites par ces cellules favoriseraient l'inflammation par le recrutement des cellules professionnelles de l'inflammation et activeraient les ostéoclastes. Ces ostéoclastes sous l'effet de RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand) seraient activés et interviendraient dans la destruction ostéoarticulaire. * HEV : High endothelial veinule (veinule post capillaire). **Syno.F : Synoviocytes fibroblastiques. Figure issue du cours Polyarthrite rhumatoïde DIU Polyarthrites et maladies systémiques J. Morel

a. Phase d'initiation

Le mécanisme de déclenchement du processus pathologique reste inconnu. Le premier événement pourrait être une réponse inflammatoire « non spécifique » à un stimulus encore non identifié, avec accumulation synoviale de monocytes/macrophages qui produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 (IL-1), le Tumor Necrosis Factor α (TNF α) et l'IL-6. Les peptides antigéniques qui déclencheraient spécifiquement la PR

demeurent inconnus. On tend actuellement à incriminer des autoantigènes situés dans l'articulation (collagène de type II, protéoglycanes, protéines de la matrice) ainsi que des peptides d'origine exogène, issus de bactéries ou de virus. Quant à savoir à quel moment la PR devient une maladie systémique inflammatoire il est difficile de répondre précisément. Plusieurs études ont montré la présence de facteurs rhumatoïdes et d'ACPA (anti-citrullinated peptide antibody) jusqu'à 10 ans avant le début de la maladie, ce qui indiquerait que l'apparition d'une première synovite serait en fait la traduction visible de mécanismes immunitaires et inflammatoires activés bien auparavant (8).

b. Phase de recrutement et inflammation

Le processus inflammatoire est donc initié par les macrophages. Ceux-ci contribuent ensuite au recrutement non spécifique des lymphocytes T et polynucléaires sanguins, grâce à l'action de cytokines à activité chimiotactique et à l'augmentation, par le $TNF\alpha$, de l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales. Les macrophages interagissent dans la synoviale avec les lymphocytes T en leur présentant des peptides antigéniques associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Cette activation est ensuite amplifiée par les lymphocytes T $CD4+$, responsables d'activations cellulaires en cascade, de la production accrue de cytokines et de molécules effectrices, amplifiant l'inflammation synoviale et provoquant des destructions tissulaires.

Rôle des cytokines

Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle pathogénique clé sur les processus d'inflammation, de prolifération synoviale et de destruction du cartilage. Il existe dans l'articulation rhumatoïde un déséquilibre entre les cytokines à action pro-inflammatoire, comme le $TNF\alpha$, l'IL-1 et l'IL-6, présentes en excès, et les cytokines à action anti-inflammatoire, représentées par l'IL-10, l'IL-4, l'IL-13, les récepteurs solubles du $TNF\alpha$ et l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1RA), qui sont présents en quantité insuffisante et ne peuvent bloquer l'action des premières. Des cytokines favorisant l'angiogenèse et la prolifération cellulaire sont également présentes dans la membrane synoviale : $TGF\beta$ (Transforming Growth Factor β), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et FGF-1 et 2 (Fibroblast Growth Factors 1 and 2). Cette angiogenèse est indispensable au recrutement des lymphocytes, macrophages et polynucléaires neutrophiles sanguins. Ces cytokines et leurs récepteurs sont des cibles thérapeutiques particulièrement importantes.

Rôle des lymphocytes B

Des lymphocytes B sont activés localement par les lymphocytes T CD4+. Ils se multiplient et se différencient en plasmocytes qui produisent des immunoglobulines polyclonales et du facteur rhumatoïde (FR). Ceux-ci participent au mécanisme lésionnel de la PR. Ils interviennent dans les lésions de vascularites par l'intermédiaire de dépôts de complexes immuns FR-IgG (Immunoglobuline G) sur les parois vasculaires. Les FR à la surface des lymphocytes B présentent de façon efficace des peptides antigéniques aux lymphocytes T.

Les ACPA et les facteurs rhumatoïdes IgM sont corrélés positivement à la présence d'une dysfonction endothéliale chez des patients atteints de PR. Mais nous ne savons pas si ces anticorps ont un rôle direct sur la fonction endothéliale (9).

Rôle des polynucléaires neutrophiles

L'augmentation anormale du nombre des polynucléaires neutrophiles dans le liquide synovial des sujets atteints de PR serait due à un exsudat, lui-même favorisé par la production locale de facteurs chimiotactiques, produits de l'activation du complément et de l'activation cellulaire locale. En réponse à l'ingestion de complexes immuns et à l'activation locale par les cytokines et chimiokines, les polynucléaires neutrophiles infiltrés dans la synoviale produisent des métabolites de l'oxygène et d'autres médiateurs de l'inflammation, dont les métabolites de l'acide arachidonique, qui renforceraient les phénomènes inflammatoires.

c. Angiogenèse – Pannus

Les lésions observées initialement sont en rapport avec une atteinte vasculaire, segmentaire ou focale, incluant des microthromboses et une néovascularisation, dues à une atteinte microvasculaire articulaire et à un infiltrat périvasculaire par des cellules myéloïdes, puis des lymphocytes. On note également une hyperplasie des cellules synoviales. Le tissu synovial inflammatoire et prolifératif, ou « pannus », tend à recouvrir le cartilage articulaire et serait le siège de la production d'enzymes, responsables de la destruction du cartilage et de l'os.

d. Phase de réparation

La phase de réparation, responsable de la fibrose articulaire, a lieu parallèlement à la phase de destruction, mais ne compense pas le processus de destruction. Elle fait participer des facteurs de croissance et le TGF β .

I12 Diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde

Le diagnostic de la PR doit être aussi précoce que possible car c'est au stade du début de la maladie que les traitements ont le plus de chance d'être efficaces. Cette « fenêtre d'opportunité thérapeutique » est d'autant plus capitale qu'à ce stade de la maladie, il n'existe aucune déformation ou lésion radiologique. Savoir évoquer, devant une polyarthrite débutante, le diagnostic de PR est donc fondamental : le diagnostic différentiel est alors le point crucial. À la phase initiale, il faut savoir confirmer l'existence d'arthrite ou de synovite : gonflement articulaire lié à un épaissement synovial ou à un épanchement articulaire, qui sont à différencier des algies ou polyarthralgies (absence de tuméfaction) ou des tendinopathies.

a. Manifestations cliniques de la polyarthrite rhumatoïde débutante

La polyarthrite rhumatoïde débutante

La PR est une atteinte bilatérale, le plus souvent symétrique et « nue » (cela signifie qu'il n'existe aucun signe extra-articulaire ou axial associé) dans 70 % des cas. Elle touche les poignets et une ou plusieurs articulations métacarpophalangiennes (deuxième et troisième le plus souvent) ou interphalangiennes proximales. On note habituellement un respect des articulations interphalangiennes distales. Ces atteintes articulaires sont fixes et symétriques. Les douleurs sont de rythme inflammatoire avec réveil nocturne et dérouillage matinal supérieur à trente minutes. Le signe clinique à la palpation est la synovite : gonflement articulaire rénitent parfois tendu (Figure 2). Au doigt, on note un aspect caractéristique de « fuseau » ; au poignet une tuméfaction avec parfois, ce qui est évocateur, une ténosynovite cubitale.

À la phase de début, on observe fréquemment des métatarsalgies bilatérales apparaissant dès le premier pas le matin. L'examen clinique peut montrer une douleur à la compression latérale des métatarsophalangiennes ou des métacarpophalangiennes (le squeeze test des Anglo-Saxons) qui est assez évocatrice du diagnostic de PR débutante.



Figure 2. Photographie de main atteinte d'une polyarthrite rhumatoïde. Les flèches indiquent la présence de synovites interphalangiennes proximales des 2^{ème} et 3^{ème} rayons

D'autres manifestations cliniques peuvent être révélatrices :

Dans 10 % à 15 % des cas, il s'agit d'une polyarthrite aiguë fébrile avec altération de l'état général et fièvre supérieure à 38,5 °C. Bien entendu ce diagnostic ne sera retenu qu'après avoir éliminé les autres étiologies d'arthrites fébriles.

Rarement (10 % des cas), une atteinte rhizomélique, une monoarthrite du poignet ou du genou ou une ténosynovite isolée, un rhumatisme intermittent avec poussée monoarticulaire, une atteinte extra-articulaire.

Evolution de la polyarthrite rhumatoïde

La PR une fois installée tend progressivement vers l'aggravation et l'extension des atteintes articulaires. Cette extension se fait souvent à l'occasion de poussées évolutives. Ces poussées successives sont classiquement entrecoupées d'accalmies relatives voire de rémissions vraies. Le déclenchement des poussées reste mal compris. Cependant certains facteurs déclenchants ont parfois été observés. Il peut s'agir d'infections intercurrentes, de traumatismes ou souvent de chocs ou de conflits psychologiques.

Le handicap fonctionnel engendré par la PR est variable. Il dépend à la fois de l'état inflammatoire et de l'importance de la destruction articulaire dans le temps. En pratique

courante et dans les études cliniques il est habituellement évalué par le score HAQ (Health Assessment Questionnaire). Près de la moitié des malades ont un handicap fonctionnel important après 10 ans d'évolution, nécessitant l'arrêt de leur activité professionnelle (10). Dans 10 % des cas la PR engendre une invalidité grave en moins de deux ans. Après 5 ans d'évolution, des travaux ont montré que les patients atteints de PR perdaient plus de 10 % de leurs activités initiales (11).

Ces données classiques sont actuellement remises en cause par l'amélioration du pronostic et de l'évolution de la maladie constatée récemment et certainement liée aux nouvelles thérapeutiques et aux nouveaux concepts de prise en charge de la maladie. L'objectif de la prise en charge notamment au début est maintenant l'obtention à court terme de la rémission ou au moins d'un faible niveau d'activité dans le but de limiter ou prévenir les lésions articulaires et le handicap irréversibles et de plus en plus les manifestations systémiques notamment cardiovasculaires et osseuses.

Il existe des formes sévères avec soit des atteintes viscérales pouvant mettre en jeu le pronostic vital, soit des destructions articulaires rapides sources d'un handicap fonctionnel important. A l'opposé la PR peut être bénigne pouvant soit guérir complètement soit entraîner peu ou non une gêne fonctionnelle, avec des lésions radiographiques et des déformations minimales, voire inexistantes même après de longues années d'évolution. Dans l'évolution habituelle, l'atteinte articulaire s'étale sur de nombreuses années mais il existe certaines formes graves où cette évolution est beaucoup plus rapide, aboutissant en un à deux ans à une polyarthrite généralisée, très inflammatoire, souvent très destructrice (Figure 3). Ce sont souvent ces formes qui se compliquent de vascularites et de manifestations extra-articulaires graves tels que l'anémie, l'amylose, les névrites, les pneumopathies interstitielles diffuses. C'est ainsi qu'après dix ans d'évolution, l'état des malades est extrêmement variable. Bien que nous manquions de données scientifiques solides, on peut considérer qu'il y a environ 20 à 30% de PR bénignes dont la moitié en rémission et à l'opposé, 10 à 20% de formes très sévères. Cette répartition évolue en fonction de la disponibilité de nouvelles thérapeutiques.



Figure 3. Exemples de déformations des mains et poignets dans une PR ancienne. A : Tuméfaction des articulations métacarpo-phalangiennes, amyotrophie des muscles interosseux dorsaux et probable luxation de la tête ulnaire responsable d'un poignet dit en « dos de chameau » B : Déviation ulnaire des doigts ou coup de vent cubital. (diapothèque du COFER, www.iecofer.org)

Des rémissions sont fréquentes au cours de la PR (12). Elles surviennent surtout au début de la maladie et peuvent durer de quelques mois à plusieurs années. Selon les études classiques 10 à 25 % des patients au maximum entrent en rémission. Avec les nouvelles thérapeutiques celle ci peut être envisagée chez près de la moitié des patients selon les critères de rémission utilisés (13). Ils n'ont plus de douleur, plus d'inflammation articulaire, plus de perturbation biologique et leur maladie paraît éteinte. En dépit de cette apparente guérison, une nouvelle poussée peut toujours survenir. Ainsi, chez un malade recevant un traitement de fond, il est impossible de déterminer si la rémission est spontanée ou consécutive à ce traitement. Plusieurs études ont montré qu'il existait un risque indéniable de déclencher une nouvelle poussée si l'on arrêta un traitement de fond chez un malade en rémission. Nous savons qu'il est possible que des patients soient en rémission clinico-biologique alors qu'ils progressent toujours sur le plan radiologique, nous ne savons pas chez ces mêmes patients s'ils peuvent toujours « progresser » sur le plan endothélial. D'autres événements peuvent favoriser une rémission et tout particulièrement la grossesse pendant laquelle une rémission est notée dans

plus de 75 % des cas dès la fin du premier trimestre, permettant l'arrêt des thérapeutiques. Par contre, classiquement, il existe une reprise évolutive de la maladie en moyenne 6 semaines après l'accouchement mais parfois très précocement.

b. Diagnostic différentiel

Lorsque le diagnostic de polysynovite (gonflements articulaires) est certain, il faut alors savoir rechercher les signes des autres diagnostics potentiels. Pour confirmer le caractère « nu » de la polysynovite, il faut systématiquement éliminer une fièvre, une polyarthrite avec anomalies cardiologiques et une polyarthrite avec signes cutanés, digestifs, ophtalmologiques, neurologiques, ORL, uronéphrologiques ou axiaux.

c. Explorations complémentaires

Après l'interrogatoire et l'examen clinique, on peut dans la plupart des cas évoquer le diagnostic de PR débutante si la polyarthrite est bilatérale, symétrique et nue. Cependant, certaines explorations complémentaires sont utiles.

Explorations radiologiques devant une suspicion de polyarthrite rhumatoïde débutante

- Radiographies des mains et poignets de face et des pieds (trois quarts et face) ;
- Radiographie de thorax (face et profil).

Ces examens sont réalisés dans le but d'éliminer d'autres diagnostics (recherche d'adénopathies sur la radiographie de thorax pouvant faire évoquer une sarcoïdose, liseré de chondrocalcinose sur les radiographies articulaires, etc.), de rechercher la présence de pincements, d'érosions ou de subluxations caractéristiques des articulations des mains et des pieds (Figure 4) (elles sont exceptionnelles à la phase de début, leur présence étant alors de mauvais pronostic) et de servir de référence pour la surveillance évolutive ultérieure. La radiographie standard est le plus souvent normale. L'utilisation de l'échographie des mains (Figure 5) ou des pieds et de l'IRM se développe actuellement dans le but de confirmer (ou de montrer précocement) l'existence d'une synovite, de confirmer ou d'infirmier l'existence d'érosions articulaires parfois infra-radiologiques et de définir le siège précis de l'atteinte articulaire.



Figure 4. Radiographie de face de la main droite et du poignet : déminéralisation diffuse. Pincement diffus de l'articulation radio-carpienne, des articulations métacarpo-phalangiennes (MCP) avec subluxation des 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} MCP.

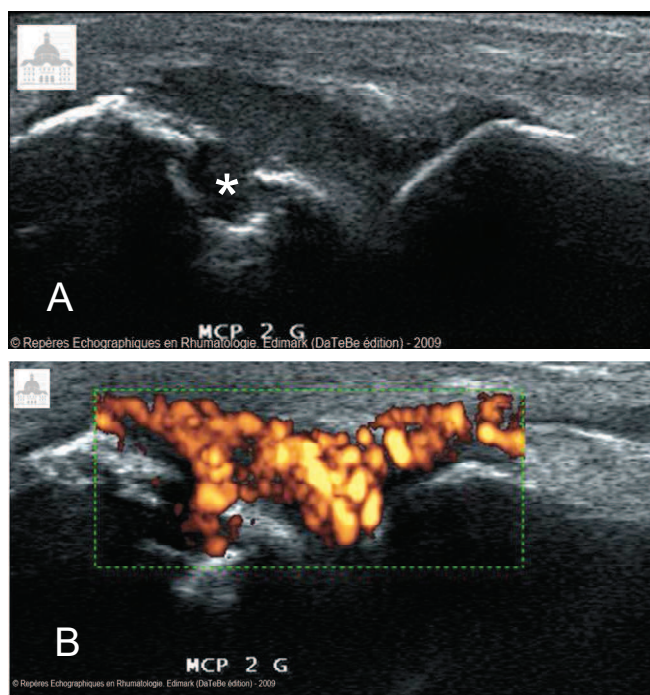


Figure 5. Echographie d'une 2^{ème} articulation métacarpo-phalangienne gauche. A : en mode B, avec visualisation d'une érosion (*). B : en mode doppler puissance avec la visualisation d'une synovite « chaude » importante.

Biologie usuelle

Il existe dans 90 % des cas un syndrome inflammatoire non spécifique, avec augmentation de la vitesse de sédimentation globulaire (VS), et/ou de la protéine C Réactive (CRP). La normalité n'élimine pas le diagnostic. L'électrophorèse sérique objective une augmentation des alpha-2 et, parfois, des gammaglobulines. Il existe parfois une anémie modérée d'origine inflammatoire. Elle est assez bien corrélée avec l'évolutivité de la maladie articulaire. On peut parfois noter une hyperleucocytose avec polynucléose, une thrombocytose et parfois une éosinophilie. La leuco-neutropénie est plus rare, s'intégrant alors dans le cadre d'un syndrome de Felty, voire d'un syndrome des grands lymphocytes granuleux.

Biologie spécifique

- Facteur rhumatoïde

Le facteur rhumatoïde (FR) est une immunoglobuline, de type IgM le plus souvent, ayant une activité anticorps dirigée contre les immunoglobulines G humaines ou animales. Il était classiquement recherché par la réaction de Waaler-Rose (globules rouges de mouton sensibilisés par du sérum de lapin anti-globules rouges de mouton, la réaction se faisant contre les immunoglobulines anti-globules rouges) ou le test au latex (particules de polyester recouvertes d'immunoglobulines humaines). Actuellement, la détection du FR s'effectue par néphélogométrie laser (technique automatisable exprimée en unités) ou par la technique ELISA qui est plus répandue et plus sensible (seuil : 20 UI/ml). Au début de la PR, la recherche de FR est positive dans 50 % à 60 % des cas environ. La présence d'un taux significatif de FR dès le début de la maladie est un élément de mauvais pronostic. Mais la présence de FR est loin d'être synonyme de PR : le FR n'est ni indispensable ni suffisant pour affirmer le diagnostic. Sa spécificité est de 75 % à 85 % et sa sensibilité de 70 % à 80 %. Le FR n'a pas de rôle direct dans le développement de la synovite rhumatoïde comme l'atteste le développement de polyarthrites très érosives chez des patients n'ayant pas de FR. À l'inverse, le FR est impliqué dans certaines complications extra-articulaires, en particulier dans la vascularite où il se dépose dans la paroi des vaisseaux et forme des complexes immuns de taille intermédiaire activant le complément et induisant l'inflammation vasculaire.

- Anticorps anti-peptides citrullinés (ACPA)

Ces anticorps ont été d'abord connus sous le terme d'anticorps anti-kératine et d'anticorps anti-périnucléaire. Il a été montré que ces auto-anticorps de type IgG pourraient être dirigés contre la filaggrine, une protéine qui joue un rôle dans l'assemblage des filaments intermédiaires des kératinocytes (14). Par la suite on a montré que la filaggrine subissait d'importantes modifications sous l'effet de peptidylarginines déiminases et que les anticorps «anti-filaggrine» étaient dirigés contre des protéines déiminées dont les résidus arginine étaient transformés en citrulline : ce sont les ACPA. De nombreux tests ELISA ont été développés pour les identifier (14). L'ELISA permet une détection beaucoup plus facile des anticorps anti-filaggrine. De plus, tout en gardant une spécificité élevée au moins identique à celle des anticorps anti-kératine, les ACPA ont une sensibilité de l'ordre de 60 à 70 %, meilleure que les tests d'immunofluorescence. Enfin, comme pour le FR des ACPA ont été trouvés dans le sérum de patients des mois et même des années avant le début de la PR. Leur taux varie également peu au cours du temps et en cas de positivité confirmée il n'est pas utile de répéter leur recherche. La recherche d'ACPA au même titre que celle du FR doit actuellement faire partie du bilan biologique initial de tout rhumatisme inflammatoire périphérique débutant. La technique de référence est aujourd'hui les tests de 2ème génération (anti-CCP2).

Deux études longitudinales confirmées par une étude sur des jumeaux ont montré un risque plus élevé de développer une PR chez patients tabagiques (15). De plus la consommation tabagique est plus fréquente chez les patients atteints de PR avec ACPA ainsi que chez ceux qui ont un gène HLA codant pour « l'épitope partagé ». Ces observations ajoutées à l'action favorisante du tabac sur la citrullination des protéines de la muqueuse bronchique permettent d'imaginer une hypothèse pouvant expliquer cette relation entre tabac et PR. Le tabac favoriserait la citrullination de peptides qui seraient reconnus par les molécules HLA contenant l'épitope partagé. La présentation du peptide citrulliné et sa reconnaissance déclencherait une réponse immunitaire humorale avec production d'ACPA.

- Anticorps antinucléaires

La recherche des anticorps antinucléaires (AAN) doit être systématique au cours de la PR au début, notamment pour éliminer une éventuelle maladie lupique. On trouve dans la PR des AAN dans 15 à 30 % des cas, à un titre généralement assez faible. Les anticorps anti-ADN natif, caractéristiques de la maladie lupique sont très rares au cours de la PR (moins de 5 % des cas par la méthode de Farr ; plus fréquents par tests ELISA qui sont plus sensibles mais

moins spécifiques aux titres faibles). Les anticorps anti-antigènes nucléaires solubles (anti-RNP ribonucléoprotéines, anti-SSA ou anti-SSB) sont rares dans la PR sauf en cas de syndrome de chevauchement.

Les PR ayant des AAN s'accompagnent plus fréquemment de manifestations extra-articulaires (en particulier d'un syndrome de Gougerot-Sjögren). Il n'y a pas de corrélation entre la présence d'AAN et la gravité des signes articulaires. Certains traitements de fond (dérivés thiolés, sulfasalazine, anti-TNF) peuvent induire l'apparition d'AAN, le plus souvent sans traduction clinique.

- typage HLA de classe II

La PR est associée à certains allèles HLA DRB1*04 et DRB1*01. Les allèles DRB1*04 sont présents chez environ 60 % des patients et 20 % des témoins et les allèles DR1 chez environ 30 % des malades et 20 % des témoins. Du fait de cette très forte représentation dans la population générale, la détermination des gènes HLA DRB1* n'a pas d'intérêt pour le diagnostic de la PR mais a une certaine valeur pronostique (16).

Examen du liquide synovial

Tout épanchement intra-articulaire accessible doit être ponctionné pour une analyse bactériologique, cytologique et pour la recherche de microcristaux. La ponction soulage la douleur et l'analyse oriente le diagnostic. Il s'agit, au cours de la PR, d'un liquide inflammatoire non spécifique, riche en cellules, à majorité de polynucléaires neutrophiles. Parfois, la formule est à prédominance lymphocytaire. Le dosage du complément ou des autoanticorps dans le liquide articulaire n'est pas utile en pratique quotidienne.

I13 Traitement

La PR nécessite une prise en charge précoce et pluridisciplinaire qui peut faire intervenir, outre le médecin généraliste et le rhumatologue, le chirurgien orthopédiste, le psychologue, l'assistante sociale, l'ergothérapeute, le kinésithérapeute, le médecin de rééducation fonctionnelle et le pharmacien.

a. Information et éducation du patient

L'information puis l'éducation du patient sont fondamentales et nécessaires à tous les stades de la maladie.

b. Traitements médicamenteux

Le traitement de la PR a trois objectifs principaux : soulager les douleurs, stopper l'évolution de la maladie afin de prévenir le handicap.

Soulager les douleurs : le traitement symptomatique

. Repos

Il est préconisé uniquement en cas de poussée inflammatoire de la maladie.

. Antalgiques de niveau I ou de niveau II

Le recours aux antalgiques morphiniques est exceptionnel au cours de la PR.

. Anti Inflammatoire Non Stéroïdiens (AINS)

La toxicité digestive, cardiovasculaire mais également rénale, de tous les AINS justifie une surveillance étroite sur le plan clinique et biologique (mesure de la tension artérielle, contrôle de la fonction rénale).

. Anti-inflammatoires stéroïdiens ou glucocorticoïdes (GC)

La corticothérapie ne doit être utilisée qu'en alternative ou en complément des autres traitements et en cas de PR active invalidante, insuffisamment soulagée par les AINS comme le recommande l'EULAR (tableau 1) (17). On recourt habituellement à une posologie inférieure à 10 mg par jour d'équivalent prednisone, de l'ordre de 5 à 7 mg. De fortes doses de cortisone, dénommées bolus cortisoniques (variant entre 500 mg et 1 g de méthylprednisolone par jour, un à trois jours de suite), peuvent être utilisées en cas de poussées sévères, de façon symptomatique et transitoire pour « casser une poussée évolutive ».

Tableau 1 : Recommandations EULAR concernant l'utilisation de la corticothérapie par voie générale au cours des affections rhumatologiques.

1	Les risques iatrogènes des glucocorticoïdes devraient être pris en considération et discutés avec le patient avant l'initiation thérapeutique (niveau d'évidence IV). Ce conseil devrait être renforcé par l'attribution d'une information adaptée concernant la prise en charge de la corticothérapie (IV). Si une corticothérapie est envisagée au long cours, il est proposé de remettre à chaque patient une carte mentionnant le traitement corticoïdes, précisant notamment la date de début du traitement, la posologie initiale, la réduction possible de doses et le traitement d'entretien (IV).
2	La posologie initiale, le schéma de réduction et la posologie d'entretien sont fonction de la maladie rhumatologique sous-jacente, du niveau d'activité de la maladie, des facteurs de risque et de la réponse individuelle du patient. La répartition du traitement est importante, respectant notamment le rythme circadien à la fois de la maladie et du cycle naturel des corticoïdes (1a – III).
3	Quand une corticothérapie est envisagée, les comorbidités et les facteurs de risque concernant les principaux effets indésirables devraient être évalués et si nécessaire traités ; en particulier l'hypertension artérielle, le diabète, un ulcère digestif, une fracture récente, la présence d'une cataracte ou d'un glaucome, la présence d'infections notamment chroniques, d'une dyslipidémie et la coprescription éventuelle avec un traitement anti-inflammatoire non stéroïdien (IV).
4	En cas de traitement prolongé, la posologie de glucocorticoïdes devrait être la posologie dite minimale efficace et la corticothérapie devrait être réduite en cas de rémission ou faible activité de la maladie ; la justification d'un traitement au long cours devrait être régulièrement réévaluée (IV).
5	Sous traitement, les patients devraient être surveillés et notamment : le poids, la tension artérielle, la présence d'oedèmes périphériques, la recherche d'une insuffisance cardiaque, les marqueurs sériques lipidiques, glycémie / glycosurie et pression oculaire en fonction notamment des facteurs de risque individuels, de la dose et durée du traitement corticoïde (IV).

. Traitements locaux

Des ponctions articulaires évacuatrices en particulier sur les grosses articulations doivent être effectuées chaque fois que nécessaire. Des infiltrations péri-articulaires de GC sont parfois réalisées mais on se méfiera du risque de rupture tendineuse.

Une infiltration de GC intra-articulaire peut être proposée en cas de synovite persistante en dépit du traitement général. Il sera préféré des produits retard, en particulier l'hexacétonide de triamcinolone.

Si la synovite récidive après une à trois infiltrations locales de GC, on peut avoir recours à une synoviorthèse. La synoviorthèse consiste en l'injection intra-articulaire d'un produit capable de détruire, décaper, abraser les cellules de la synoviale qui se sont multipliées. Les synoviorthèses sont aujourd'hui isotopiques (Yttrium 90, Rhénium 196, Erbium 169) car l'acide osmique, surtout utilisé chez l'enfant ou l'adulte jeune, n'est plus disponible. Les synoviorthèses doivent être proposées à un stade où les lésions radiographiques sont absentes ou peu évoluées. Ce traitement donne souvent d'excellents résultats et volontiers prolongés. Ces derniers peuvent être améliorés en mettant l'articulation au repos strict pendant 2 à 3 jours.

Il est possible, chez l'adulte jeune, d'utiliser les isotopes radioactifs car l'irradiation gonadique est faible. Néanmoins, les synoviorthèses de hanche seront évitées avant la quarantaine. Les injections doivent être faites sous contrôle radioscopique avec arthrographie simultanée pour garantir l'administration strictement intra-articulaire. La tolérance est généralement satisfaisante. Un GC est généralement associé pour réduire les réactions douloureuses qui sont toutefois rares après synoviorthèse isotopique.

Réduire l'activité de la maladie

Le deuxième objectif du traitement de la PR consiste à réduire l'évolution de la maladie. Il repose sur la réduction de la fréquence, de la durée, de l'intensité des poussées, et vise l'arrêt de la progression des érosions et des destructions radiologiques.

. Traitements de fond de la polyarthrite rhumatoïde

Les traitements de fonds sont efficaces sur les signes cliniques et biologiques de la maladie et permettent de stopper la progression radiologique. Leur but essentiel est de réduire la

fréquence, la durée, l'intensité des poussées et de réduire globalement l'activité du rhumatisme au mieux jusqu'à l'obtention d'une rémission clinique. L'efficacité d'un traitement et surtout son impact favorable sur la progression radiologique justifient un recours précoce à cette prescription. Le traitement de fond sera prescrit pendant toute la période où il apparaît efficace et bien toléré. Il faut noter que les traitements de fond ne sont pleinement efficaces qu'après plusieurs semaines.

Le choix et l'adaptation des traitements de fond doivent être faits par le rhumatologue qui se base sur

L'estimation de la sévérité potentielle de la maladie

Le rapport bénéfice/risque compte tenu de l'évolutivité de la maladie

La démonstration d'un effet sur la réduction de la progression des signes radiologiques

L'existence éventuelle de comorbidités associées.

La rapidité d'action

Ces principes sont rappelés dans les recommandations de l'EULAR 2010 (tableau 2) (18).

Tableau 2. Recommendations for the management of rheumatoid arthritis with non-biological and biological disease-modifying antirheumatic drugs (18).

Overarching principles

A Rheumatologists are the specialists who should primarily care for patients with RA

B Treatment of patients with RA should aim at the best care and must be based on a shared decision between the patient and the rheumatologist

C RA is expensive in regards to medical costs and productivity costs, both of which should be considered by the treating rheumatologist.

Final set of 15 recommendations for the management of RA

1 Treatment with synthetic DMARDs should be started as soon as the diagnosis of RA is made

2 Treatment should be aimed at reaching a target of remission or low disease activity as soon as possible in every patient; as long as the target has not been reached, treatment should be adjusted by frequent (every 1–3 months) and strict monitoring

3 MTX should be part of the first treatment strategy in patients with active RA

4 When MTX contraindications (or intolerance) are present, the following DMARDs should be considered as part of the (first) treatment strategy: leflunomide, SSZ or injectable gold

5 In DMARD naïve patients, irrespective of the addition of GCs, synthetic DMARD monotherapy rather than combination therapy of synthetic DMARDs may be applied

6 GCs added at low to moderately high doses to synthetic DMARD monotherapy (or combinations of synthetic DMARDs) provide benefit as initial short-term treatment, but should be tapered as rapidly as clinically feasible

7 If the treatment target is not achieved with the first DMARD strategy, addition of a biological DMARD should be considered when poor prognostic factors are present; in the absence of poor prognostic factors, switching to another synthetic DMARD strategy should be considered

8 In patients responding insufficiently to MTX and/or other synthetic DMARDs with or without GCs, biological DMARDs should be started*; current practice would be to start a TNF inhibitor (adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab)† which should be combined with MTX*

9 Patients with RA for whom a first TNF inhibitor has failed, should receive another TNF inhibitor, abatacept, rituximab or tocilizumab

10 In cases of refractory severe RA or contraindications to biological agents or the previously mentioned synthetic DMARDs, the following synthetic DMARDs might be also considered, as monotherapy or in combination with some of the above: azathioprine, ciclosporin A (or exceptionally, cyclophosphamide)

11 Intensive medication strategies should be considered in every patient, although patients with poor prognostic factors have more to gain

12 If a patient is in persistent remission, after having tapered GCs, one can consider tapering biological DMARDs‡, especially if this treatment is combined with a synthetic DMARD

13 In cases of sustained long-term remission, cautious titration of synthetic DMARD dose could be considered, as a shared decision between patient and doctor

14 DMARD naïve patients with poor prognostic markers might be considered for combination therapy of MTX plus a biological agent

15 When adjusting treatment, factors apart from disease activity, such as progression of structural damage, comorbidities and safety concerns should be taken into account

Symbols *, † and ‡ refer to levels of evidence provided in table 2. DMARD, disease-modifying antirheumatic drug; GCs, glucocorticoids; MTX, methotrexate; RA, rheumatoid arthritis; SSZ, sulfasalazine; TNF, tumour necrosis factor.

.Traitements de fond conventionnels.

Le terme anglo-saxon utilisé est « DMARDs » (disease-modifying anti-rheumatic drugs). Actuellement, le traitement de fond le plus fréquemment prescrit lors d'une polyarthrite rhumatoïde débutante est le méthotrexate, traitement de fond de première intention, puis le léflunomide et la sulfasalazine qui possèdent, comme le méthotrexate, un effet différé de 2 à 4 mois avec une efficacité clinique et radiologique significative et un bon taux de maintien thérapeutique.

D'autres traitements ne sont pratiquement plus utilisés en raison de leur manque d'efficacité ou de leur tolérance : les sels d'or, les antipaludéens de synthèse, la ciclosporine et les dérivés sulfhydrylés (D-pénicillamine et tiopronine) (tableau 3).

Certaines équipes utilisent la combinaison de plusieurs traitements de fond, en particulier pour les polyarthrites rhumatoïdes potentiellement sévères avant le recours aux biothérapies.

Tableau 3. Principeaux traitements de fond de la PR, effets secondaires, surveillance.

Traitement de fond	Nom commercial	Principaux effets indésirables	Surveillance	Fréquence des contrôles
Méthotrexate	Méthotrexate® Ledertrexate® Novatrex® Metoject® Imeth®	Nausées, vomissements Toux, dyspnée Fièvre. Anomalies hépatiques Anomalies hématologiques	Hémogramme avec plaquettes Transaminasés Créatininémie Albuminémie	30 jours*
Léflunomide	Arava®	Diarrhée, anomalies hépatiques, hyper tension artérielle	Pression artérielle Hémogramme avec plaquettes Transaminases	15 jours x6 mois puis tous les 2 mois
Sulfasalazine	Salazopyrine®	Digestifs, éruptions Leucopénie	Hémogramme avec plaquettes Transaminases	30 jours
Antipaludéens	Plaquenil® Nivaquine®	Oculaire Prurit Vertiges Troubles digestifs	Contrôle ophtalmologique	1 fois/an
Sels d'or	Allochrysine® Ritauran®	Prurit, érythème Stomatite (aphtes buccaux) idem + diarrhée	Recherche de protéinurie Hémogramme avec plaquettes idem	30 jours idem
Thiolés	Trolovol® Acadione®	Stomatite Troubles du goût Prurit Erythème Induction de mal. auto-immunes	Albumine urinaire Hémogramme avec plaquettes	30 jours
Ciclosporine	Sandimmun® Neoral®	Hypertension artérielle Toxicité rénale Hypertrichose	Créatininémie	15 jours au début puis tous les 20 jours

*Dans le cadre de l'autorisation de mise sur le marché, un contrôle de l'hémogramme avec plaquettes est recommandé tous les 8 jours pendant les 3 premiers mois du traitement.

.Agents biologiques ou biothérapies (tableau 4).

Les anti-TNF α : infliximab (Remicade), étanercept (Enbrel), adalimumab (Humira), certolizumab (Cimzia) et le golimumab (Simponi), sont proposés actuellement dans les polyarthrites sévères, réfractaires (échec des autres traitements de fond). D'autres traitements sont utilisés comme le rituximab (Mabthera) (anticorps anti-CD20 agissant sur les lymphocytes B), l'abatacept (Orencia) (CTLA4-Ig inhibant la voie de la costimulation des lymphocytes T) ou le tocilizumab (Roactemra) (anticorps monoclonal antirécepteur de l'IL-6).

Tableau 4. Traitements biologiques utilisés dans la PR.

DCI	Nom commercial	Mécanisme d'action	Voie d'administration	posologie	Indication dans la PR
Abatacept	Orencia	Protéine de fusion soluble formé du CTLA4 et IgG1 humaine.	IV	10mg/kg mensuel	En association avec le MTX en cas d'échec de ce dernier
Adalimumab	Humira	Ac monoclonal anti-TNF recombinant humain	SC	40mg/2 semaines	En association avec le MTX ou en monothérapie
Anakinra	Kineret	IL-1Ra recombinant	SC	100mg/jour	En association avec le MTX en cas d'échec de ce dernier
Certolizumab pegol	Cimzia	Fragment d'Ac humanisé recombinant anti TNF + polyéthylène glycol	SC	200mg/2 semaines	En association avec le MTX ou en monothérapie en cas d'échec aux DMARDS
Etanercept	Enbrel	Récepteur soluble du TNF	SC	50 mg/semaine	En association avec le MTX ou en monothérapie
Golimumab	Simponi	Ac monoclonal humain anti TNF	SC	50mg/mois	En association avec le MTX
Infliximab	Remicade	Ac monoclonal chimérique anti TNF α	IV	3mg/kg/8 semaines	En association avec le MTX
rituximab	Mabthera	Ac monoclonal chimérique anti-lymphocyte B CD20+	IV	2x1000mg à 15 jours d'intervalle renouvelé à 6 mois au minimum	En association avec le MTX après échec d'au moins 1 anti-TNF
tocilizumab	Roactemra	Ac monoclonal humanisé anti récepteur IL6	IV	8mg/kg/mois	En association avec le MTX ou en monothérapie en cas d'échec aux DMARDS

c. Traitement non médicamenteux

Orthèses d'ergothérapie

Les appareillages de repos jouent un rôle intéressant pour l'antalgie et la prévention de certaines attitudes vicieuses et des déformations. Ils sont toujours utiles sauf si les déformations sont majeures et irréductibles. On conseille au malade de les utiliser durant la nuit et si possible quelques heures dans la journée, surtout au moment des poussées. Il s'agit d'appareillages amovibles confectionnés sur mesure le plus souvent par les kinésithérapeutes ou les ergothérapeutes pour les mains, les genoux et les chevilles et réalisés selon des normes techniques rigoureuses. On peut également confectionner des orthèses de correction et des appareillages de travail dans certains cas (attelles de Sterling-Bunnel pour réduire les déformations des doigts en boutonnière, attelles de rééducation du col de cygne). Des orthèses plantaires sont réalisées mais malheureusement elles n'évitent pas les déformations de l'avant ou de l'arrière pied. Il peut être nécessaire de confectionner des semelles moulées qui bénéficient actuellement des progrès techniques des nouveaux matériaux. En cas de lésions importantes et non opérables des pieds, un chaussage spécialisé peut être proposé.

Physiothérapie et rééducation

Lors des phases inflammatoires, la physiothérapie antalgique, en particulier par le froid (vessie de glace), est indiquée, ainsi que la prévention des attitudes vicieuses (attelle de repos). À distance des poussées, le renforcement musculaire se fait en technique isométrique (économie articulaire) : il vise à récupérer les amplitudes articulaires. Le maintien du mouvement est bénéfique. Dans la polyarthrite rhumatoïde évoluée, une attention particulière sera accordée aux préventions des déformations et à l'adaptation du geste, des ustensiles et du domicile par l'ergothérapie.

Traitement chirurgical

Il vise surtout à soulager les malades. Cependant, à un stade précoce, il permet par ailleurs de prévenir les destructions articulaires (synovectomie). Il peut faire appel à plusieurs techniques – la synovectomie arthroscopique ou chirurgicale est indiquée en cas de synovite persistante malgré le traitement médical général et local ;

– l'arthroplastie (le plus souvent totale) permet d'apporter l'indolence et de rendre la fonction à une articulation détruite, telle que la hanche, le genou ou l'épaule ;

– l'arthrodèse arthroscopique ou chirurgicale permet d'apporter l'indolence et la stabilité à une articulation détruite lorsqu'une arthroplastie est difficilement réalisable (poignet, cheville, arrière-pied).

Aide psychosociale

Une prise en charge psychosociale doit être proposée au malade. De même, les associations de malades peuvent jouer un rôle bénéfique important.

I2. Modèles expérimentaux murins de polyarthrite rhumatoïde

Les modèles animaux de pathologies humaines sont essentiels dans la recherche biomédicale moderne. L'utilisation de ces modèles permet l'étude des mécanismes physiopathologiques, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouvelles stratégies. Dans le cas de la PR, les modèles les plus utilisés sont des modèles murins, les plus fréquents étant le modèle d'arthrite induite à adjuvant (AIA) et le modèle d'arthrite à collagène (CIA). Pour notre travail, nous avons choisi le modèle murin d'arthrite le plus utilisé dans l'étude de la dysfonction endothéliale, l'AIA.

I21. L'arthrite induite à adjuvant (adjuvant-induced arthritis, AIA)

L'AIA est une maladie expérimentale auto-immune médiée par les Lymphocytes T. Elle représente l'un des plus importants modèles d'inflammation chronique. Ce modèle a été mis en place par Pearson en 1956 (19). Depuis, l'AIA a été largement utilisée comme modèle expérimental pour l'étude des processus immuno-inflammatoires des maladies arthritiques chez les humains, notamment la PR et l'étude des effets des traitements.

a. Souches murines utilisées

Ce modèle n'est réalisé que chez le rat. Des rats de souche Lewis, Sprague-Dawley, Wistar, et Buffalo peuvent être utilisés pour l'AIA. Les souches Fisher 334 (F344), le rat DRBB (Diabetic Resistant BB) et le Brown Norvège (BN) ne sont pas utilisés en raison d'une réponse faible à l'AIA. Actuellement, les rats Lewis (LEW) représentent la souche la plus fréquemment utilisée pour l'induction de l'AIA car ils développent des signes arthritiques plus tôt, de manière plus sévère et plus systématiquement que les autres souches (20). Banik et al. (2002) ont montré des différences entre les souches utilisées dans l'AIA, et notamment une incidence faible de l'AIA de 38% chez les rats Sprague Dawley lorsqu'ils sont inoculés avec du *Mycobacterium Butyricum*, alors qu'elle était de 64% chez le Wistar et de 100% chez des rats Lewis. Chez le rat Sprague-Dawley, les rats mâles développent une arthrite nettement plus sévère que les femelles. Les études avec le rat Lewis utilisent quasi systématiquement des rats mâles, même s'il n'y a pas de données allant dans le sens d'une meilleure susceptibilité. Il semblerait que l'arthrite ne se développe pas si l'injection est effectuée chez les rats avant l'âge de 5 semaines.

b. Méthodologie

Classiquement, le modèle d'AIA consiste en une injection intradermique unique à la base de la queue, de *Mycobacterium tuberculosis* ou *butyricum* inactivé par la chaleur, en suspension dans l'adjuvant incomplet de Freund (huile minérale), la solution obtenue étant communément appelée adjuvant complet de Freund (CFA). Alternativement, une injection unique peut être réalisée dans la face plantaire d'une patte. Dans ce cas, l'arthrite de la patte injectée précède la polyarthrite d'au moins 2 jours.

c. Evolution clinique, radiologique et histologique

L'atteinte clinique et histologique dépend du mode d'injection (base de la queue ou patte). En cas d'injection dans la base de la queue, l'infiltration inflammatoire synoviale est la même que l'atteinte de la patte controlatérale lors de l'injection d'une patte. Dans les 2 cas, il y a apparition des signes cliniques d'arthrite 10 à 14 jours après l'injection de *Mycobacterium*. Les signes inflammatoires ne durent que rarement après un mois. La maladie est une polyarthrite migratrice affectant particulièrement les chevilles, poignets et les petites articulations inter phalangiennes distales (figure 6) (21)



Figure 6. Photographies représentant différentes atteintes et évolutions cliniques de l'arthrite induite à adjuvant : Atteinte isolée des doigts (A et E), atteinte faible (B), modérée (C) et intense (D) de la cheville et/ou du tarse.

La lésion élémentaire est une synovite puis l'inflammation devient périarticulaire, péri-tendineuse puis apparait une prolifération périostée, la formation d'un pannus avec destruction cartilagineuse, osseuse et finalement une ankylose articulaire. Contrairement au modèle d'arthrite à collagène, une atteinte rachidienne est possible bien que peu fréquente. Une des particularités du modèle est la présence de manifestations extra-articulaires, avec une atteinte inflammatoire ophtalmique (20%), cutanée et des muqueuses digestives et génito-urinaires. La plupart des animaux développent des nodules à la surface des oreilles, des pieds de la queue et du pénis. D'autres signes tels qu'une perte de poids, anorexie, hépatomégalie, diarrhée, hyperthermie sont également rencontrées. Ces lésions extra-articulaires apparaissent 3 à 4 jours après le début de l'arthrite et régressent à partir du 20^{ème} jour.

Sur le plan histologique, on observe une infiltration initiale par des lymphocytes et des histiocytes autour de petites veines, suivie par un œdème, un dépôt de fibrine et des foyers de nécrose, accompagnée par la prolifération de synoviocytes, de fibroblastes et l'activation des ostéoblastes et des ostéoclastes. (Figure 7)

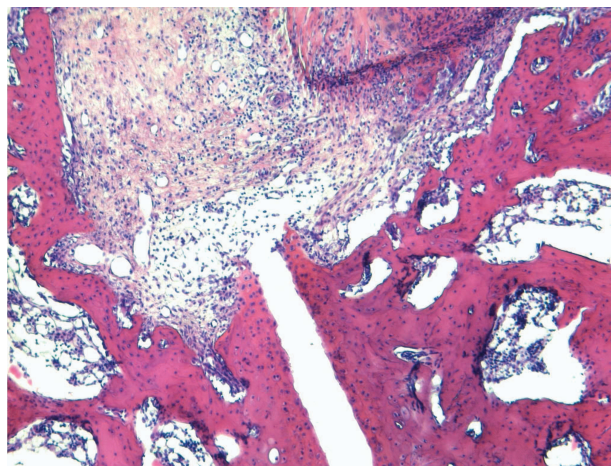


Figure 7. Aspect histopathologique de l'articulation talo-scaphoïdienne à J21 après le début des signes clinique d'arthrite. L'image représente une sévère destruction articulaire avec une prolifération synoviale importante. Les sections ont été colorées avec l'HES (hematoxyline érythroline saffron). Agrandissement x20.

d. Paramètres immuno-inflammatoires

L'induction de la maladie serait la conséquence de l'absorption des particules du bacille tué dans les vaisseaux lymphatiques drainant les sites d'injection. L'accumulation dans les nœuds lymphatiques des peptidoglycannes arthritogènes du bacille est nécessaire au développement de la maladie. L'AIA est une maladie dépendante des lymphocytes T et des polynucléaires et indépendante du complément. Il n'a pas été démontré de rôle des lymphocytes B et de l'immunité humorale contrairement à l'arthrite à collagène (22).

Dans ce modèle, l'immunité cellulaire est médiée par le TCR α/β des cellules T reconnaissant l'épitope 180-188 de l'Hsp65 mycobactérien (partie carboxy terminal de la protéine 65kd) présenté par le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II des CPA. Cet épitope serait le déterminant arthritogène prédominant pour la réponse des LT (22).

L'infiltrat inflammatoire dans les lésions articulaires de l'AIA contient des lymphocytes T activés qui inhibent la synthèse de protéoglycannes au sein du cartilage par le biais de facteurs diffusibles (23). Il y a libération locale d'enzymes protéolytiques et/ou des radicaux libres de l'oxygène (24). Le résultat est la rupture progressive du collagène de type II et IX, l'endommagement de la matrice, puis la dégradation de l'os (25). Les cytokines Th1 telles que l'IL-17, l'interféron-(IFN), et le TNF α sont exprimées en début de l'AIA tout comme l'IL-1 β (taux maximum environ au 10^{ème} jour) (26). Dans une phase ultérieure de la maladie, les niveaux d'IL-4, IL-6, et le TGF β plasmatiques sont élevés (aux alentours du 25^{ème} jour). Toutefois, l'augmentation de l'IL-6 articulaire a lieu plus précocement que l'augmentation des taux plasmatiques d'IL-1 β et TNF- α (27). Une interprétation possible à ces résultats est que l'IL-6 produite agit localement en tant que médiateur de la période initiale inflammatoire, qui se traduit ensuite en inflammation systémique exprimée par l'IL-1 β et le TNF- α .

e. Avantages/ inconvénients du modèle

Avantages

Le modèle développe des atteintes rhumatismales sévères avec un rendement supérieur à 90% des animaux injectés. L'atteinte extra-articulaire peut être considérée comme un avantage. Ce modèle s'est avéré intéressant pour tester différents traitements.

Inconvénients

Les principaux inconvénients de ce modèle sont le faible nombre de souches de rat sensibles, son inefficacité chez la souris et sa variabilité en termes d'incidence et de sévérité des signes arthritiques.

f. Lien avec la PR humaine

L'AIA est une maladie qui partage avec la PR, le gonflement articulaire, la dégradation du cartilage, la perte de la fonction articulaire et l'infiltration articulaire de lymphocytes. Des études récentes suggèrent un rôle de l'Hsp65 (Heat Shock Protein 65) dans la physiopathologie de l'arthrite juvénile idiopathique (28). Cependant, bien que l'AIA ait de grandes similitudes cliniques et histologiques avec la PR, l'atteinte périostée, l'ankylose articulaire, l'atteinte du rachis, et les manifestations extra-articulaires particulières en feraient un modèle plus ressemblant aux arthrites réactionnelles ou aux spondylarthropathies. Une autre différence avec la PR est l'absence dans l'AIA de facteur rhumatoïde dans le sang et dans le liquide synovial. Une analyse d'homologie chromosomique parmi des rats, souris et humains suggère des similitudes génétiques entre le modèle d'AIA et plusieurs pathologies inflammatoires et auto-immunes, incluant le diabète, l'uvéite, la thyroïdite, le lupus, la maladie de Crohn et la polyarthrite rhumatoïde.

I22. Arthrite à collagène (Collagen-induced arthritis, CIA)

Ce modèle est considéré comme l'un des meilleurs modèles expérimentaux d'étude de la PR car étant celui ressemblant le plus au rhumatisme inflammatoire. Il est produit par immunisation de souches murines avec du collagène de type II hétérologue. Contrairement à d'autres modèles il ne requiert pas de protéines étrangères ou des bactéries mais des protéines de cartilage sain.

a. Souches murines utilisées

La CIA a d'abord été développée en utilisant les souches de rat Wistar, Sprague-Dawley et Lewis par l'immunisation avec du collagène de type II. Cependant le modèle présente l'intérêt d'être également réalisable chez la souris (souches DBA/1 et B10.RIII) et les primates non humains (29).

b. Méthodologie

La CIA est induite chez les souches sensibles de rats par immunisation avec du collagène natif de type II hétérologue (non murin) ou homologue (moins fréquent) émulsionné dans l'adjuvant de Freund incomplet, après injection sous-cutanée à la base de la queue (à 2-3 cm du corps). L'injection initiale peut être suivie par une deuxième injection 7 jours plus tard. L'injection intradermique sur la peau du dos est également efficace. L'injection de collagène de type II homologue peut aussi être efficace mais chez certaines souches particulières (notamment DBA/1). Le rat DA (Dark Agouti) femelle semble être plus susceptible que les mâles. Chez les rats, le développement de l'arthrite apparaît chez plus de 90% des animaux injectés (30).

c. Evolution clinique et radiologique

Le début de l'arthrite apparaît entre 10 et 16 jours après l'immunisation et atteint en premier les pattes arrière. Dans les formes sévères on observe la destruction des articulations atteintes. Le pic inflammatoire clinique survient au 20^{ème} jour post immunisation, puis les signes décroissent progressivement.

La membrane synoviale normalement hypocellulaire devient infiltrée par des cellules immunitaires (les lymphocytes T, lymphocytes B, macrophages et des neutrophiles). Ceci conduit à la formation d'un pannus, une membrane hyperplasique de synoviocytes qui présente un caractère invasif des tissus osseux et cartilagineux, avec apparition rapide d'érosion cartilagineuse et osseuse. Ces conséquences sont le résultat d'une production d'enzymes dégradant la matrice cartilagineuse, tandis que la formation des ostéoclastes induit une érosion osseuse. Le liquide synovial, qui contient normalement peu de cellules, devient très infiltré, principalement avec des neutrophiles. Ces changements entraînent un fonctionnement réduit de l'articulation accompagné d'une douleur et une raideur. Les signes extra-articulaires sont peu fréquents et prédominent sur la sphère ORL (polychondrite, dysfonction vestibulaire) (22).

d. Paramètres immuno-inflammatoires

Comme pour l'AIA, la maladie est liée aux lymphocytes T. Ainsi les animaux thymectomisés sont résistants à l'immunisation. Les Lymphocytes T CD4⁺ sont nécessaires pour obtenir une atteinte complète. La maladie n'apparaît pas chez des souris traitées par des anticorps monoclonaux anti CD4 ou chez des animaux avec une délétion de TCR (T Cell Receptor). Il a été démontré une implication des voies de Th1 (IL12) et Th2 (IL4) dans la pathogénie de la CIA. Les CD8⁺ ne semblent pas impliqués. Les dommages tissulaires impliquent l'IL1 et le TNF α .

Contrairement à l'AIA, l'immunité humorale est essentielle puisqu'une déficience en lymphocytes B chez les souris empêche le développement de la maladie. La présence d'anticorps anti-Collagène de type II et d'une hypersensibilité retardée est également caractéristique de ce modèle. Les anticorps anti-collagène de type II sont directement pathologiques et reproduisent les manifestations inflammatoires articulaires en cas d'injection à des animaux naïfs. (30)

e. Avantages/ inconvénients

Avantages

La CIA induit une polyarthrite proche cliniquement de la PR sévère, avec peu d'atteinte extra-articulaire. Les mécanismes physiopathologiques sont également proches de la PR en faisant intervenir l'immunité cellulaire et humorale. Le rendement après immunisation est proche de 90%. La possibilité d'étudier cette forme de polyarthrite chez le rat comme chez la souris et l'absence d'utilisation d'épitope bactérien pour l'immunisation sont également intéressants.

Inconvénients

Le principal inconvénient est la variabilité de l'atteinte articulaire et l'évolution en une poussée unique avec disparition en quelques semaines des signes inflammatoires ne laissant que les articulations détruites.

f. Lien avec la PR humaine

L'arthrite à collagène possède de nombreuses similitudes avec la polyarthrite humaine. Comme chez l'humain, les sujets de sexe féminin sont plus susceptibles au développement du rhumatisme inflammatoire (31) et il est retrouvé dans le modèle la présence d'auto-anticorps. Contrairement à la PR, l'arthrite à collagène est spontanément résolutive et n'évolue pas par poussées avec des périodes de rémission.

I23. Autres modèles murins

D'autres modèles murins ont été développés, pour lesquels les données bibliographiques sont beaucoup moins abondantes. Voici une liste non exhaustive de modèles d'arthrites expérimentaux :

a. Cartilage oligomérique matrix protéin induced arthritis (COMP)

L'immunisation avec deux COMP chez le rat induit une arthrite sévère chez les souches de rats sensibles, tels que le rat DA (Dark Agouti) et Lewis. Les rats sont injectés par voie intradermique à la base de la queue.

b. Avridine-induced arthritis

L'arthrite est induite chez les rats par une injection sous-cutanée à la base de la queue de l'avridine N, N-dioctadécyl-N', N'-bis-(2-hydroxyéthyl) propanediamine, solubilisé dans l'adjuvant incomplet de Freund.

c. Pristane-induced arthritis (PIA)

L'arthrite est induite chez le rat sensible (DA et Lewis) par une injection intradermique à la base de la queue avec 2,6,10,14-tétraméthylpentadécane (pristane), un autre adjuvant immunologique synthétique.

d. Oil-induced arthritis (OIA)

Il consiste en une injection intradermique de l'adjuvant incomplet de Freund, dans la cheville. L'adjuvant seul peut induire une arthrite périphérique chez le rat DA.

e. Streptococcal cell wall arthritis

Il est réalisé par une seule injection intrapéritonéale d'une suspension aqueuse de fragments des parois cellulaires (peptidoglycane-polysaccharide) de streptocoques du groupe A et de plusieurs autres types de bactéries dans des souches de rats sensibles (Lewis) ou le lapin.

f. Proteoglycan-induced arthritis (mice)

Ce modèle nécessite trois injections intrapéritonéales de protéoglycane (du sulfate de chondroïtine appauvri) à des souches génétiquement sensibles de souris, telles que BALB/c (souris albinos).

g. Souches génétiquement modifiées

Les souris transgéniques ont également été utilisées comme modèles pour évaluer le rôle potentiel des facteurs environnementaux dans l'étiologie de la PR. Ainsi la preuve du rôle essentiel du TNF- α a été démontrée par le développement spontané de l'arthrite chez les souris surexprimant le TNF- α . Dans un principe similaire, les souris transgéniques IL-1ra^{-/-} sont des souris déficientes en récepteur antagoniste de l'IL-1 β qui développent spontanément une polyarthrite.

Réalisé chez la souris (K/BxN TCR transgenic mice), le modèle **G6PI** est un modèle relativement nouveau d'arthrite auto-immune qui utilise une procédure d'immunisation similaire à celle utilisée pour la CIA, mais en s'appuyant sur un auto-antigène soluble, l'enzyme ubiquitaire glycolytique du glucose-6-phosphate isomérase (G6PI) au lieu de Collagène de type II.

Le Tableau 5 récapitule les principales caractéristiques des modèles d'arthrite AIA et CIA et les compare avec les caractéristiques de la PR humaine.

Tableau 5. Comparaison des caractéristiques des modèles d'arthrite expérimentale AIA et CIA et de la PR. IFA = Incomplete Freund's Adjuvant.

	AIA	CIA	PR
Espèce	rat	Rat, souris, singe	humain
Susceptibilité du genre	Masculin et féminin	féminin	féminin
Polyarthrite périphérique avec érosion articulaire	+	+	+
Ankylose rachidienne	+	-	- (excepté l'atteinte C1-C2)
Réaction périostée	+	-	-
Présence d'auto-anticorps	-	+	+
Arthritogène	Mycobacterium	Collagène de type II	?
Atteinte extra articulaire	+++	+	++
Implication des lymphocytes T	+	+	+
Implication des lymphocytes B	-	+	+
Période de rémission	-	-	+
Type	induit	induit	
Mode d'induction	intradermique	Intradermique	
Adjuvant	IFA	IFA	
Délai apparition des signes articulaires	10-14 jours	10-16 jours	
Durée de la phase inflammatoire clinique	1 mois	1 à 2 mois	

I3. Le risque cardiovasculaire dans la polyarthrite rhumatoïde

I31. PR et risque cardiovasculaire

a. Prévalence

La PR est une maladie auto-immune entraînant une inflammation chronique qui peut progressivement conduire à la destruction, la déformation articulaire, l'incapacité et même le décès. En dépit de son atteinte ostéo-articulaire prédominante et les manifestations périarticulaires, la PR est une maladie systémique souvent associée à des manifestations extra-articulaires, en particulier cardiovasculaires.

Pendant longtemps, la PR a été considérée comme une maladie de bon pronostic, ne mettant pas en jeu la vie des patients mais déterminant un certain handicap. On sait aujourd'hui que la PR entraîne globalement une diminution de la durée de vie, en moyenne de 5 à 10 ans par rapport à la population générale appariée par l'âge et le sexe. La mortalité à 5 ans est d'environ 40% chez les patients ayant une PR « séropositive » (avec la présence de FR) avec manifestations extra-articulaires (sauf nodules), contre 12% dans un groupe de PR « séronégatives ». L'hétérogénéité clinique de la PR se retrouve aussi en ce qui concerne la mortalité, car le risque vital s'observe essentiellement dans les formes sévères. Les causes de mortalité sont difficiles à évaluer car la PR est rarement mentionnée sur le certificat de décès. Les maladies cardiovasculaires sont responsables de 40% des décès, ce qui est comparable en proportion dans la PR et la population générale mais, étant donné que le nombre de décès est deux fois plus élevé dans la PR, cela explique une part importante de la surmortalité. D'autres causes de mortalité doivent être connues : les infections sont responsables de 9 à 20% des décès (contre 1% dans la population générale), les décès par leucémies et lymphomes sont également plus fréquents. Dans un peu moins de 2%, le décès peut être directement imputé à la PR. Les principales causes sont la vascularite rhumatoïde, l'atteinte pulmonaire rhumatoïde, certaines complications cardiaques ou cervicales (32).

Il est donc bien établi que ce sont les manifestations cardiovasculaires qui sont responsables d'une surmortalité dans cette pathologie, en particulier les maladies cardiaques coronariennes (33). Une méta-analyse récente évalue l'incidence des épisodes fatals liés aux AVC et aux infarctus du myocarde (34). L'incidence d'infarctus du myocarde fatals était de 13,3 pour 1000 patients-années atteints de PR et l'incidence des AVC mortels était de 4,5 pour 1000 patients-années. De plus les lésions cardiovasculaires sont rencontrées de manière plus précoce. Le risque relatif d'accidents mortels liés aux infarctus du myocarde était environ 1,63

par rapport à la population générale, alors qu'aucun excès de risque n'a été observé pour les AVC fatals.

De manière générale (35) les patients atteints de PR ont 2 fois plus de risque de décéder d'une cause cardiovasculaire que la population générale. Le risque est augmenté de 60% si l'on considère les décès par ischémie myocardique. Le taux standardisé de mortalité (rapport entre le nombre de décès observés dans la population de PR et le nombre de décès attendus par référence à la population générale) en rapport avec la pathologie cardiovasculaire est de 1,7 en moyenne et varie entre 1,16 et 3 toutes étiologies confondues (36).

b. Complications cardiaques de la PR

Outre la cardiopathie ischémique, toutes les structures cardiaques peuvent être atteintes pouvant entraîner une péricardite, myocardite, maladie valvulaire et arythmie (37). Ces atteintes sont associées à un pronostic défavorable. Leur détection précoce à un stade asymptomatique est essentielle.

La complication la plus fréquente est la péricardite, alors que la myocardite symptomatique, l'endocardite, l'artérite coronarienne et l'aortite restent rares. Les deux dernières atteintes, qui sont le plus souvent associées à une vascularite rhumatoïde, sont presque exclusivement démontrées par autopsie. En outre, étant donné que ces patients ont généralement une athérosclérose accélérée, il est difficile de déterminer si les lésions vasculaires sont en réalité causées par une vascularite ou par l'athérosclérose (38). La péricardite symptomatique est observée chez environ 1% à 4% des patients, même si des anomalies histopathologiques sont mises en évidence dans 30% à 50% des cas par l'échocardiographie et l'autopsie (39). Les péricardites symptomatiques surviennent fréquemment chez les patients « séropositifs » masculins, généralement au début de l'évolution du rhumatisme.

La majorité des complications cardiaques dans la PR sont silencieuses et ne nécessitent pas de traitement. Dans la maladie péricardique symptomatique non compliquée, les AINS et les GC peuvent être utilisés (40). Dans les formes plus graves, un traitement immunosuppresseur de type cyclophosphamide peut être nécessaire. Les formes constrictives et rapidement progressives, nécessitent une intervention d'urgence et peuvent aggraver le pronostic des patients (41).

c. Facteurs de risque cardio-vasculaires et PR

Les résultats d'une méta-analyse (35) notent que certains facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels tels que le tabagisme, le diabète ou le taux bas d'HDL cholestérol, sont plus fréquents chez les patients atteints de PR, que dans la population générale, tandis que d'autres tels que l'hypertension artérielle (HTA) ou l'hypercholestérolémie, semblent être les mêmes que pour les contrôles. Les résultats concernant l'HTA varient selon les études. Ceci pourrait contribuer à accroître le risque de morbidité et mortalité cardiovasculaire chez les patients atteints de PR.

De façon récente les rhumatologues se sont intéressés à l'association PR et syndrome métabolique, dont le facteur principal de développement serait une insulino-résistance. Le syndrome métabolique est associé à une augmentation de 50 % du risque cardiovasculaire de manière globale (42). En se basant sur la définition de l'OMS la fréquence du syndrome métabolique serait de 42 % dans un groupe de PR ancienne, 30% chez des PR récente et 11% dans la population générale. Dans cette étude, les auteurs ont également comparé un score de calcification coronarienne, qui était plus élevé dans le groupe PR avec syndrome métabolique comparé au groupe PR sans syndrome métabolique.

d. La PR, un facteur de risque CV indépendant ?

Plusieurs études récentes ont montré que l'excès de risque de maladie cardiovasculaire associé à la PR est égal à celui du diabète de type II (43). Cet excès de risque cardiovasculaire en comparaison avec la population générale ne semble pas s'expliquer uniquement par l'augmentation de fréquence de certains facteurs de risque cardiovasculaires classiques. En effet dans l'étude de Peters (44), le calcul du score de Framingham qui évalue le risque à 10 ans de faire un événement cardiovasculaire, était seulement de 7% chez des patients PR avec une plaque athéromateuse carotidienne ce qui est discordant des résultats avec d'autres pathologies. Par conséquent le calcul du score de Framingham sous-estime le risque cardiovasculaire dans la PR suggérant que les cibles ne doivent pas être seulement les facteurs de risque traditionnels mais également les facteurs non traditionnels. Peters et coll ont également montré que chez les PR, les facteurs non traditionnels (degré d'inflammation, insulino-résistance) prédisent de manière identique aux facteurs de risque traditionnels l'apparition de plaque athéromateuse carotidienne dans la PR.

Pieringer et coll (45), utilise l'« augmentation index (AIX) » qui reflèterait la dysfonction vasculaire. Il compare cet index dans un groupe de PR sans facteur de risque cardiovasculaire traditionnels à un groupe de contrôles sains. L'AIX est augmenté dans le groupe PR ce qui confirme l'importance de facteurs propres à la PR dans l'apparition des anomalies vasculaires, différents des facteurs de risque traditionnels.

Par conséquent, la PR devrait être considérée comme un facteur de risque majeur cardiovasculaire indépendant pour lequel la gestion des risques cardiovasculaires, comme dans le diabète de type II, doit être considéré de façon spécifique à cette pathologie.

e. Evaluation clinique du risque cardiovasculaire

Ces données de morbi-mortalité cardiovasculaire dans la PR nous incite à traquer les facteurs de risque traditionnels et nous conforte dans la lutte précoce contre l'inflammation qui apparaît comme des facteurs de risque non traditionnel.

Une combinaison de facteurs de risque a été décrite pour tenir compte de l'accélération de l'athérosclérose et de l'augmentation du risque cardiovasculaire dans la PR, mais comme nous l'avons précédemment indiqué, les facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels (aussi appelés les facteurs de risque de Framingham) semblent être moins prédictifs de l'athérosclérose coronaire chez les patients atteints de PR que dans la population générale (46). En pratique et selon les recommandations de l'EULAR 2010 (tableau 6) (47), si le score de Framingham est appliqué, un facteur 1.5 doit être appliqué en cas de présence de 2 des 3 critères suivants: durée de la maladie de plus de 10 ans, FR ou ACPA présents, présence de manifestations extra-articulaires. L'EULAR recommande d'utiliser le modèle SCORE pour évaluer le risque d'évènement cardiovasculaire. (Annexe 1)

Tableau 6. Recommandations EULAR 2010, pour la prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaire chez les patients atteints de PR.

1	La PR doit être considérée comme un facteur de risque CV à part entière. Cela s'applique aussi au RP et à la SA même si les preuves sont plus limitées. Cette augmentation de risque est liée à la fois à l'augmentation des autres facteurs de risque CV et à l'inflammation
2	Un meilleur contrôle de l'activité est nécessaire pour un plus faible risque CV (les meilleures preuves en ce qui concerne les traitements sont avec le MTX et les anti-TNF)
3	Le contrôle du risque CV doit être fait en utilisant les recommandations nationales pour tous les patients avec une fréquence annuelle et doit être aussi envisagé pour le RP et la SA. L'évaluation du risque doit être reconduite à chaque changement de traitement. En l'absence de recommandation nationale le modèle SCORE (=systematic coronary risk evaluation) est conseillé
4	A partir des scores utilisés pour le calcul du risque CV un facteur 1.5 doit être appliqué en cas de présence de 2 des 3 critères suivants: durée maladie plus de 10 ans, FR ou anti-CCP présent présence de manifestations extra-articulaires.
5	Le rapport cholestérol total/HDL cholestérol doit être utilisé quand le modèle SCORE est utilisé.
6	Le traitement hypocholestérolémiant et antihypertenseur doit être prescrit selon les recommandations nationales.
7	Les statines, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et/ou les antagonistes de l'angiotensine II doivent être utilisés préférentiellement en raison de leurs effets pleiotropiques.
8	Le rôle des coxibs et des AINS n'est pas établi et des études complémentaires sont nécessaires. Dans l'attente ils doivent être utilisés avec précaution
9	Les corticoïdes sont à utiliser avec la plus petite dose possible
10	Arrêt du tabac

Cv: cardio-vasculaire; TNF: Tumor Necrosis Factor; RP: Rhumatisme Psoriasique; SA: Spondylarthrite ankylosante; MTX: Methotrexate; SCORE: Systematic Coronary Risk Evaluation; FR : Facteur Rhumatoïde; CCP : citric citrullinated peptid; HDL: high density lipoprotein; AINS: anti-inflammatoire non stéroïdien.

Par conséquent, des facteurs pronostiques supplémentaires pour la stratification du risque CV doivent être identifiés dans la PR, qui pourraient être des biomarqueurs de l'inflammation (48), des autoanticorps (49), ou des marqueurs de dysfonction endothéliale biologiques, fonctionnels ou structuraux.

Divers biomarqueurs sont des candidats prometteurs comme, l'anticorps Anti-apolipoprotéine A-I. La présence de niveaux élevés d'anticorps anti-Apo AI est associée à la présence de plaques d'athérosclérose vulnérables chez l'homme et chez la souris (50). Dans une étude transversale, les niveaux du N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) étaient plus élevés dans la polyarthrite rhumatoïde que chez les patients contrôles et étaient associés à diverses maladies cardiaques (51). Le LDL-ox est associé aux atteintes cardiovasculaires dans la population générale et est associé de manière indépendante à l'athérosclérose sub-clinique et l'activité de la maladie chez les patients atteints de PR (44). Les FR et les ACPA ont été associés à un risque 2 à 3 fois plus élevé de développer une maladie cardiaque ischémique (49). D'autres biomarqueurs pronostiques ont été proposés chez ces patients, tels que les niveaux de triglycérides et des HDL, les niveaux d'homocystéine, ou les biomarqueurs de dysfonction endothéliale (cités pages 65). Concernant plus particulièrement les plaques carotidiennes, la durée de la maladie rhumatismale est le meilleur marqueur prédictif de l'apparition de ces plaques. L'épaisseur intima-media de la carotide a une grande valeur prédictive pour le développement de maladies cardiovasculaires dans les 5 ans (52).

Si les données concernant la détection des facteurs prédictifs d'événement cardiovasculaire se développent, les moyens préventifs ou curatifs sont encore en discussion, surtout concernant les traitements non rhumatologiques. En pratique est-ce au rhumatologue d'instaurer des statines ou un anti-aggrégant plaquettaire ? Les patients atteints de PR doivent-ils tous bénéficier de consultation auprès des cardiologues ? Quels traitements à visée cardiovasculaire sont à privilégier chez les patients PR ? Ces questions ne sont pas encore résolues.

f. Effets cardiovasculaires des traitements utilisés dans la polyarthrite rhumatoïde

Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS comme les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) sont couramment utilisés dans le traitement de la PR. L'étude VIGOR destinée à évaluer la tolérance gastro intestinale du rofecoxib, avait mis en évidence un risque relatif (RR) de 2,38 de développer un infarctus du myocarde sous rofecoxib comparé au naproxène en prise chronique (53), ce qui avait entraîné le laboratoire à le retirer du marché. Dans l'étude CLASS (54), Il n'a pas été montré de différence dans l'apparition d'événement cardiovasculaire dans la prise au long court du celecoxib comparé à l'ibuprofène et au diclofenac. Mais dans une étude contre placebo, le RR d'événement cardiovasculaire avec le celecoxib était de 2,6 à 3,4 selon la posologie, résultats confirmés dans d'autres études chez des patients non PR. Concernant la population PR, le programme MEDAL (55) fut mené pour estimer le risque d'événements thrombotiques cardiovasculaire avec l'etoricoxib comparé au diclofenac en poolant des données de 3 essais comprenant des patients PR et arthrosiques. Chez les PR, il ne fut pas mis en évidence de différence entre etoricoxib et diclofenac. Une autre étude note toutefois une tendance d'augmentation d'événement cardiovasculaire sous etoricoxib comparé au naproxène (56). Concernant les AINS non sélectifs, deux revues systématiques de la littérature et méta-analyses récentes ont comparé les risques d'événements cardiovasculaires entre les AINS non sélectifs et les coxibs. La première (57) ne note pas d'augmentation de risque avec le celecoxib aux doses habituelles, par contre émet des doutes sur la tolérance du diclofenac. La seconde étude (58) par contre retrouve ce risque modéré d'augmentation de risque avec les coxibs, l'ibuprofène et le diclofenac, mais pas avec le naproxène.

Au final, il apparaît dans la PR que tous les AINS, sélectifs ou non, pourraient augmenter le risque d'événement cardiovasculaire, à l'exception du naproxène, surtout dans des utilisations au long cours et chez les patients présentant des anomalies cardiaques préexistantes.

Glucocorticoïdes (GC)

Les GC sont connus pour avoir des effets indésirables cardio-vasculaires. Cette hypothèse est étayée par la hausse de la mortalité chez les patients atteints du syndrome de Cushing. En outre, il existe des données d'observation qui appuient cette hypothèse. Dans une vaste étude, 68 781 patients sous GC ont été comparés avec 82 202 contrôles. Dans le groupe

des utilisateurs le risque d'insuffisance cardiaque, d'infarctus du myocarde, d'AVC et de mortalité toutes causes confondues étaient multiplié par 3,72 ; 3,25 ; 1,73 et 7,41 respectivement (59). Dans la population PR, la prise de GC est associée à la présence de plaques carotidiennes et à la rigidité artérielle, indépendamment des facteurs de risque cardiovasculaires et des manifestations cliniques de la PR (60). Dans une étude rétrospective incluant 603 patients atteints de PR, il a été constaté que l'utilisation de GC était associée à un risque cardiovasculaire accru chez les patients qui étaient FR positifs, mais pas chez les patients « séronégatifs » (61). L'utilisation de GC chez les patients atteints de PR est associée à une incidence élevée d'HTA. Il est difficile de distinguer qui des GC ou du rhumatisme lui-même, est le principal facteur de l'augmentation de la mortalité. En général, une dose supérieure ou égale à 7,5 mg d'équivalent prednisonne/ jour est être associée à un risque cardiovasculaire accru. Cependant, il est difficile d'estimer l'impact réel des GC sur le risque cardiovasculaire chez les patients atteints de PR, car les GC peuvent réduire l'activité inflammatoire chronique, qui semble être une cause d'athérosclérose prématurée dans la PR et pourrait donc aussi avoir des effets favorables sur le système cardio-vasculaire (62-64). De manière intéressante, il a été montré un effet protecteur du traitement par GC chez des patients PR ayant déjà des antécédents cardiovasculaire (63). Concernant les doses faibles de GC en cas de PR, une récente analyse systématique de la littérature (65) a rapporté un effet protecteur sur le profil lipidique, l'augmentation de l'insulino-résistance et de la glycémie, mais aucun effet sur la pression artérielle ni sur l'athérosclérose. Les données sont controversées concernant l'effet des faibles doses de GC sur la rigidité artérielle. Une association entre des doses faibles de GC et les événements cardiovasculaires majeurs a été retrouvée dans 4 des 6 études. Cela comprenait les infarctus du myocarde (Hazard Ratio (HR) = 1,7 [1,2-2,3]), les AVC (Odds Ratio (OR) = 4,36 [1,60 à 11,90]), la mortalité (HR = 2,03 [1,25 à 3,32]) et un indice composite d'événements cardiovasculaires (dans le groupe FR positif, HR = 2,21 [1,22 à 4.00]).

Ces résultats discordants dépendent probablement de la dose de GC quotidienne, de la durée de traitement et de la population traitée. La règle actuelle chez le rhumatologue est d'utiliser les GC à la plus petite dose efficace, pour diminuer ces éventuels effets cardiovasculaire mais aussi les autres effets indésirables liés à l'utilisation prolongée des GC.

DMARDs non biologiques

- Méthotrexate

La sécurité au long cours du méthotrexate dans la PR a été largement évaluée dans les études observationnelles. Une importante étude de cohorte américaine, dans laquelle 1240 patients atteints de PR ont été suivis pendant une moyenne de 6 ans, a démontré une réduction de 60% du risque de mortalité toutes causes confondues et d'une réduction de 70% du risque de mortalité cardiovasculaire chez les patients traités avec le méthotrexate (66). Une autre étude de cohorte ayant suivi 923 patients atteints de PR pendant une période de 10,7 ans a signalé une tendance vers une diminution du risque de mortalité cardiovasculaire chez les patients traités avec le méthotrexate (HR = 0,53, IC à 95% 0,25 à 1,14) (67). En revanche, une analyse rétrospective de 623 patients atteints de PR et de maladies cardiovasculaires a constaté que ceux dont le traitement initial fut le méthotrexate présentaient un risque accru de décès comparativement aux patients traités par des traitements non biologiques autres que le méthotrexate (68). Néanmoins, une revue systématique de la littérature concernant l'effet du méthotrexate sur les maladies cardiovasculaires chez les patients atteints de PR a conclu que, dans l'ensemble, l'utilisation du méthotrexate est associée à une diminution du risque cardiovasculaire (69). Plusieurs études ont en outre examiné l'association entre le traitement par méthotrexate et la morbidité cardiovasculaire chez les personnes atteintes de PR. Une étude cas-contrôle de maladies cardiovasculaires chez les patients atteints de PR a comparé 72 patients atteints de maladies cardiovasculaires avec 541 patients sans maladie cardiovasculaire. Dans cette étude, la maladie cardiovasculaire a été définie comme un antécédent de maladie artérielle coronarienne, cérébro-vasculaire ou périphérique et la prise de méthotrexate, en monothérapie ou en combinaison, a été associée à une réduction de la maladie cardiovasculaire (70). Une étude internationale transversale a constaté que la durée d'utilisation du méthotrexate était associée à une prévalence plus faible d'infarctus du myocarde et d'AVC (71). De même, une grande étude cas-témoins menée au Canada a rapporté que le méthotrexate est associé à une réduction de l'infarctus du myocarde (RR = 0,81, IC à 95% de 0.60 à 1.08) (72). Par ailleurs, une étude de cohorte de 16752 patients atteints de PR à partir d'une base de données administratives a montré que le méthotrexate a réduit le risque d'un indice composite de manifestations cardiovasculaires (RR ajusté = 0,65, IC à 95% 0.59 à 0.72) (73). Un large registre américain n'a trouvé aucune réduction des événements cardiovasculaires associés au méthotrexate en comparaison avec d'autres DMARDs (74). Différents mécanismes pourraient expliquer un effet cardioprotecteur du

méthotrexate chez des patients atteints de PR : une action directe sur les lésions d'athérosclérose ou un effet cardioprotecteur par la suppression de l'inflammation systémique chronique. Les résultats d'études *in vitro* suggèrent que le méthotrexate peut faciliter la sortie du cholestérol cellulaire de la paroi de l'artère, sans doute par une voie impliquant l'adénosine (75).

L'ensemble des données montrerait une tendance protectrice cardiovasculaire du méthotrexate dans la population PR contrairement aux PR non traitées par méthotrexate. Les résultats le comparant aux autres DMARDs non biologiques sont contradictoires. Les mécanismes impliqués sont encore mal connus.

- Autres traitements de fond non biologiques.

Il existe un manque de données sur l'impact des traitements de fond autres que le méthotrexate sur le risque cardiovasculaire dans la PR. L'azathioprine, la ciclosporine qui ne sont pratiquement plus utilisées en pratique quotidienne dans la PR, sont associés à une augmentation d'événements cardiovasculaires (76). La ciclosporine peut causer une HTA, ce qui peut expliquer en partie ce constat. Le leflunomide qui peut également causer une HTA, peut aussi selon les études, diminuer le risque d'infarctus du myocarde par rapport à la population générale (72) ou l'augmenter en comparaison avec le méthotrexate (76). La salazopyrine et les antimalariques diminueraient le taux d'infarctus du myocarde. Les DMARDs pourraient intervenir en améliorant le profil lipidique (77) en plus de leur effet anti-inflammatoire et immunomodulateur.

Les biothérapies

- Antagoniste des récepteurs aux interleukines

L'anakinra est un antagoniste du récepteur IL-1. Bien qu'il ait l'AMM, l'anakinra n'a pas été largement prescrit par les rhumatologues dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. En conséquence, les données des registres sont rares, et aucune des études publiées n'a comparé les taux d'observation d'infarctus du myocarde, d'AVC ou d'insuffisance cardiaque chez les patients traités avec l'anakinra. Dans une étude contrôlée dirigée par le laboratoire sur une période de six mois, 1414 patients atteints de PR active ont été randomisés pour recevoir soit l'anakinra (100 mg en injection sous-cutanée par jour) soit un placebo (78). Parmi les résultats de tolérance, on ne note aucune différence significative sur les événements cardiovasculaires.

Le Tocilizumab est un anticorps monoclonal humanisé qui bloque l'action des récepteurs de l'interleukine 6. Plusieurs études ont montré que le tocilizumab induisait des anomalies des lipides sériques : augmentation du cholestérol total, LDL-cholestérol et des triglycérides, en monothérapie ou en association avec un DMARD (79-80). Une augmentation simultanée du HDL-cholestérol semble accompagner ces changements, résultant en un index athérogène relativement stable. Des données de sécurité provenant de six essais cliniques japonais et des études d'extension à long terme du tocilizumab en monothérapie ont montré que les anomalies des LDL étaient courantes au cours de la première année de traitement et restaient stables au-delà (80). Une étude sur 20 semaines, chez des patients atteints de PR qui visait à évaluer l'effet lipidique du tocilizumab sur la progression de l'athérosclérose, a montré que l'augmentation des LDL plasmatiques et du HDL n'a pas été accompagnée par une augmentation du risque athérogène (81). Toutefois, la courte durée et le nombre restreint de patients sont d'importantes limites à cette étude. Les données sur la tolérance à long terme réunissant plusieurs extensions d'études en ouvert ont montré que les taux d'effets indésirables cardio-vasculaires, tels que l'infarctus du myocarde et l'AVC, restent stables sur 5 ans de traitement, et correspondent à la fréquence attendue d'événements cardiovasculaires pour la population PR (82).

- Biothérapies à visée cellulaire

Peu de données sont disponibles concernant les profils d'innocuité cardiovasculaire des biothérapies dont les cibles sont les cellules T et les cellules B chez les patients atteints de PR.

Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre la molécule de surface CD20. Un impact bénéfique de ce traitement sur le profil lipidique sérique a été démontré (83). Une étude sur 33 patients PR n'a pas permis de mettre en évidence un effet bénéfique cardiovasculaire (rigidité artérielle et augmentation index) après 2 cycles de rituximab soit un an de traitement (84). Le rituximab pourrait indirectement induire un effet proathérogène, en provoquant une réduction du taux circulant des anticorps IgM, comme observé dans plus de 20% des patients atteints de PR traités avec des cycles répétés (85). Les données des modèles animaux suggèrent que la carence en IgM accélérerait grandement l'athérosclérose chez les souris (86). Ainsi, des taux d'IgM anormaux pourraient contribuer à la progression de l'athérosclérose chez les patients atteints de PR. En ce qui concerne les données sur les effets sévères cardio-vasculaires, des études d'extension en ouvert avec le

rituximab n'ont pas démontré des taux d'événements cardiovasculaires différents de ceux attendus chez les patients atteints de PR (87).

- Les anti-TNF α

Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire puissante impliquée dans la pathogenèse de la PR, mais aussi de l'athérosclérose. En fait, le TNF α est impliqué dans toutes les étapes de l'athérosclérose, de la formation de la plaque à la rupture de plaque. La hausse du TNF α pourrait également promouvoir d'autres facteurs de risque cardiovasculaires, tels que la dyslipidémie et l'insulinorésistance (88). Les nombreuses données disponibles sont issues essentiellement d'études sur les premiers agents anti-TNF α : l'infliximab, l'adalimumab et l'éta nercept.

Une étude basée sur le registre de PR nord américain CORRONA compare les taux d'infarctus du myocarde, d'AVC et de décès imputés aux maladies cardiovasculaires dans trois groupes de traitement comprenant des patients traités par anti-TNF α , par méthotrexate et par des DMARDs non biologiques non méthotrexate. Les résultats démontrent une réduction du risque d'événements cardiovasculaire chez les patients traités par anti-TNF α , comparé aux groupes de PR traités ni par anti-TNF α , ni par méthotrexate, alors qu'il n'est pas mis en évidence de différence entre les groupes méthotrexate et le groupe traité ni par anti-TNF α , ni par méthotrexate (74).

Deux revues systématiques ont évalué l'association entre le traitement par anti-TNF α et les événements cardiovasculaire dans la PR (89-90). La première a montré que les anti-TNF sont associés à un risque réduit pour tous les événements cardiovasculaires (RR ajusté 0,46), ainsi qu'à une réduction du risque d'infarctus du myocarde (RR = 0,81) et d'AVC (RR = 0,69). Cependant, la deuxième étude recensant trois études contrôlées avec des durées minimales de traitement de 26 semaines n'a pas montré de réduction statistiquement significative du risque d'événements cardiovasculaires (RR de 0,85, IC à 95% de 0,28 à 2,59) avec un traitement anti-TNF α par rapport aux DMARDs. Dans une analyse de la British Society for Rheumatology Biologics Register, aucune réduction du taux d'infarctus du myocarde n'a été trouvée dans la cohorte des anti-TNF α par rapport à la cohorte DMARDs (91). Globalement, les études notent une diminution du risque d'événements ischémiques sous anti-TNF α , tels que résumé dans la revue de littérature de Westlake et coll. (90).

En ce qui concerne le risque d'insuffisance cardiaque congestive sous anti-TNF α , la controverse demeure. L'hypothèse de départ était que les anti-TNF α pouvaient réduire le risque d'insuffisance cardiaque congestive étant donné la présence de taux élevés de TNF α chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque congestive (92). Mais, non seulement, les anti-TNF α n'entraînent aucun bénéfice, mais chez des patients sans antécédents cardiovasculaire, l'anti-TNF α pourrait engendrer un risque accru d'insuffisance cardiaque congestive à haute dose (10 mg / kg d'infliximab) (93).

Les mécanismes par lesquels les agents anti-TNF α pourraient réduire le risque cardiovasculaire ischémique chez les patients atteints de PR semblent être multifactoriels et n'ont pas été complètement déterminés. On peut citer bien sûr, la suppression de l'inflammation systémique et un impact bénéfique sur la vascularisation artérielle. En effet, la régulation négative de la circulation des molécules d'adhérence vasculaire et l'amélioration de la fonction endothéliale ont été observés avec les anti-TNF α (94). Les anti-TNF α peuvent également modifier les facteurs de risque traditionnels cardiovasculaires, tels que la dyslipidémie et l'insulino-résistance (95). Une vaste étude épidémiologique publiée en 2011 a révélé que l'utilisation des anti-TNF α est associée à un risque diminué (0,62, IC à 95% 0.42 à 0.91) de développer un diabète en comparaison avec les traitements non biologiques (96).

Comme pour le méthotrexate, il semblerait que les anti-TNF α , diminuent le risque d'événement cardiovasculaire chez les patients atteints de PR, même s'il existe des discordances entre les études, et notamment dans une population de patients ne répondant pas au traitement sur le plan articulaire. Les mécanismes d'action là aussi ne sont pas clairs, tout comme le délai d'action vasculaire et les particularités d'action entre les différentes molécules des anti-TNF α .

Effet des Statines

Les résultats de plusieurs études suggèrent que les statines pourraient être utilisées en association avec les traitements de fond habituels dans la PR.

Les statines ont démontré des effets immunomodulateurs *in vitro*, ainsi qu'un effet sur la diminution du taux plasmatique de CRP ultra sensible (97), notamment l'atorvastatine chez des patients atteints de PR (98). Des études ont démontré une relation entre la CRP (même au sein de la population «normale») et le risque d'infarctus du myocarde et d'AVC ischémique (99). En outre, la CRP est un facteur de risque indépendant établi de maladie coronarienne.

De ce fait les statines devraient être considérées comme une option thérapeutique chez les patients atteints de PR. Malgré cela, les dernières recommandations ne proposent un traitement par statine que lorsque les taux de cholestérol restent élevés malgré un régime alimentaire approprié.

Cette classe médicamenteuse pourrait s'intégrer dans l'arsenal thérapeutique du rhumatologue, mais pour cela des études complémentaires d'efficacité vasculaire, de tolérance et de physiopathologie devront être menées.

I32. Dysfonction endothéliale et polyarthrite rhumatoïde

Si l'existence d'une surmorbidity et d'une surmortalité cardiovasculaire dans la PR est incontestable, les mécanismes à l'origine de ces phénomènes restent hypothétiques. Durant la dernière décennie, l'hypothèse d'un rôle de la DE comme un élément précoce de ces complications cardiovasculaire a été évoquée.

a. L'endothélium vasculaire

Le transport et la répartition du sang dans l'organisme se fait par l'intermédiaire des vaisseaux sanguins. Ces derniers forment un réseau fermé de conduits chargés d'acheminer le sang du cœur jusqu'au tissu de l'organisme, puis de le ramener au cœur. Il existe plusieurs types de vaisseaux : 1) les artères et artérioles qui acheminent le sang du cœur aux tissus, 2) les capillaires situés au niveau des tissus qui permettent les échanges de gaz et de nutriments entre le sang et les tissus, 3) les veines et veinules qui acheminent le sang des tissus au cœur.

Bien que leur constitution, leur diamètre et l'épaisseur de leur paroi diffèrent, les artères et les veines présentent une caractéristique commune. Leur paroi est formée de 3 tuniques qui sont de la plus superficielle à la plus profonde : l'adventice composée majoritairement de tissu conjonctif, la média composée majoritairement de cellules musculaires lisses et l'intima formée d'une seule couche de cellules endothéliales qui forment l'endothélium vasculaire et du tissu conjonctif sous-jacent (figure 8).

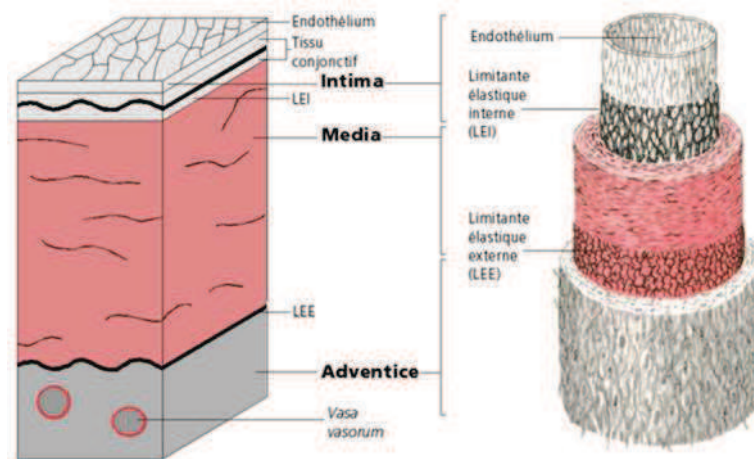


Figure 8. Structure de la paroi vasculaire d'après Histologie humaine, Stevens et Lowe (1997) (100) et Anatomie, tome 2, Khale, Leonhardt et Platzer (1990).(101)

L'endothélium vasculaire peut être considéré comme l' « organe » endocrine le plus important du corps humain avec une surface totale équivalente à celle de 6 terrains de tennis. Chez l'adulte, la masse des 10^3 cellules endothéliales est proche de 500g, la majorité de l'endothélium de l'organisme étant localisée au niveau pulmonaire. De par sa position stratégique, l'endothélium vasculaire n'est pas seulement une simple barrière anatomique entre le sang circulant et les cellules musculaires vasculaires, mais il joue un rôle essentiel dans de multiples régulations physiologiques fondamentales.

Dans les conditions physiologiques, les facteurs hémodynamiques (pression artérielle, débit sanguin) sont les déterminants majeurs qui influencent la biologie de l'endothélium et cela, soit par une action directe liée principalement aux variations du flux sanguin (stimuli mécaniques), soit par une action indirecte associée aux modifications locales de facteurs chimiques (stimuli chimiques). Parmi les stimuli chimiques figurent des hormones, des médiateurs locaux dont certains sont libérés par la cellule endothéliale elle-même, comme nous le verrons ci-dessous.

b. Les facteurs endothéliaux

Depuis les travaux menés par les équipes de Sir John Vane (102) et de Robert Furchgott (103) il est bien établi que l'endothélium est capable de synthétiser et de libérer différents médiateurs susceptibles d'exercer des effets sur les cellules vasculaires et circulantes, et ainsi d'affecter les fonctions vasculaires comme par exemple le tonus et la prolifération, les interactions entre les cellules circulantes et cellules vasculaires (adhésion, agrégation). Les

cellules endothéliales jouent un rôle dans la régulation du tonus vasculaire en synthétisant des agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Parmi les substances vasodilatatrices secrétées par l'endothélium, on trouve la prostacycline (104) le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (endothelium-derived hyperpolarizing factor EDHF) (105), la bradykinine (106) et le monoxyde d'azote (NO) (107). L'effet de ces substances est contrebalancé par des substances vasoconstrictrices produites par l'endothélium telles que l'endothéline-1 (108) l'anion superoxide, l'angiotensine II (109) et le thromboxane A2 (110). En conditions physiologiques, il existe un équilibre entre la production de facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs endothéliaux.

Parmi les substances vasodilatatrices la mieux étudiée et qui nous intéresse tout particulièrement, se trouve le facteur relaxant dérivé de l'endothélium ou EDRF, caractérisé comme étant l'oxyde nitrique ou NO. Le NO est un gaz radicalaire dont la demi-vie est comprise entre quelques millisecondes et quelques secondes (111). Cette demi-vie très courte est toutefois suffisante pour que le NO agisse au niveau des tissus adjacents grâce à des propriétés hydrophobes qui lui permettent de traverser très rapidement les membranes cellulaires. Le NO exerce son activité biologique en réagissant avec des molécules organiques, inorganiques réactives ou des métaux. Par exemple, il réagit avec le fer de l'hème et entraîne ainsi l'activation de la guanylate cyclase soluble qui va produire du GMP (guanosine monophosphate) cyclique qui va ensuite activer d'autres enzymes comme les protéines kinases qui participent à beaucoup de voies de transduction dans la cellule (112).

La biosynthèse du NO est assurée par les NO-synthases (NOS). En présence de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), d'oxygène, de tétrahydrobioptérine (BH₄), de FAD (Flavine adénine dinucléotide) et de FMN (flavin mononucleotide), les NOS catalysent dans une première étape l'oxydation de la L-arginine (acide aminé semi-essentiel) en N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA). Cet intermédiaire peut être libéré du site actif de l'enzyme et exercer des effets autocrines ou paracrines. Dans une deuxième étape, la NOHA est transformée en L-citrulline et NO (113) (figure 9).

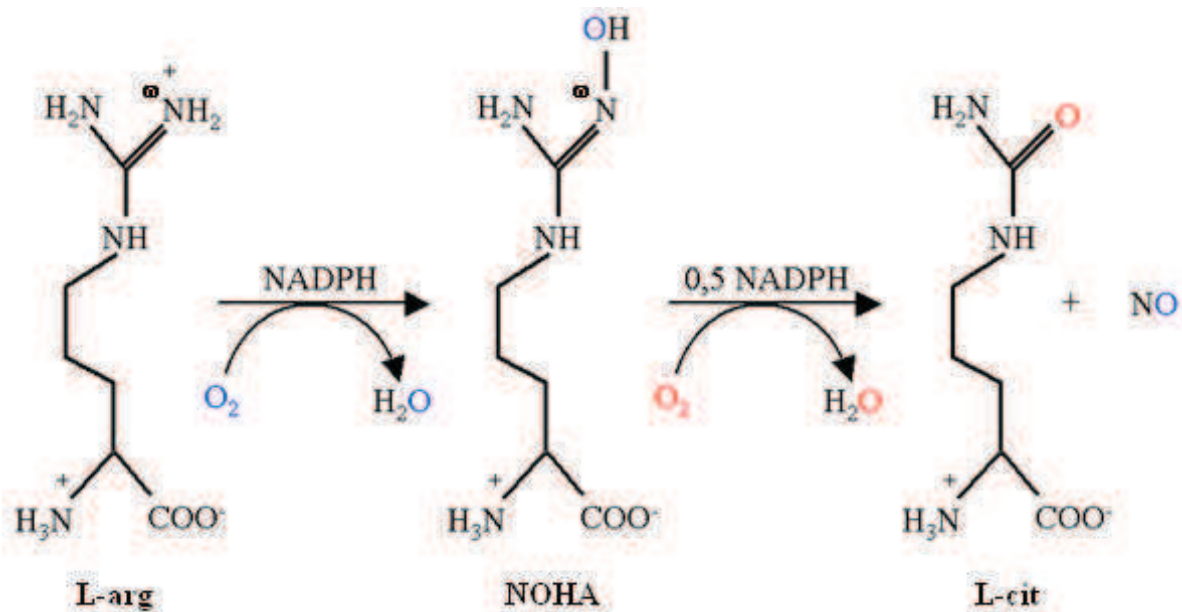


Figure 9 : réaction catalysée par les NO-synthases (Stuehr, 2004) (114) L-arg : L-arginine ; L-cit : L-citrulline

Trois isoformes de NOS ont été identifiées (tableau 7).

L'isoenzyme de type I (NOS1 ou NOS-I, NOS neuronale ou nNOS) est exprimée dans les neurones centraux et périphériques, mais aussi dans d'autres cellules comme les cellules épithéliales ou les cellules musculaires lisses de la média (115).

L'isoenzyme de type III (NOS3 ou NOS-III, NOS endothéliale ou eNOS) est présente dans les cellules endothéliales et les cardiomyocytes. Comme la NOS 1, la NOS 3 est exprimée de façon constitutive. Elle produit de faibles quantités de NO suite à l'activation réversible par le complexe calcium/calmoduline qui lève l'inhibition exercée sur l'enzyme par la cavéoline-1 (116).

L'isoenzyme de type II (NOS2 ou NOS-II, NOS inductible ou iNOS) peut être induite dans de très nombreux types de cellules, dont les diverses cellules vasculaires, après exposition à des composants bactériens (lipopolysaccharide par exemple) ou des cytokines proinflammatoires telles que l'interleukine-1 bêta et le TNF alpha (117-120). Contrairement aux autres isoformes de NOS, la NOS 2 est susceptible de produire des quantités importantes de NO, indépendamment des variations de la concentration en calcium cytosolique.

Tableau 7 : caractéristiques des trois types de NOS

	NOS-I	NOS-II	NOS-III
Type	Constitutive	Inductible	Constitutive
Localisation cellulaire	Cytoplasmique	Cytoplasmique	Cytoplasmique Membranaire Mitochondriale
Masse moléculaire en kDa	160	130	133
Localisation du gène humain	Chromosome 12, région 12q24	Chromosome 17, région 17q11.2	Chromosome 7, région 7q35-36
Activation	Augmentation de la concentration en Ca ²⁺	Expression stimulée par des cytokines et/ou des endotoxines	Augmentation de la concentration en Ca ²⁺

Une fois synthétisé dans la cellule endothéliale, le NO diffuse dans les cellules musculaires lisses où il stimule la guanylate cyclase, enzyme cytosolique qui permet la production du 3'5'-GMPc et la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires. Les cellules endothéliales ne sécrètent pas seulement le NO dans les cellules musculaires lisses vasculaires mais aussi dans la lumière vasculaire. A ce niveau, le NO inhibe l'adhésion des plaquettes et des leucocytes sur l'endothélium. Le NO peut également affecter l'activité du système fibrinolytique en régulant la libération de l'activateur du plasminogène (t-PA) et de son inhibiteur le PAI-1, mais aussi inhiber l'expression de divers facteurs pro-athérogènes comme le monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) et le facteur tissulaire. De plus, le NO inhibe la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires et réduit la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire (figure 10).

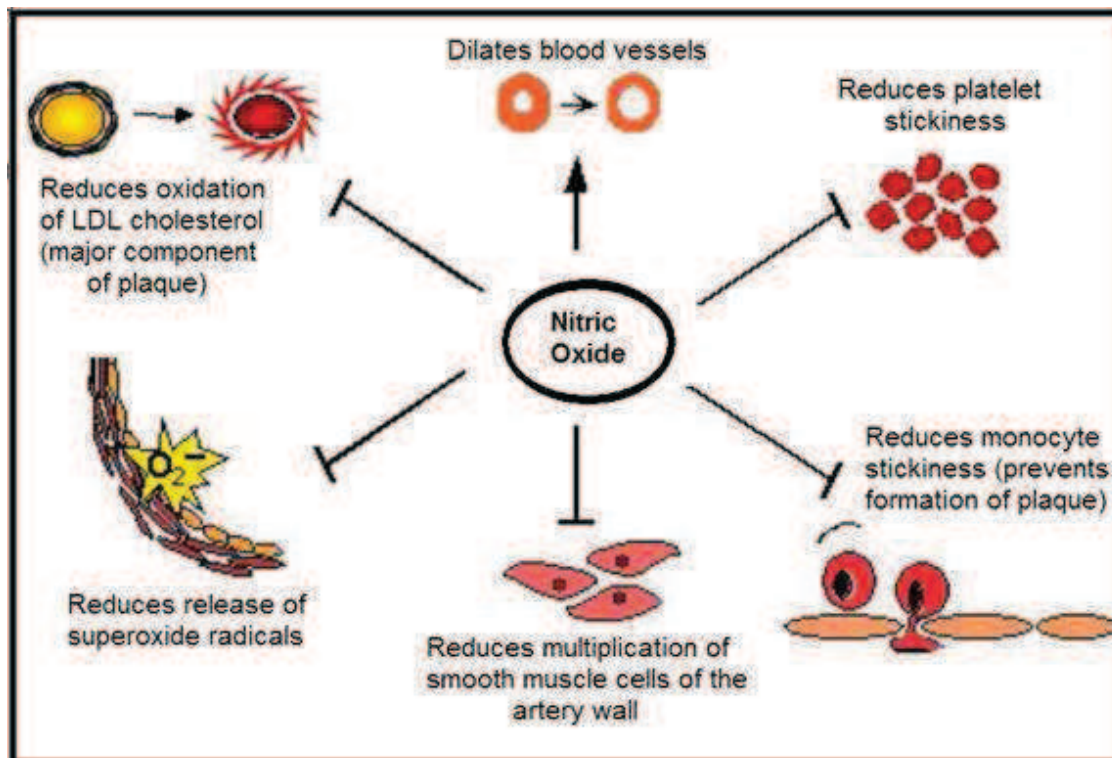


Figure 10 : effets multiples du NO endothélial.

La libération du NO est modulée par des stimuli physiques et humoraux. Parmi les stimuli physiques, les contraintes de cisaillement (shear stress) exercées par le sang sur la paroi artérielle constituent l'un des principaux facteurs régulant la libération du NO. Parmi les stimuli humoraux, on retrouve des hormones circulantes comme les catécholamines et la vasopressine, des autacoïdes (substance organique spécifique formée par les cellules d'un organe, qui est déversée dans le sang et provoque dans les autres organes des effets semblables à ceux des médicaments) de la paroi vasculaire comme la bradykinine et l'histamine, des médiateurs relargués par les plaquettes comme la sérotonine et l'ADP (adénosine diphosphate) et la thrombine qui se forme lors de la coagulation. Ces substances provoquent la libération du NO en activant des voies de transductions dans les cellules endothéliales via leurs récepteurs spécifiques. La production de NO est également sous la dépendance de modifications post-traductionnelles de la NOS endothéliales (eNOS), de la disponibilité en substrat (L-arginine) et en cofacteurs (BH4).

Une des autres substances vasodilatatrices produite par l'endothélium est la prostacycline qui a été découverte en 1976 par Moncada et Vane (121). La prostacycline, produit de la cyclo-oxygénase, est formée principalement dans les cellules endothéliales en réaction aux

contraintes de cisaillement, à l'hypoxie et à plusieurs médiateurs qui libèrent également du NO (122). Elle provoque la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires en activant l'adénylate cyclase via un récepteur spécifique. Dans la plupart des vaisseaux sanguins, en conditions physiologiques, la prostacycline ne joue qu'un rôle mineur dans la relaxation endothélium-dépendante, son effet venant surtout s'ajouter à celui du NO. Cependant, la production de NO et de prostacycline ne peut expliquer à elle seule l'ensemble des relaxations dépendantes de l'endothélium. En présence d'inhibiteurs de cyclo-oxygénase (COX) et de NOS, un mécanisme additionnel responsable d'une vasorelaxation, toujours dépendante de l'endothélium est observée dans de nombreuses artères de différentes espèces, y compris chez l'Homme (123). Ce mécanisme implique l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses et il est particulièrement prépondérant dans la circulation coronaire et dans les lits vasculaires périphériques (124). Ce phénomène est attribué à un composé dénommé EDHF. L'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses résulte d'une augmentation du calcium dans les cellules endothéliales, suivie d'une hyperpolarisation de la cellule endothéliale grâce à l'ouverture de canaux potassiques dépendants du calcium. Cette hyperpolarisation des cellules endothéliales est alors transmise aux cellules musculaires lisses.

Une des autres substances vasodilatatrices produite par l'endothélium est la bradykinine. Cette hormone qui fait partie de la famille des kinines, est activée par la kallikréine et inactivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine. En se fixant sur son récepteur sur les cellules endothéliales, elle induit la synthèse de NO et l'activation de la phospholipase A2 ce qui entraîne la production de médiateurs vasoactifs au niveau de la membrane. La bradykinine a donc un effet vasodilatateur indirect. Elle a également des effets directs comme une relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires une augmentation de la perméabilité vasculaire, une sécrétion d'histamine par les mastocytes, et une augmentation de la sensibilité à l'insuline.

Pour contrebalancer l'effet de ses substances vasodilatatrices, l'endothélium produit également des substances vasoconstrictrices. Une de ces substances est le thromboxane A2 qui comme la prostacycline résulte du métabolisme de l'acide arachidonique via les COX. Le thromboxane A2 a un effet vasoconstricteur limité qui en conditions normales est masqué par les effets du NO, de la prostacycline et de l'EDHF.

Une autre substance vasoconstrictrice produit par l'endothélium est l'endothéline, dont il existe trois isoformes : l'endothéline-1 (ET-1), l'endothéline-2 (ET-2) et l'endothéline-3 (ET-3). L'ET-1 a été la première découverte dans les cellules endothéliales en 1988 par Yanagisawa et son équipe et constitue l'un des plus puissants vasoconstricteurs endogènes connus (108). Elle est synthétisée à partir d'un gros peptide d'environ 200 acides aminés, la préproendothéline qui va être clivée par une endopeptidase pour donner la proendothéline de 39 acides aminés.

La forme active de l'endothéline de 21 acides aminés est obtenue par un clivage de la proendothéline par l'enzyme de conversion de l'endothéline. La dégradation de l'endothéline s'effectue principalement par l'endopeptidase neutre (NEP). En plus d'être un puissant vasoconstricteur, ET-1 a également beaucoup d'effets tels que des effets prolifératifs ou anti-prolifératifs sur les cellules musculaires lisses selon le type de récepteur à l'endothéline présent sur ces cellules. En effet, l'endothéline possède deux récepteurs ET-A et ET-B qui peuvent induire des effets opposés. Le rôle de l'endothéline dépend donc beaucoup du récepteur présent sur le tissu étudié. Au niveau vasculaire, l'endothéline stimule une vasoconstriction via les récepteurs ET-A exprimés sur les cellules musculaires lisses et une vasodilatation via les récepteurs ET-B exprimés sur les cellules endothéliales. Dans ce dernier cas, les cellules endothéliales produisent du monoxyde d'azote qui va agir sur les cellules musculaires lisses voisines (125). C'est l'effet vasoconstricteur qui est physiologiquement dominant.

L'angiotensine II est un autre puissant vasoconstricteur. Elle est synthétisée à partir d'une protéine inactive produite par le foie : l'angiotensinogène. Cette dernière est clivée par la rénine et forme un décapeptide l'angiotensine I lui aussi inactif. L'angiotensine I sera ensuite principalement transformée en angiotensine II par une carboxypeptidase, l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Elle se fixe sur son récepteur AT-1 au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires ce qui provoque une vasoconstriction. Toutefois son effet est atténué par le fait qu'elle se lie également à ses récepteurs AT-2 sur les cellules endothéliales ce qui entraîne une production de NO et de prostacycline (126-128).

La figure 11 récapitule les différents facteurs endothéliaux et leurs effets.

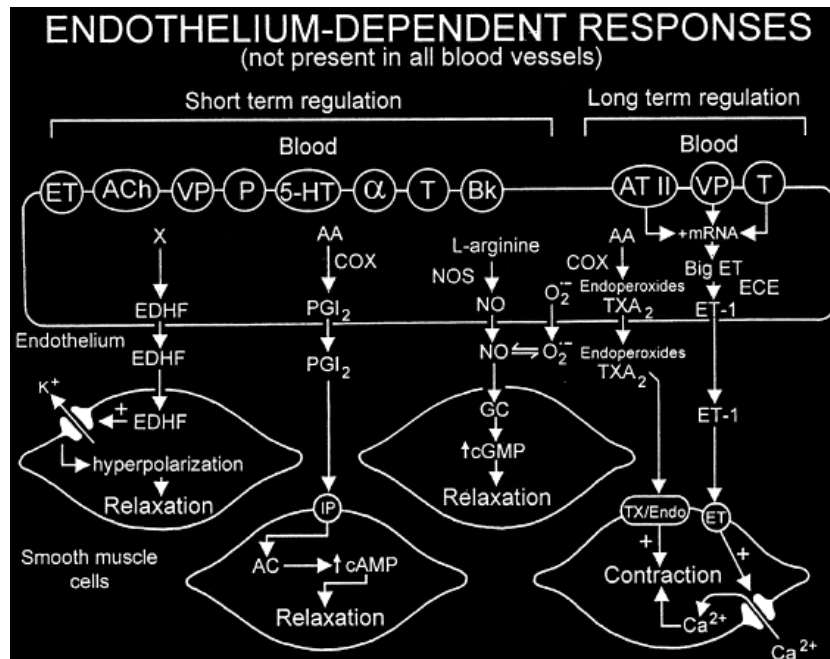


Figure 11 : Les facteurs endothéliaux et leurs effets (AA : acide arachidonique, ACh : acétylcholine, ATII : angiotensine II, BK : bradykinine, COX : cyclooxygénase, ECE : enzyme de conversion de l'endothéline, EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothéline, ET : endothéline-1, O₂⁻ : anion superoxyde, P : purines, PGI₂ : prostacycline, NO : monoxyde d'azote, NOS : NO synthase, T : thrombine, VP : vasopressine, TXA₂ : thromboxane A₂, 5-HT : sérotonine, α : α-adrénérique) (Vanhoutte, 2000).

c. Dysfonction endothéliale et polyarthrite rhumatoïde : données chez l'Homme

Récemment, un rôle de la DE a été suggéré pour expliquer le développement des complications vasculaires de la PR (129). Le concept de DE traduit une anomalie de sécrétion de l'un ou plusieurs facteurs cités précédemment. De façon plus générale, dans la plupart des pathologies cardiovasculaires, elle est généralement assimilée à une anomalie de la disponibilité endothéliale en NO. La DE est une anomalie fonctionnelle alors que l'athérome est une anomalie fonctionnelle et structurale.

La notion de DE dans le PR est récente. Elle a été mise en évidence pour la première fois en 2002 par Bergholm et coll. (5). Dans cette étude, les auteurs ont rapporté une diminution de la vasodilatation acétylcholine-dépendante de l'artère brachiale chez les patients arthritiques comparés aux témoins. Depuis, de nombreuses études cliniques ont confirmé l'existence de cette DE, sans toutefois déterminer les mécanismes impliqués dans cette anomalie vasculaire. Il existe cependant quelques études isolées comme celles de Van doornum et coll. (130), Maki et coll. (131) et foster et coll. (132) qui ne montrent pas de différence avec des groupes contrôles sains. Tout comme il est difficile de savoir à partir de quel moment la PR devient

une maladie systémique inflammatoire par rapport au début des signes cliniques articulaires, il est difficile de savoir quand apparaît la DE dans l'évolution du rhumatisme.

Méthodes d'évaluation de la dysfonction endothéliale

Pour déterminer la présence d'une DE chez l'Homme et étudier l'effet de thérapeutiques, il est nécessaire d'avoir des instruments de mesure de la DE. La « flow mediated dilation » (FMD) de l'artère brachiale et la « nitroglycerine-mediated vasodilation (NMD) déterminées par échographie en mode B, sont des marqueurs endothélium-dépendants et indépendants, respectivement, de la vasodilatation artérielle (133). La FMD mesure la réponse de l'endothélium à une hypoxie induite artificiellement par le gonflement d'un brassard autour de l'avant bras pendant 5 minutes. La diminution de la résistance artérielle périphérique distale induite par le brassard entraîne une hyperhémie de l'artère brachiale après le dégonflement du brassard conduisant à une contrainte de cisaillement induisant une production de NO. La libération de quantités accrues de NO induit la relaxation des cellules musculaires lisses et ainsi une augmentation du diamètre vasculaire. La FMD est calculée par la différence entre le diamètre maximal post occlusion et le diamètre de base et elle est exprimée en pourcentage. Les adultes avec une FMD inférieure à 7% sont considérés comme ayant une dysfonction endothéliale (134). Ces techniques sont utilisées pour évaluer la macrocirculation artérielle.

Avec la NMD, l'échographie de l'artère brachiale pour l'analyse de la fonction endothéliale évalue également la vasodilatation artérielle en réponse à la nitroglycérine administrée en sublinguale, qui a un effet direct sur les muscles lisses de la paroi artérielle entraînant une vasodilatation endothélium-indépendante.

Une autre technique d'évaluation de la DE au niveau de la macrocirculation artérielle est le FBF (Forearm Blood Flow). Cette technique invasive consiste à injecter de l'acétylcholine (ACh) dans l'artère brachiale et à mesurer la variation du débit de cette artère induite par une dilatation Ach dépendante, avec un pléthysmographe.

Une technique plus récente et encore peu utilisée évalue la vasodilatation artérielle endothélium-dépendante et indépendante au niveau de la microcirculation par technique de laser Doppler avec iontophorèse, au niveau de la peau. Sandoo et coll. (135) ont évalué chez des PR l'association entre la fonction endothéliale micro et macro vasculaire, et il semblerait

qu'elles soient indépendantes impliquant probablement des mécanismes de régulation différents. Van eijk et coll. (136) ont montré la normalité de la fonction de cette microcirculation dans un groupe de PR précoce (symptômes < 5 mois) naïves de tout traitement de fond.

De nombreux biomarqueurs de la fonction endothéliale existent (VCAM, Facteur Von Willebrand, les cellules circulantes endothéliales...) mais aucun n'a été validé dans la PR. L'ADMA (asymmetric dimethylarginine) est un inhibiteur endogène puissant de la NOS, dont l'élévation des taux plasmatiques refléterait une DE et a été évalué dans la PR dans quelques études.

Données cliniques concernant la dysfonction endothéliale

Comme en témoignent les taux plasmatiques augmentés des marqueurs de l'inflammation et la présence de signes extra-articulaires, il existe une inflammation systémique dans la PR. Ce phénomène induit des changements pro-athérogènes qui incluent la DE, l'insulino-résistance, la dyslipidémie, les effets thrombotiques et de stress oxydant.

Ces observations plaideraient pour un rôle de l'inflammation chronique comme mécanisme impliqué dans le développement de la DE et de l'athérosclérose dans la PR. Cependant, toutes les maladies associées à une inflammation systémique ne sont pas associées à augmentation de la mortalité cardiovasculaire. Ainsi, il est possible que des interactions complexes entre les déterminants environnementaux et génétiques agissent à la fois sur le système immunitaire et le système vasculaire pour modifier le risque vasculaire dans la PR.

Concernant la topographie lésionnelle, il n'y a aucune donnée disponible comparant la fonction endothéliale de différentes artères. En effet les méthodes d'évaluation de la DE sont restreintes et se limitent souvent chez l'Homme aux artères brachiales et coronaire pour l'étude de la macrocirculation artérielle. L'état de sub-athérosclérose s'évalue par l'épaisseur intima-média carotidienne.

Quant à l'histoire naturelle de la DE par rapport à l'évolution de la PR, les données sont contradictoires. Dans deux études, des patients avec une PR débutante avaient une vasodilatation médiée par le flux (=FMD) altérée signant une DE, (137-138), Dans ces études la DE ne pouvait s'expliquer par l'activité de la maladie ou les marqueurs inflammatoires biologiques ce qui suggérerait une DE très précoce dans la PR peut être apparaissant avant le début de la maladie. La DE semble s'aggraver avec la durée de la maladie, chez des patients sans maladie cardiovasculaire associée. Comme souvent dans les études sur la DE, le nombre

de patients atteints de PR précoce est très modeste (environ 20). Si l'on regarde l'étude de Södergren et al (139), la FMD, n'était pas modifiée dans une population de patients atteints de PR (n=79) avec des symptômes évoluant depuis moins de 12 mois. Le nombre de patients inclus dans cette étude contradictoire était égal au total des patients inclus dans les différentes études citées ci-dessus ce qui complique l'analyse des résultats. Par ailleurs, une récente étude observationnelle sur 18 patients, avec une durée médiane des symptômes de seulement 2 mois, montre une préservation micro et macrovasculaire de la fonction endothéliale, mais avec des niveaux élevés de marqueurs moléculaires d'altération de l'endothélium (138). En ce qui concerne les tests cutanés de dilatation microvasculaires, aucune différence n'a été observée entre les témoins et les patients PR au stade précoce (136). Par conséquent, aucune conclusion définitive sur fonction endothéliale durant les premières années de la PR ne peut être faite. Il est possible qu'avant l'apparition des signes articulaires, apparaissent des marqueurs de DE au même titre qu'il a été retrouvé des FR plasmatiques avant le début des symptômes.

Dans une très belle revue, Sandoo et coll. (140) confirment que le lien entre la DE et l'activité de la PR et les marqueurs inflammatoires est complexe. Non seulement ce lien est peu souvent étudié mais les quelques données disponibles sont la aussi contradictoires dans l'étude de micro et macrovasculaire.

Effets des traitements sur la fonction endothéliale du patient atteint de polyarthrite rhumatoïde

Le rôle des traitements rhumatologiques et non rhumatologiques sur la DE associée à la PR est encore peu connu et il n'existe qu'une vingtaine d'études disponibles sur ce sujet (selon le mode d'évaluation de la DE).

La plupart des études cas-témoins utilisant la FMD ou le FBF comme méthode d'évaluation de fonction endothéliale macrocirculatoire, sont en faveur d'une DE dans la population PR. Partant de ce constat, il est intéressant d'analyser l'effet des traitements lors d'études longitudinales. Malheureusement exceptées 3 études, il n'y a pas de contrôle contre placebo, ce qui modère les résultats. Cette absence de groupe contrôle rend impossible le calcul de l'« effect size » pour chaque molécule. Un autre biais est la récurrence des faibles effectifs, puisque sur les 26 études recensées, il y a une moyenne de 19 patients PR. Les durées d'étude sont courtes, peu d'études ont évalué les patients à 2 ans et plusieurs études évaluent la fonction endothéliale immédiatement après la perfusion du médicament par exemple.

Le tableau 8 recense les différents résultats des effets des traitements par anti-TNF α , tocilizumab, rituximab, anakinra, méthotrexate, GC, AINS, spironolactone, inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC), statines et inhibiteurs des AGEs (Advanced Glycation End Products).

. Concernant les biothérapies, il est rarement indiqué si elles sont utilisées en association ou en monothérapie. Les résultats avec le tocilizumab, le rituximab et l'anakinra sont prometteurs, avec un effet qui se maintiendrait dans le temps pour les 2 premiers. Pour les anti-TNF α , la tendance est à l'amélioration de la fonction endothéliale avec le traitement. Cependant, il existe une hétérogénéité de résultats entre les 3 molécules testées. L'infliximab aurait un effet bénéfique certain sur la fonction endothéliale très rapide, mais transitoire, puisque les valeurs de FMD juste avant les perfusions suivantes sont identiques aux valeurs de base. L'adalimumab et l'etanercept ont été moins étudiés. Ils sont en général efficaces sur la fonction endothéliale, excepté dans l'étude d'Hansel (150), qui ne montre pas une efficacité supérieure de l'ETN sur le méthotrexate sur les valeurs de FMD. Sandoo (147), sur une évaluation précoce à 2 semaines ne montre pas d'effet des anti-TNF α sur la FMD.

. Quatre études concernant l'effet des statines sur la fonction endothéliale des PR vont dans le sens d'un effet positif du traitement après 4, 8 et 26 semaines. Les statines font mieux que le placebo et que le quinalapril. Le degré d'amélioration de la fonction endothéliale serait corrélé avec le niveau de l'inflammation systémique. (153-156)

. Concernant les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, une étude récente a permis de montrer l'effet bénéfique du ramipril sur la fonction endothéliale évaluée par le FMD à 8 semaines de traitement chez des patients atteints de PR versus placebo (163). Mais une étude avec le quinalapril ne retrouve aucun effet de l'IEC versus placebo alors que le 3^{ème} groupe traité par simvastatine améliorait la FMD de manière significative (156).

Ces données ne permettent pas de conclure quant à un intérêt potentiel de traiter les patients PR avec un IEC, contrairement aux recommandations de l'EULAR (cf page 46, point N° 7)

. La seule étude évaluant les inhibiteurs les anti-inflammatoires non stéroïdiens, n'a pas permis de mettre en évidence une amélioration de la fonction endothéliale mesurée par la FMD comparé au placebo, mais sur une évaluation courte à 2 semaines de traitement.

. Une étude a mesuré la FMD à 2 ans chez des patients PR traités avec ou sans GC et il n'a pas été observé de différence dans les 2 groupes. Une analyse transversale de 2 groupes

patients PR avec et sans corticothérapie a montré que les moyennes de FMD dans le groupe GC faible dose étaient supérieures au groupe sans GC (164). Ces résultats isolés ne permettent pas de conclure sur le rôle (positif ou négatif) de la corticothérapie sur la DE.

Tableau 7. Etudes évaluant l'effet des traitements sur la DE macrovasculaire chez l'Homme.

Auteurs	Nombre de patients PR	Placebo	Traitements	Technique d'évaluation	Délai d'évaluation en semaines	Effet
Hurlimann et coll. 2002 (94)	11	-	IFX	FMD	12	+
Cardillo et coll. 2006 (141)	10	-	IFX	FBF	Analyse immédiate	+
Irace et coll. 2004 (142)	10	-	IFX	FMD	0, 2 et 6	Effet en post perfusion mais transitoire
Gonzalez Juanatey et coll. 2004 (143)	7	-	IFX	FMD	2 jours et 4 semaines	Effet en post perfusion mais transitoire
Bosello et coll. 2008 (144)	10	-	IFX	FMD	2, 6 et 14	Effet en post perfusion mais transitoire
Bilsborough et coll. 2006 (145)	14	-	IFX (n=6) ENC (n=3) vs Ttt conventionnels (n=5)	FMD	36	Amélioration supérieure avec les anti-TNF
Capria et coll. 2010 (146)	28	-	ETN ADA IFX	FMD	6 et 104	+
Sandoo et coll. 2012 (147)	23	-	Anti TNF	FMD	2	-
Kerekes et coll. 2011 (148)	8	-	ADA	FMD	24	+
Gonzalez Juanatey et coll. 2012 (149)	8	-	ADA	FMD	12	+
Maki Petaja et coll. 2006 (131)	9	-	ETN	FMD	4 et 12	+
Hansel et coll. 2003 (150)	8	-	ETN vs MTX	FBF	Analyse immédiate	Effet + identique entre MTX et ETN
Protogeru et coll. 2011 (151)	16	-	tocilizumab	FMD	12 et 26	+
Kerekes et coll. 2009 (83)	5	-	RTX	FMD	2, 6 et 16	+
Gonzalez juanatey et coll. 2008 (134)	6	-	RTX	FMD	2 et 26	+
Riksen et coll. 2006 (152)	10	-	MTX	FBF	12	+
Hermann et coll. 2005 (153)	20	20	Simvastatin	FMD	4	+
El Barbary et coll. 2011 (154)	15	-	atorvastatine	FMD	26	+
Maki petaja et coll. 2007 (155)	20	-	Simvastatine vs ezetimibe	FMD	26	+/+
Tikiz et coll. 2005 (156)	45	15	Quinalapril (15) Simavastatin (15)	FMD	8	Effet + de la statine, mais pas de l'IEC vs placebo
Syngle et coll. 2009 (157)	24	-	spironolactone	FMD	12	+
Syngle et coll. 2012 (158)	24	-	AGEs inhibiteurs	FMD	12	+
Wong et coll. 2007 (159)	37	oui	Indometacin e/ rofecoxib	FMD	2	-
Ikonomidis et coll. 2008 (160)	46	-	Anakinra vs GC	FMD	4	Amélioration avec anakinra et pas avec CTC
Sidiropoulos et coll. 2009 (161)	12	-	ADA (n=7) IFX (n=5)	FMD	78	+
Hafstrom et coll. 2007 (162)	67	-	GC ou pas de GC	FMD	104	Pas de différence entre les 2 groupes
Flammer et coll. 2008 (163)	11	oui	ramipril	FMD	8	+

L'étude de Galarraga et coll. a analysé l'effet des anti-TNF et du méthotrexate sur la fonction endothéliale dans la microcirculation. Il n'y a aucun effet des traitements à 4 mois, quel que soit le groupe traité, sauf si l'on regarde le sous-groupe de patients (anti TNF ou MTX) répondeurs au traitement, chez qui il a été mis en évidence une amélioration de la fonction vasculaire, ce qui suggère un lien entre l'activité de la maladie et l'atteinte vasculaire (165). Une étude antérieure du même auteur avait noté une moins bonne vasodilatation endothélium-dépendante dans des sous-groupes de patients PR avec des CRP élevées (166).

Concernant l'ADMA, il est noté une augmentation des taux dans la PR comparé aux contrôles sains (167-168). Di franco 2012, chez 20 PR récentes, a montré qu'un an de traitement par DMARDS a permis de diminuer les taux d'ADMA (169). Sandoo 2012 (170), n'a pas mis en évidence d'effet des anti-TNF sur les taux d'ADMA à 2 semaines et à 3 mois. Ces résultats sont confirmés par turjel 2010 qui après 18 mois, n'a pas noté d'effet des DMARDS et de l'ADA sur ce marqueur (171).

Mécanismes impliqués dans la DE chez l'homme

Dans la PR, les mécanismes générant une DE sont toujours non élucidés. L'activation des cellules endothéliales et les dommages inflammatoires de la paroi vasculaire, contribuent au développement d'une DE. La DE serait le résultat de processus autoimmuns systémiques, dans lesquels les autoanticorps pourraient jouer un rôle important (48).

Il a été démontré *in vitro* que le TNF α compromet la biodisponibilité du NO, en bloquant l'activation du NO endothélial et en inhibant la COX-1, qui sont des éléments importants pour le maintien de la stabilité endothéliale (172). L'augmentation des molécules d'adhésion telles que E-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1, augmentés dans la PR en comparaison avec un groupe de témoins sains, contribuent à la DE et leurs concentrations plasmatiques sont fortement corrélées avec les marqueurs de l'inflammation (173).

Les paramètres inflammatoires et lipidiques pourraient être impliqués dans la DE associée à la PR. Vaudo a étudié la fonction endothéliale chez 32 PR non actives (DAS28 < 3,2) n'ayant pas de facteur de risque cardiovasculaire et chez 28 témoins (174). Il existe une DE chez les PR. Celle-ci est inversement proportionnelle au LDL cholestérol et à la CRP qu'il s'agisse de la CRP dosée au moment de l'examen, de la moyenne des différentes valeurs de la CRP obtenue durant l'évolution ou de la valeur moyenne de la CRP multipliée par le nombre d'année(s) d'évolution de la PR. Elle n'est pas corrélée au HDL cholestérol, aux triglycérides,

à la vitesse de sédimentation ni à la durée d'évolution de la PR. Cette DE s'améliore avec le contrôle de l'activité de la PR.

Le schéma ci-dessous résume les hypothèses concernant le développement de la DE en cas de PR (figure 12).

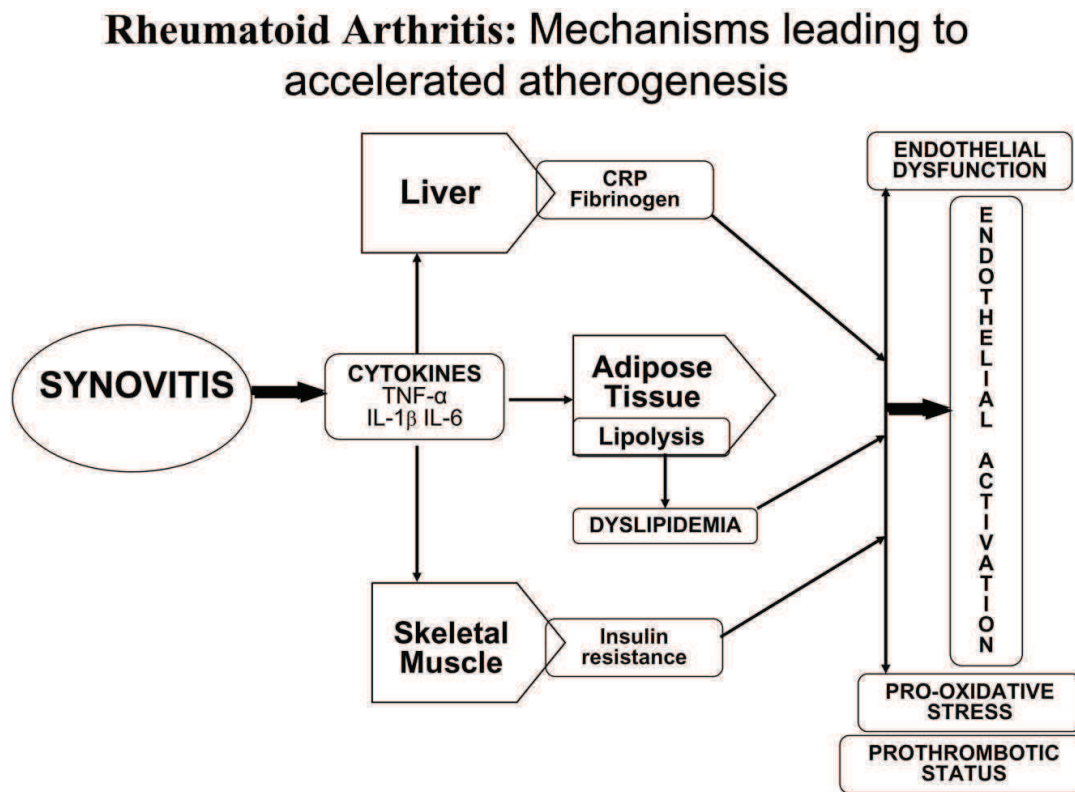


Figure 12. Mécanismes menant à la DE dans la PR.

d. Dysfonction endothéliale et modèles expérimentaux murins de polyarthrite

Les modèles murins d'arthrite constituent des outils qui pourront permettre de comprendre les liens entre la DE et l'atteinte inflammatoire chronique systémique et articulaire. Ces modèles pourront servir également à tester des molécules susceptibles de diminuer les effets cardiovasculaires de la PR. Cependant, le nombre d'études chez l'animal est très limité pour l'instant (7 études recensées). La première démonstration d'une DE chez le rat arthritique a été réalisée par Fang et coll. (175) en 1991, qui a montré que la relaxation endothélium-dépendante d'aortes thoraciques isolées de rats arthritiques (AIA) était altérée par rapport au groupe contrôle. Chez Egan et coll. (176), l'inhibition des (COX) ne permet pas d'améliorer

la DE alors que Ulker et coll. (177) émettent l'hypothèse d'un rôle des prostanoïdes. Quelques études, mais pas toutes, ont démontré un rôle du stress oxydant dans la DE associée à l'arthrite chez le rat en utilisant la vitamine E comme antioxydant (178). Ainsi, Haruna et coll. (179-180) ont récemment montré que les aortes de rats arthritiques produisent plus d'anions superoxydes que les vaisseaux contrôles, et que l'incubation de ces vaisseaux avec un inhibiteur de NOS, le L-NAME, réduit le stress oxydant vasculaire. Cependant, les conséquences fonctionnelles du stress oxydant sur la relaxation endothélium-dépendante n'ont pas été étudiées. Ce résultat qui relie NO et anion superoxyde suggère l'existence d'un découplage de la NOS endothéliale (eNOS) chez le rat arthritique. La notion de « découplage » des NOS désigne la situation au cours de laquelle la NO Synthase se comporte comme une NADPH oxydase et produit des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène au lieu du NO. Plusieurs facteurs peuvent être impliqués dans le découplage de la eNOS et la diminution de la disponibilité vasculaire en NO : un déficit en co-facteur de la eNOS, la tétrahydrobioptérine (BH4), un déficit en substrat de la eNOS, la L-arginine.

Etant donné les lacunes dans la compréhension des mécanismes faisant le lien entre la PR et la DE, l'objectif de notre travail de thèse a été d'étudier le rôle de l'arginase, une enzyme du métabolisme de la L-arginine, dans l'atteinte vasculaire endothéliale associée à un modèle expérimental de polyarthrite.

I4. Arginase

I41. Structure

Découverte au début du siècle dernier par Kossel et Dakin en 1904, l'arginase (EC 3.5.3.1), encore appelée amidinohydrolase ou L-arginine uréahydrolase est une enzyme largement distribuée dans le monde vivant. Elle est présente chez les bactéries, les parasites, les champignons, les plantes, les animaux vertébrés ou invertébrés (181). Chez les mammifères, elle existe sous deux isoformes, l'arginase 1 et l'arginase 2, codées par des gènes différents, localisés sur des chromosomes différents (chromosome 6 pour l'arginase 1 et chromosome 14 pour l'arginase 2). Les deux isoformes de l'enzyme présentant environ 50% d'homologie de structure en acides aminés, mais 100% d'homologie au niveau du site catalytique (182). Par

ailleurs, ces isoformes diffèrent par leur distribution tissulaire, leur localisation subcellulaire, leur régulation et probablement leur rôle physiologique.

La structure cristallographique de l'arginase 1 de rat a été déterminée en 1996 (183). L'enzyme est active sous la forme d'un homotrimère de 105 KDa possédant en son centre un cluster de 2 ions manganèse Mn^{2+} . L'arginase fait donc partie des métalloprotéines à manganèse. La structure cristallographique des arginases humaines a été déterminée par l'équipe de Christianson, en 1999 pour l'arginase 1 (184), et en 2003 pour l'arginase 2 (185). L'arginase 1 humaine comporte 87% d'homologie de séquence d'acides aminés avec l'arginase 1 de rat. L'arginase 2 humaine présente 62% d'homologie en acide aminés avec l'arginase 2 de rat et 60% d'homologie avec l'arginase 1 humaine (186-187). Les isoformes humaines sont également actives sous forme d'homotrimères et dépendantes du manganèse (184-185).

142. Fonction

L'arginase 1 est l'isoforme la mieux connue, du moins au niveau hépatique. En effet, cette isoforme qui est située au niveau cytosolique est très fortement exprimée par le foie où elle catalyse la dernière réaction des 5 étapes du cycle de l'urée en hydrolysant la L-arginine en urée et L-ornithine (Figure 13). Ainsi, le déficit congénital en arginase 1 est associé à une hyperammoniémie et une hyperargininémie responsables d'une atteinte neurologique sévère (188). Cependant l'arginase 1 est également exprimée par de nombreux tissus extra-hépatiques qui ne possèdent pas de cycle de l'urée complet tels que le cerveau, les érythrocytes, l'intestin, la peau, l'utérus...(189-193).

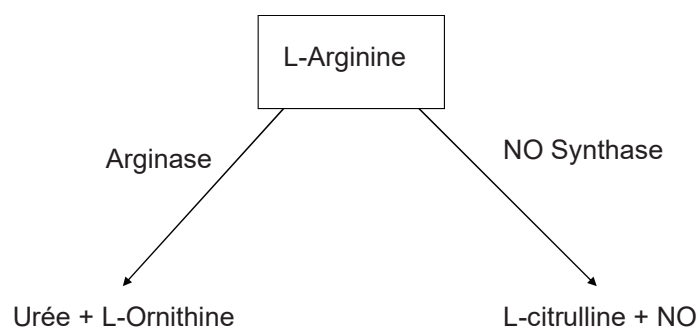


Figure 13. Métabolisme de la L-arginine par la NO synthase et l'arginase

L'arginase 2 est une enzyme de la face externe de la membrane mitochondriale exprimée par de nombreux tissus dans lesquels le cycle de l'urée est incomplet, dont le rein où elle est très fortement exprimée, le cerveau, les macrophages, le cœur, les vaisseaux, les poumons, l'intestin, la prostate, les leucocytes, les muscles squelettiques, les glandes mammaires, les corps caverneux...(181).

Le rôle physiologique des arginases dans les tissus ne possédant pas les autres enzymes du cycle de l'urée est encore mal connu. On leur attribue souvent un rôle dans diverses biosynthèses dérivant de l'ornithine.

Leur compartimentation intracellulaire peut avoir des implications importantes dans le métabolisme de l'arginine. Par exemple, de par sa colocalisation avec l'ornithine décarboxylase dans le cytoplasme, l'arginase 1 va préférentiellement diriger l'ornithine vers la synthèse de polyamines, médiateurs qui contrôlent la prolifération et la croissance cellulaire. L'arginase II, de par sa colocalisation avec l'ornithine aminotransferase dans la mitochondrie va plutôt diriger l'ornithine vers la synthèse de proline (précurseur du collagène) et de glutamate (194). Plus récemment, l'hypothèse d'un rôle régulateur des arginases dans la synthèse du NO a été avancée, comme nous le décrirons plus en détail ultérieurement. Il convient de préciser que les études réalisées avec des souris transgéniques n'ont pas permis d'éclaircir réellement le rôle physiologique de ces enzymes. Ainsi, les souris knock-out pour le gène de l'arginase 2 sont viables et possèdent un phénotype normal alors que leur activité arginase rénale est 100 fois plus faible et leur taux d'arginine plasmatique deux fois plus élevé que chez les souris sauvages (182). En revanche, les souris knock-out pour le gène de l'arginase 1 meurent 10 à 12 jours après leur naissance d'une hyperammoniémie, confirmant bien les données très anciennes du rôle de l'arginase 1 dans le cycle de l'urée.

I43. Arginase, monoxyde d'azote et fonction vasculaire

A la fin des années 1990, des études se sont intéressées à l'éventualité d'une régulation de la production de NO par l'arginase puisque NO synthases et arginase possèdent un substrat commun, la L-arginine. Les données biochimiques obtenues *in vitro* indiquent que le K_m des NOS pour l'arginine est de l'ordre du μM alors que celui de l'arginase est de l'ordre du mM, rendant *a priori* peu probable une compétition entre ces 2 enzymes. En revanche, la V_{max} de l'arginase est environ 1000 fois supérieure à celle des NOS, caractéristique qui pourrait

annuler les différences de K_m entre les deux enzymes (195) et par conséquent être à l'origine d'une compétition de substrat.

Plusieurs études ont permis de démontrer que l'impossibilité d'une compétition entre les deux enzymes suggérée par les données biochimiques *in vitro* ne se confirmait pas sur un modèle cellulaire tel que les macrophages activés (196-197). Il a ainsi été montré que l'activation des macrophages induisait l'expression de l'arginase 2 et de la NOS inducible avec une diminution de la production de NO, ce qui laisse à penser que l'arginase II diminue la production de NO en diminuant le pool de L-arginine intracellulaire (198). Une autre étude a montré, également sur des macrophages, que l'activation des macrophages induisait l'augmentation de l'expression de l'arginase et une diminution de la production de NO. De plus une inhibition de l'arginase par la L-norvaline permettait d'augmenter la production de NO (199).

Des résultats similaires ont été obtenus sur le muscle lisse du corps caverneux de lapin, où l'inhibition de l'arginase avec l'acide 2(S)-amino-6-borohexanoïque (ABH) permet d'améliorer la relaxation du muscle lisse. Ce résultat laisse suggérer que l'inhibition de l'arginase laisse une concentration suffisante de L-arginine pour que le NO puisse avoir son effet relaxant (184).

De manière intéressante, des études ont montré que la même relation entre arginase et NOS existait dans les cellules endothéliales vasculaires. La présence d'arginase dans les cellules endothéliales a été montrée pour la première fois par Buga et coll., dans des cellules endothéliales aortiques de rat en culture (200). Les études sur des cultures d'HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) et des cultures de cellules endothéliales d'artère pulmonaire bovine ont montré que les deux isoformes d'arginase 1 et 2 étaient exprimées, et qu'un inhibiteur d'arginase pouvait augmenter la production de NO (201-202).

Au niveau tissulaire et en conditions physiologiques, Zhang et coll., ont montré que les artères coronaires de porc exprimaient l'arginase de type 1 (type 2 non recherchée), et que l'incubation avec un inhibiteur d'arginase sur les coronaires isolées améliorait la vasodilatation NO-dépendante (203). Cette étude a été la première à démontrer sur le plan fonctionnel la capacité de l'arginase à limiter la production endothéliale de NO. En conditions pathologiques, Hein et coll. ont montré que l'ischémie reperfusion cardiaque augmentait

l'expression de l'arginase dans les cellules endothéliales d'artères coronaires de porc, et qu'un inhibiteur d'arginase améliorait la fonction endothéliale de ces coronaires isolées perfusées (204). Une étude conduite chez des rats âgés a révélé que l'âge s'accompagnait d'une surexpression de l'arginase 1 au niveau aortique, et qu'un inhibiteur d'arginase améliorait la réponse vasodilatatrice à la L-arginine et augmentait l'activité aortique des NOS (205). De même l'inhibition de l'arginase 2 chez des souris âgées augmente la production de NO et diminue celle des ROS (reactive oxygen species) et améliore la relaxation Ach dépendante (206). Des résultats équivalents sont trouvés dans des modèles murins de dysfonctions érectiles péniennes liées à l'âge (207). Gronros et coll. ont démontré que chez des rats diabétiques de type II l'inhibition de l'arginase, restaurait *in vivo* la fonction micro-vasculaire coronarienne par le biais d'une augmentation de l'utilisation de la L-arginine par les NOS et l'augmentation de la disponibilité du NO (208). De la même façon, l'inhibition de l'arginase dans un modèle murin de choc hémorragique, restaure la vasodilatation flux dépendante (209). Notre équipe a récemment montré dans un modèle de rat d'HTA que l'inhibition de l'arginase réduisait cette hypertension, améliorait la fonction vasculaire et réduisait la fibrose cardiaque (210-211).

Ces études, en faveur d'une interrelation entre l'arginase et la NOS au niveau vasculaire en conditions physiologiques et pathologiques chez l'animal, nous ont conduit à nous intéresser au rôle de l'arginase dans la DE associée à la PR.

I44. Arginase et polyarthrite rhumatoïde

Quelques études ont étudié l'arginase en cas de PR, mais uniquement au niveau articulaire. Chez l'Homme, la première étude visant à relier arginase et PR date de 1972 menée par Acquaviva et coll. (212), où l'activité de l'arginase dans le liquide synovial était significativement plus élevée dans le groupe PR comparée au groupe arthrosique. En 2001, Huang et coll. (213) rapportaient une augmentation de l'expression de l'arginase dans le sérum et dans des cultures de monocytes sanguins chez les patients PR. De plus, une corrélation a été observée entre la concentration en arginase sérique et le FR. Les auteurs suggèrent que l'arginase pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de la PR. La troisième étude, en 2002, réalisée par Corraliza et coll. (214), relie arginase et NO. L'activité de l'arginase, et la production de NO ont été mesurées dans les monocytes du liquide synovial chez des patients arthritiques. Les résultats montrent que l'arginase 2 est exprimée dans les cellules du liquide

synovial et que dans les macrophages du liquide synovial, les prostaglandines E2 (PGE2), le Tumor Growth Factor β (TGF- β) et le LPS (lipopolysaccharide) augmentent l'activité de l'arginase 2 et réduisent la production de NO. De plus l'induction de la NOS inducible (iNOS) dans les macrophages du liquide synovial par les cytokines Th1 (IL-2, interféron γ , TNF- α) inhibe l'activité de l'arginase. Ces auteurs suggèrent que, chez les patients arthritiques, l'expression de l'arginase 2 dans le liquide synovial est augmentée et favorise la prolifération cellulaire via la production de L-ornithine. Une quatrième étude réalisée par Sarban et coll (215), comprenant 23 patients PR, a porté sur la relation entre le manganèse, co-facteur de l'arginase, l'arginase, et le NO dans le liquide synovial et le plasma. Dans cette étude, une baisse du taux de manganèse a été observée dans le liquide synovial des patients arthritiques, associée à une diminution de l'activité de l'arginase synoviale. La baisse de l'activité de l'arginase dans le liquide synovial, et la hausse des taux de NO soutiennent l'hypothèse d'une relation entre arginase et NOS dans le liquide synovial chez les patients arthritiques. En revanche, l'activité de l'arginase plasmatique n'est pas différente entre les patients atteints de PR et les sujets contrôles. Ainsi, ces études ne permettent pas de conclure sur le rôle de l'arginase dans la PR, puisque l'expression ou l'activité de l'arginase dans le liquide synovial ou au niveau plasmatique est soit augmentée, soit diminuée. Récemment, une étude conduite sur une culture de chondrocytes de lapin (216) a montré que l'expression de l'arginase 2 était augmentée durant la chondrogénèse et diminuée durant la dédifférenciation des chondrocytes qui mène à la destruction articulaire dans la PR. Cependant l'inhibition de l'arginase 2 n'a pas affecté la différenciation chondrocytaire. Plus récemment, il a été montré que l'expression du gène de l'arginase 1 était augmentée dans le tissu synovial de souris arthritiques pendant la phase aiguë de l'inflammation mais pas pendant la phase chronique de la maladie (217).

Les données actuelles sont trop hétérogènes pour tirer des conclusions sur le rôle de l'arginase dans la physiopathologie de l'atteinte inflammatoire articulaire de la PR chez l'Homme ou dans les modèles murins. En revanche le rôle de l'arginase n'a jamais été étudié dans la pathologie cardiovasculaire accompagnant la PR, ce qui fait toute l'originalité de notre travail.

II. Objectifs du travail

Compte tenu du rôle important de la dysfonction endothéliale dans la morbi-mortalité cardiovasculaire associée à la polyarthrite rhumatoïde, la compréhension des mécanismes qui sous-tendent cette anomalie vasculaire est capitale pour être capable d'identifier des cibles pharmacologiques de nouveaux traitements capables de prendre en charge efficacement cette dysfonction. Les données de la littérature qui suggèrent un rôle de l'arginase dans la régulation de la fonction endothéliale dans plusieurs pathologies cardiovasculaires ou métaboliques, nous ont conduit à caractériser les anomalies de l'arginase dans le modèle d'arthrite induite à adjuvant et évaluer les effets de l'inhibition de l'arginase sur la dysfonction endothéliale associée à l'arthrite chez le rat et sur l'atteinte articulaire inflammatoire.

Nous avons fait le choix du modèle AIA, qui induit une polyarthrite se rapprochant de la polyarthrite rhumatoïde. Ce modèle est largement utilisé pour étudier les mécanismes physiopathologiques et tester des thérapeutiques. Dans ce modèle, l'existence d'une DE a été démontrée.

L'objectif de la première étude a été de déterminer s'il existe des anomalies du métabolisme de l'arginase vasculaire dans un modèle d'arthrite chez le rat, puis de déterminer si ces anomalies interviennent dans la dysfonction endothéliale associée à ce modèle murin.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Arthritis and Rheumatism* en 2011.

L'objectif de la deuxième étude a été d'analyser l'effet d'un traitement à court terme par un inhibiteur d'arginase, la N ω -hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA), sur la fonction endothéliale de l'aorte thoracique et l'atteinte inflammatoire articulaire par une analyse clinique, radiologique et histologique.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Arthritis Research and Therapy* en 2012.

III. Travaux personnels

A. Première étude : Dysfonction endothéliale dans le modèle d'arthrite induite à adjuvant : up régulation de la voie de l'arginase vasculaire.

Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis: up-regulation of the vascular arginase pathway.

Prati C, Berthelot A, Wendling D, Demougeot C.

Arthritis and Rheumatism, 63 : 2309-20317 (2011).

1. Introduction et objectifs de l'étude

Il est bien établi que la dysfonction endothéliale (DE) est un élément initiateur de l'athérogénèse, elle-même impliquée dans le développement et la survenue des complications cardiovasculaires. Dans la PR, l'existence d'une DE est désormais un fait établi chez le patient. De façon intéressante, cette DE a également été décrite dans le petit nombre de publications dédiées aux anomalies vasculaires dans le modèle d'AIA (175-180). Cependant, ses mécanismes physiopathologiques sont très peu connus, alors que leur compréhension est un pré-requis nécessaire à une prise en charge adaptée de cette anomalie vasculaire chez le patient. Comme nous l'avons indiqué précédemment, la PR partage avec les pathologies cardiovasculaires « conventionnelles » des facteurs de risque communs, mais possède également des facteurs de risque qui lui sont propres. Aussi, les mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale de la PR pourraient-ils également être différents de ceux des maladies cardiovasculaires « conventionnelles ».

Dans ce contexte, l'utilisation du modèle animal de polyarthrite est une étape indispensable à la compréhension de ces mécanismes. De façon surprenante, alors que le déficit en NO est un élément fondamental de la DE, aucune étude n'a démontré l'existence d'anomalie de l'activité des NO synthases vasculaires en cas d'arthrite. Par ailleurs, les travaux menés au Laboratoire qui s'intéressaient au rôle de l'arginase dans la DE associée à l'HTA suggéraient un rôle majeur de cette enzyme (218-219). En effet, dans cette pathologie, nos données ont démontré que l'augmentation d'expression et d'activité de cette enzyme au niveau endothélial diminuait la disponibilité en arginine pour les NOS synthases, contribuant ainsi au déficit vasculaire en NO. Ces données obtenues dans l'HTA ont été confirmées par d'autres Laboratoires et dans d'autres pathologies cardiovasculaires telles que le diabète, l'insuffisance coronaire ou la dysfonction érectile (220-221). De plus, même si les mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité et/ou de l'expression de l'arginase sont encore mal connus, les études réalisées *in vitro* sur culture de cellules endothéliales suggèrent que diverses cytokines pro-inflammatoires ont des effets inducteurs de l'expression de l'arginase (222). Aussi, l'existence d'anomalies de l'arginase dans une pathologie inflammatoire chronique comme la PR est tout à fait envisageable.

Dans ces conditions, l'objectif de notre première étude a été de déterminer le rôle de l'arginase dans la DE associée au modèle d'AIA chez le rat Lewis. Pour ce faire, nous avons recherché l'existence d'anomalies de l'activité /expression de l'arginase au niveau aortique chez le rat AIA, et déterminé si une corrélation existait entre la sévérité de l'arthrite et ces anomalies. Compte-tenu du lien entre arginase et NO synthases, l'expression de la NOS endothéliale a également été mesurée. Dans un deuxième temps, nous avons étudié, sur le modèle d'anneaux aortiques isolés, le rôle du NO et de l'arginase dans la dysfonction endothéliale du rat AIA, en incubant les vaisseaux avec des inhibiteurs de ces deux enzymes, respectivement le L-NAME, L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (inhibiteur de NOS) et la N-w-hydroxy-nor-L-arginine (inhibiteur d'arginase, nor-NOHA). La nor-NOHA est un analogue de l'arginine, qui inhibe de façon compétitive et réversible les deux isoformes de l'enzyme, mais qui est dénué d'effet inhibiteur de NOS (223).

2. Méthodologie

Les expériences ont été conduites avec le modèle d'AIA chez des rats Lewis mâles âgés de 6 semaines au moment de l'injection du *M. Butyricum* dans l'adjuvant de Freund. Les premiers symptômes articulaires apparaissent 10 à 12 jours après cette injection, les animaux ont été sacrifiés 3 semaines après l'apparition d'arthrite. Des rats non arthritiques de même âge ont servi de contrôles. L'arthrite était évaluée 5j/7 par un score clinique. Les poignets, chevilles et tarses, les doigts étaient notés en fonction de l'intensité de l'atteinte inflammatoire. Les scores permettaient de classer les rats en grades où 0 était l'absence d'arthrite et 3 l'atteinte maximale (tableau 9).

Tableau 9. Cotation du score et des grades d'atteinte articulaire.

Score arthritique	
atteinte d'un doigt	0,1
atteinte faible ou modérée d'une grosse articulation	0,5
atteinte intense d'une grosse articulation	1
Grade arthritique	
Grade 0	score à 0
Grade 1	score de 0,1 à 0,9
Grade 2	score de 1 à 1,9
Grade 3	score de 2 et plus

L'activité de l'arginase aortique a été mesurée par technique spectrophotométrique selon la technique de Corraliza et coll (224). La mesure de l'expression des arginases 1 et 2, de l'eNOS aortiques a été réalisée par Western Blotting. La réactivité vasculaire a été étudiée sur des artères thoraciques qui ont été nettoyées, et coupées en anneaux de 2 à 3 mm de largeur. Chaque anneau aortique a été disposé entre une tige fixe, et une tige mobile reliée à un capteur de tension (en g), au sein d'une cuve à organe isolé contenant une solution physiologique. Afin de déterminer l'existence d'une dysfonction endothéliale, les anneaux ont été contractés à la noradrénaline (NA) ($3 \cdot 10^{-7}$ M) puis relaxés par des concentrations croissantes d'acétylcholine (10^{-11} - 10^{-4} M) en présence ou non d'un inhibiteur de NOS, la N-nitro-L-arginine-méthyl-ester (L-NAME), d'un inhibiteur d'arginase (nor-NOHA, 10^{-4} M). Les taux plasmatiques d'IL6 et de TNF α ont été mesurés par kit ELISA.

Endothelial Dysfunction in Rat Adjuvant-Induced Arthritis

Up-Regulation of the Vascular Arginase Pathway

Clément Prati,¹ Alain Berthelot,² Daniel Wendling,³ and Céline Demougeot²

Objective. To investigate whether arginase pathway abnormalities occur in vessels from rats with adjuvant-induced arthritis (AIA), and to determine whether the up-regulation of arginase, which reciprocally regulates nitric oxide synthase (NOS) by competing for the same substrate, L-arginine, contributes to endothelial dysfunction in AIA.

Methods. We performed vascular reactivity experiments on thoracic aortic rings from AIA rats and control rats, and we investigated the response of rings to norepinephrine (NE), sodium nitroprusside (SNP), and acetylcholine (ACh). ACh-induced relaxation was evaluated in the presence (or not in the presence) of the NOS inhibitor *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), the arginase inhibitor *N*^ω-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA), or both. Aortic arginase activity was measured using a spectrophotometric method, and the expression of arginase and endothelial NOS (eNOS) was evaluated by Western blotting.

Results. ACh-induced vasodilation was significantly impaired in AIA rats, while the responses to NE and to SNP did not differ from those in control rats. L-NAME reduced ACh-induced vasodilation to a lesser extent in AIA rats than in control rats. Incubation of

aortic rings with nor-NOHA enhanced the vascular response to ACh in AIA rats and reversed the effects of L-NAME. Compared with control rats, AIA rats exhibited increased vascular expression of arginase II (by 22%) ($P < 0.05$) as well as increased arginase activity (by 49%) ($P < 0.05$), whereas eNOS expression was unchanged. Finally, arginase activity and expression correlated positively with arthritis severity.

Conclusion. Our results are consistent with the notion that arginase up-regulation plays a role in AIA-associated endothelial dysfunction. They suggest that arginase might be an attractive new target for treating endothelial dysfunction in arthritis.

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common systemic autoimmune disease and is associated with excessive cardiovascular mortality (1,2). There is a decrease of 10–15 years in life expectancy in these patients compared with that in the general population, particularly in patients with severe disease (3). The presence of chronic inflammation is responsible for the development of subclinical atherosclerosis and increased incidence of cardiovascular events in arthritis patients (4). It is well established that endothelial dysfunction is the most important step in early atherogenesis and also contributes to the development of clinical features in the later stages of vascular disease, including progression of atherosclerotic plaque (5,6). In addition, endothelial dysfunction is a predictor of cardiovascular events in the general population (7). Accordingly, there is ample evidence that endothelial dysfunction occurs in RA patients (8). However, the mechanisms underlying endothelial dysfunction in RA are poorly understood.

The endothelium modulates vascular tone by releasing a number of vasoactive substances, including nitric oxide (NO) produced by endothelial NO synthase (eNOS) (9). It is generally accepted that endothelial dysfunction mainly relies on a decrease in NO bioavailability (10) that may result from different mechanisms,

Supported by grants from the Association for the Franco-Comtoise Training, Research, and Teaching Rheumatology and from the French Region of Burgundy.

¹Clément Prati, MD: University of Franche Comté, EA 4267, and University Hospital of Besançon, Besançon, France; ²Alain Berthelot, PhD, PharmD, Céline Demougeot, PhD, PharmD: University of Franche Comté, EA 4267, Besançon, France; ³Daniel Wendling, MD, PhD: University of Franche Comté, EA 4266, and University Hospital of Besançon, Besançon, France.

Dr. Wendling has received consulting fees, speaking fees, and/or honoraria from Abbott, Bristol-Myers Squibb, Wyeth Pfizer, Roche Chugai, Schering-Plough, and Nordic (less than \$10,000 each).

Address correspondence to Céline Demougeot, PhD, PharmD, Pôle Dysfonction Endothéliale, EA 4267, Sciences Séparatives Biologiques et Pharmaceutiques, Faculté de Médecine-Pharmacie, Place Saint-Jacques, 25030 Besançon Cedex, France. E-mail: cdemouge@univ-fcomte.fr.

Submitted for publication August 12, 2010; accepted in revised form March 31, 2011.

including decreased eNOS protein expression or activity, decreased NO synthesis secondary to decreased production of the NOS cofactor tetrahydrobiopterin (BH₄), deficiency of L-arginine (the substrate of NOS), accumulation of the endogenous eNOS inhibitor asymmetric dimethylarginine, or inactivation of NO through excessive generation of superoxide (O₂⁻) (11). Only a few studies have investigated the mechanisms involved in endothelial dysfunction in animal models of arthritis. In the model of adjuvant-induced arthritis (AIA), data demonstrated that vessels from AIA rats overproduced superoxide anions (O₂⁻) (12–14) and that BH₄ supplementation decreased endothelial dysfunction (12), suggesting that the deficiency in BH₄ may contribute to the uncoupling of eNOS and subsequent production of O₂⁻. However, treatment with vitamin E used as an antioxidant both improved (15) and decreased (16) endothelial function in AIA rats. To our knowledge, it is currently not known whether a deficit in NO availability accounts for arthritis-associated endothelial dysfunction.

Emerging evidence has suggested increased arginase activity as an etiology for endothelial dysfunction. Arginase (EC 3.5.3.1) is a hydrolytic enzyme responsible for converting L-arginine to L-ornithine and urea. Mammalian arginases exist in 2 distinct isoforms (type I and type II) that have specific subcellular localizations and tissue distributions. The highest activity of arginase is found in liver that contains arginase I. The liver is the only organ containing all the enzymes of the urea cycle, which underscores its important role in ammonia detoxification occurring through this cycle (17). Significant amounts of arginase I and II have been detected in a number of extrahepatic tissues that lack a complete urea cycle, suggesting other functions of arginase in addition to its role in ureagenesis in the liver. These functions include the biosynthesis of ornithine as a precursor of polyamines, biosynthesis of glutamate (precursor of γ -aminobutyric acid) and proline, modulation of NO synthesis, regulation of inflammatory and immunologic responses and wound healing, and regulation of airway smooth muscle relaxation (17).

Both arginase isoforms are expressed by endothelial and vascular smooth muscle cells (18). Because NOS and arginase use L-arginine as a common substrate, arginase may down-regulate NO biosynthesis by competing with NOS for L-arginine degradation. Consistent with this hypothesis, increased vascular arginase activity was reported to contribute to decreased endothelium-dependent NO production in pathologic conditions such as hypertension (19,20), atherosclerosis (21), diabetes (22), and erectile dysfunction (23), or in aging (24). Moreover, even though the regulating factors of argi-

nase expression/activity remain largely unknown, it was demonstrated that various proinflammatory cytokines can act as inducers of arginase expression in cultured endothelial cells (18,25,26).

In this study, we examined whether a dysregulation of the vascular arginase pathway might contribute to endothelial dysfunction in AIA rats. For this purpose, we determined arginase activity as well as expression of the 2 isoforms of arginase in aortas from AIA rats and their controls. Given the close interplay between NO synthases and arginase pathways, eNOS expression was also measured in vessels. Furthermore, we studied the effects of the NOS inhibitor N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) as well as those of the arginase inhibitor N^ω-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA) on the endothelium-dependent relaxation of thoracic aortas from AIA rats and their controls. Finally, we investigated whether a correlation exists between arginase activity/expression and the severity of arthritis.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Ninety-one male Lewis rats were purchased from Janvier. Animals were kept under a 12-hour/12-hour light/dark cycle and allowed free access to food and water. The investigation conformed to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the National Institutes of Health (publication no. 85-23, revised 1996).

Induction and clinical evaluation of the arthritis model. Adjuvant arthritis was induced by a single intradermal injection, at the base of the tail, of 1 mg of heat-killed *Mycobacterium butyricum* suspended in 0.1 ml of mineral oil (Freund's incomplete adjuvant; Difco). With this protocol, rats developed arthritis by day 13 after adjuvant injection. Rats were observed and examined 5 days per week in a blinded manner for clinical signs of arthritis. The scoring system was as follows (27): arthritis of 1 finger = 0.1; weak and moderate arthritis of 1 large joint (ankle or wrist) = 0.5; intense arthritis of 1 large joint = 1. Tarsus and ankle were considered the same joint. The sum of the joint scores of 4 limbs led to a maximum arthritis score of 6 for each rat. The arthritis was graded by using the total score as follows (27): grade 0 = total score 0; grade 1 = total score 0.1–0.9; grade 2 = total score 1–1.9; grade 3 = total score ≥ 2 .

Tissue preparation. Twenty-one days after the onset of arthritis, rats were anesthetized intraperitoneally with pentobarbital (60 mg/kg). Blood was withdrawn from the abdominal artery and immediately centrifuged at 4,000g for 10 minutes, and plasma was stored at -80°C until analysis. Thoracic aortas were removed, cleaned, and either immediately used for vascular reactivity studies or promptly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until being processed.

Arginase activity. Arginase activity was determined in thoracic aorta according to the method of Corraliza et al (28), as previously described in detail (19). Briefly, frozen aortic tissue was pulverized and homogenized in lysis buffer (phos-

phate buffered saline containing 1% sodium dodecyl sulfate, 2 mmoles/liter EDTA, 1 mmole/liter phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin, and 1 µg/ml pepstatin). Samples were then sonicated on ice and centrifuged for 10 minutes at 12,000g at 4°C. The arginase activity was determined from the urea production calculated from a standard curve (urea) and expressed as pmoles urea/minute/mg protein. The protein levels in each sample were quantified by the Lowry method (29).

Western blotting analysis. Aortic expression of arginases and eNOS was determined as previously described (20) by using mouse monoclonal anti-arginase I (BD Transduction Laboratories), rabbit polyclonal anti-arginase II (Santa Cruz Biotechnology), and mouse monoclonal anti-eNOS (Biomol). The band densities were determined by scanning densitometry. The membranes were stripped and probed with a mouse monoclonal anti-β-actin antibody (Santa Cruz Biotechnology). The results were expressed as the optical density (OD) of the band of interest divided by the OD of the β-actin band.

Vascular reactivity. Thoracic aorta was excised, cleaned of connective tissue, and cut into rings of ~2 mm in length. Rings were suspended in Krebs solution (118 mmoles/liter NaCl, 4.65 mmoles/liter KCl, 2.5 mmoles/liter CaCl₂, 1.18 mmoles/liter KH₂PO₄, 24.9 mmoles/liter NaHCO₃, 1.18 mmoles/liter MgSO₄, 12 mmoles/liter glucose, pH 7.4), maintained at 37°C, and continuously aerated with 95% O₂/5% CO₂ for isometric tension recording in organ chambers, as previously described (19). In some rings, endothelium was mechanically removed. The completeness of endothelial denudation was confirmed by the absence of relaxation in response to the endothelium-dependent agonist acetylcholine (ACh; 10⁻⁶

moles/liter). After a 90-minute equilibration period under a resting tension of 2 grams, rings with intact endothelium were constricted with norepinephrine (NE; 3 × 10⁻⁷ moles/liter), and vasorelaxant responses to ACh (10⁻¹¹–10⁻⁴ moles/liter) were determined. Where indicated, rings were previously incubated for 60 minutes with the nonselective competitive NOS inhibitor L-NAME (10⁻⁴ moles/liter), the arginase inhibitor nor-NOHA (10⁻⁴ moles/liter), or both. Endothelium-denuded rings were used to determine the contractile response to NE (10⁻¹¹–10⁻⁴ moles/liter) and the relaxing effect of the NO donor sodium nitroprusside (SNP; 10⁻¹¹–10⁻⁴ moles/liter) after constriction with NE (3 × 10⁻⁷ moles/liter).

Plasma levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNFα). Plasma concentrations of IL-6 and TNFα, 2 peripheral markers of inflammation, were determined by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the instructions of the manufacturers (PromoKine for the IL-6 ELISA kit and Bender MedSystems for the TNFα ELISA kit).

Statistical analysis. Values are presented as the mean ± SEM. The values of maximal relaxation (E_{max} values) were determined by fitting the original dose-response curves using the Sigma Plot program (Systat Software). The curves obtained from aortic rings were compared by two-way analysis of variance. Comparison between 2 values was assessed by Student's unpaired *t*-test. The relationship between 2 parameters was determined by linear regression analysis, and Spearman's correlation coefficient was calculated between these variables. *P* values less than 0.05 were considered significant.

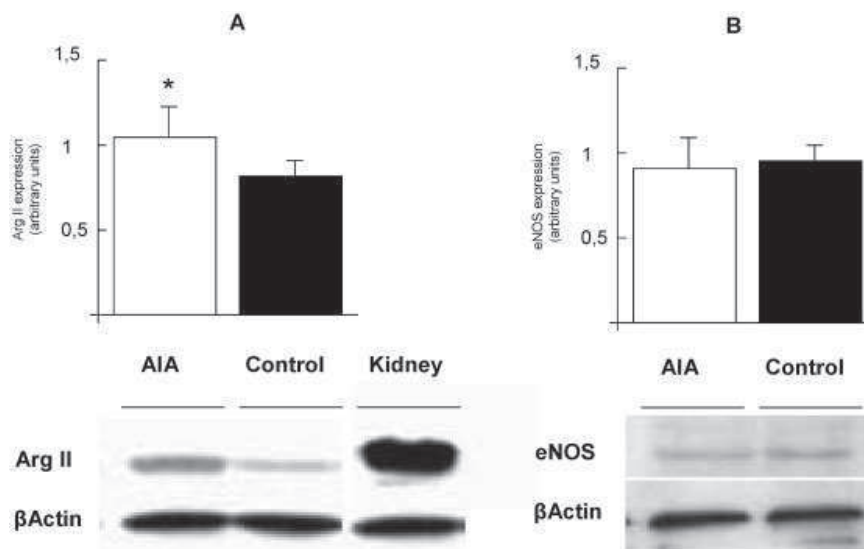


Figure 1. Arginase II (Arg II) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in aortas from rats with adjuvant-induced arthritis (AIA) and from control rats. Total proteins were separated, and Western blotting analysis was performed using polyclonal anti-arginase II (A) and monoclonal anti-eNOS (B) antibodies as described in Materials and Methods. Top, Densitometric analysis of protein levels. Bottom, Representative immunoblots. Rat kidney was used as a positive control for arginase II. Values are the mean ± SEM from 8–23 rats. * = *P* < 0.05 versus control rats.

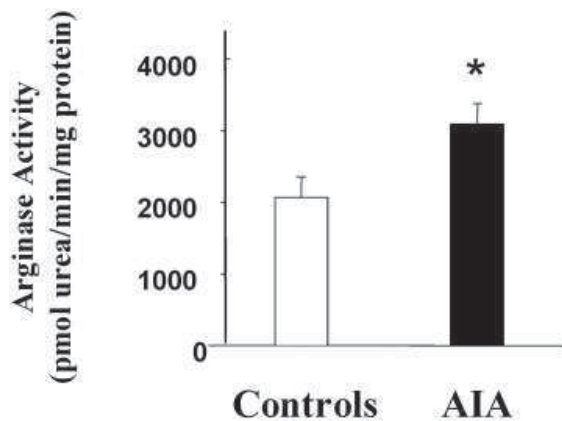


Figure 2. Arginase activity in aortas from rats with adjuvant-induced arthritis (AIA) and from control rats. Arginase activity in aortic tissue was determined from urea production using the spectrophotometric method described by Corraliza et al (28). Values are the mean \pm SEM from 8–17 rats. * = $P < 0.05$ versus control rats.

RESULTS

Clinical findings. The adjuvant-treated rats developed arthritic lesions which gradually increased during the time course of the experiment. The first signs of arthritis appeared on day 13 after the injection of *M butyricum*. Arthritis grades 0, 1, 2, and 3 were observed in 32%, 20%, 22%, and 26% of rats, respectively. At the end of the experimental period, the mean \pm SEM arthritis score was 1.1 ± 0.3 and the body weight of AIA rats was decreased by 8% compared with that of controls ($P < 0.05$) (data not shown).

Increased plasma levels of IL-6 in AIA rats. Twenty-one days after the onset of arthritis, mean \pm SEM IL-6 plasma levels were significantly higher in AIA rats than in control rats (302 ± 28 pg/ml versus 186 ± 36 pg/ml; $P < 0.05$). TNF α was not detectable in plasma in either group (data not shown).

Increased vascular arginase expression and activity in AIA rats. The arginase I isoform was not detectable in aortas from control and AIA rats (not shown). However, the arginase II isoform was expressed in control rats, and its expression was significantly increased in AIA rats (by 22%) ($P < 0.05$) (Figure 1A). The expression of eNOS did not differ between the 2 groups (Figure 1B). Interestingly, as shown in Figure 2, high arginase expression in AIA rats was associated with high arginase activity (a 49% increase compared with that in controls) ($P < 0.05$).

Vascular arginase expression and activity correlate with the severity of arthritis. As shown in Figure 3, a significant positive correlation was found between the arthritis grade and vascular arginase activity ($r = 0.564$, $P = 0.018$) as well as between the arthritis grade and vascular arginase II expression ($r = 0.423$, $P = 0.031$). In contrast, arginase expression did not correlate with plasma levels of IL-6 ($r = 0.055$, $P = 0.798$) (data not shown).

Association of AIA with endothelial dysfunction. As shown in Figure 4A, consistent with the presence of endothelial dysfunction, the relaxation of endothelium-intact aortic rings was significantly decreased in AIA rats compared with controls ($P < 0.05$). Interestingly, endo-

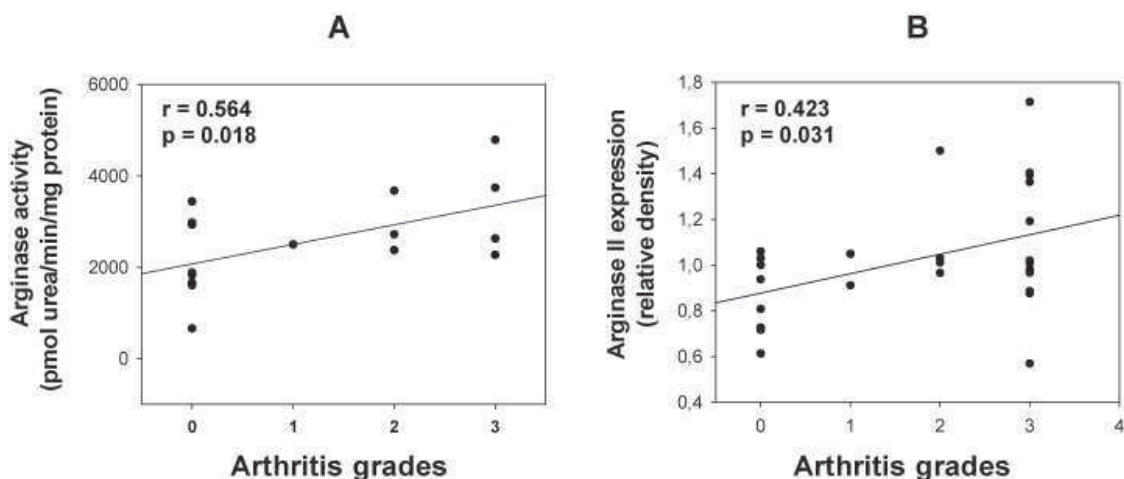


Figure 3. Arginase activity (A) and expression (B) correlate with arthritis grades in rats with adjuvant-induced arthritis. Arginase activity in aortic tissue was determined from urea production using the spectrophotometric method described by Corraliza et al (28). Total proteins were separated, and Western blotting analysis was performed using polyclonal anti-arginase II antibodies as described in Materials and Methods.

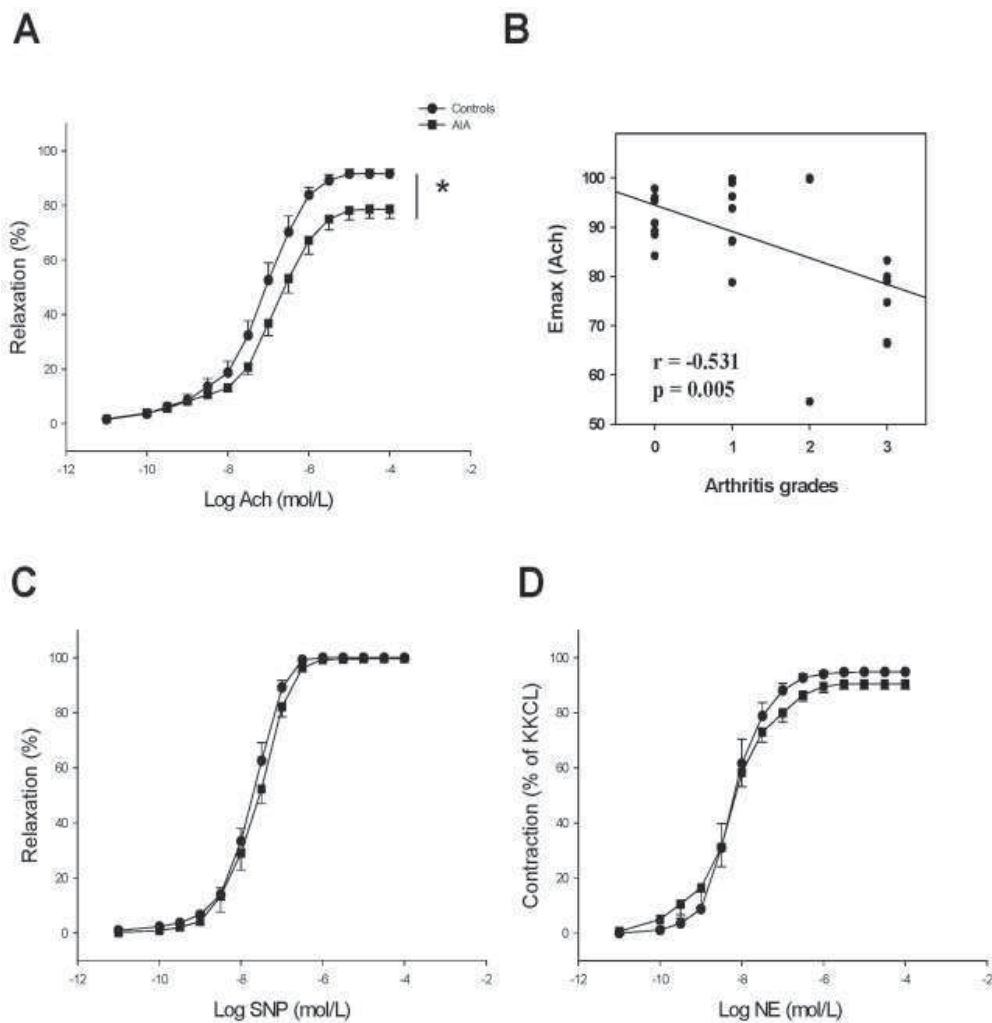


Figure 4. Vascular reactivity to norepinephrine (NE), sodium nitroprusside (SNP), and acetylcholine (ACh) in rats with adjuvant-induced arthritis (AIA) and in control rats. Cumulative concentration curves were obtained in thoracic aortic rings isolated from AIA and control rats 21 days after the onset of arthritis. **A**, Concentration-response curves for ACh in endothelium-intact rings precontracted with NE at 3×10^{-7} moles/liter. **B**, Negative correlation between the values of maximal relaxation (E_{max} values) of ACh and the arthritis grade. **C**, Concentration-response curves for SNP in endothelium-denuded rings precontracted with NE at 3×10^{-7} moles/liter. **D**, Concentration-response curves for NE in endothelium-denuded rings. Values in **A**, **C**, and **D** are the mean \pm SEM from 6–17 aortic rings. * = $P < 0.05$. KKCL = Krebs–potassium chloride solution.

thelial dysfunction correlated positively with the severity of arthritis in AIA rats, as shown by the negative correlation between the E_{max} values of ACh and the arthritis grades ($r = -0.531$, $P = 0.005$) (Figure 4B). To determine whether the response of vascular smooth muscle cells to vasoconstrictors and vasodilators was impaired in AIA rats, endothelium-denuded rings were constricted with NE and relaxed with the NO donor SNP. Neither the SNP-induced vasodilation (Figure 4C)

nor the constrictive response to NE (Figure 4D) differed between AIA rats and controls.

Arginase inhibition improves endothelial function in AIA rats. First, because arginase competes with NOS for their common substrate L-arginine, the role of NO in endothelial dysfunction associated with AIA was investigated in aortic rings incubated with the NOS inhibitor L-NAME. As expected, L-NAME significantly decreased the NO-dependent relaxation induced by

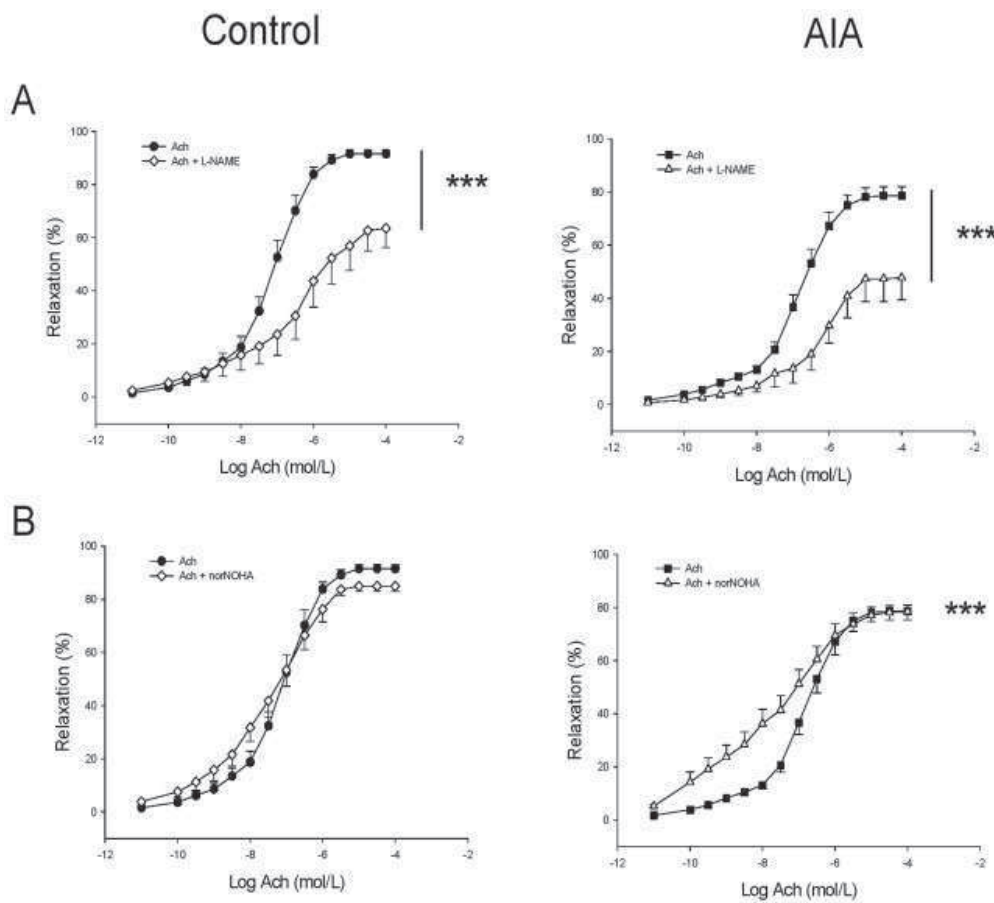


Figure 5. Effect of N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and N^{ω} -hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA) on vasodilation response to acetylcholine (ACh) in rats with adjuvant-induced arthritis (AIA) and in control rats. Cumulative concentration curves were obtained in aortic rings isolated from AIA and control rats 21 days after the onset of arthritis. Cumulative concentration curves with ACh were obtained after a 60-minute incubation period with L-NAME at 10^{-4} moles/liter (A) or with nor-NOHA at 10^{-4} moles/liter (B). Values are the mean \pm SEM from 8–17 aortic rings. *** = $P < 0.001$.

ACh both in controls and in AIA rats (Figure 5A). As a reflection of decreased NOS activity in AIA rats, the effect of L-NAME on the maximal dilation in response to ACh (E_{max}) was less in AIA rats (mean \pm SEM E_{max} reduction $32 \pm 6\%$) than in control rats (mean \pm SEM E_{max} reduction $45 \pm 12\%$) ($P < 0.05$) (data not shown). Second, to determine the contribution of arginase to endothelial dysfunction, aortic rings were incubated with the arginase inhibitor nor-NOHA. As shown in Figure 5B, arginase inhibition significantly increased the vasodilating response to ACh in AIA rats but not in controls. Finally, to assess whether the effect of nor-NOHA in AIA rats was due to increased L-arginine availability for NOS, aortas were incubated with both L-NAME and nor-NOHA. The results showed that nor-NOHA signif-

icantly inhibited the effects of L-NAME on ACh-induced relaxation (Figure 6).

DISCUSSION

We report for the first time that the arginase pathway is up-regulated in vessels from AIA rats and that the increased arginase activity/expression correlates with the severity of arthritis. In addition, we show that high arginase activity contributes to endothelial dysfunction in AIA rats.

Although attenuation of endothelium-dependent NO-mediated relaxation—referred to as endothelial dysfunction—has been demonstrated in RA patients (30) and has been suspected to contribute to excessive

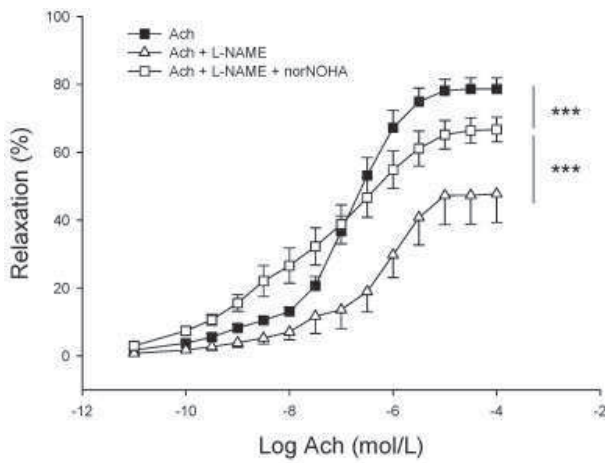


Figure 6. Effect of both L-NAME and nor-NOHA on vasodilation response to ACh in AIA rats. Cumulative concentration curves were obtained in aortic rings isolated from AIA rats 21 days after the onset of arthritis. Cumulative concentration curves with ACh were obtained after a 60-minute incubation period with L-NAME at 10^{-4} moles/liter and after a 60-minute incubation period with L-NAME and nor-NOHA (both at 10^{-4} moles/liter). Values are the mean \pm SEM from 8–17 aortic rings. *** = $P < 0.001$. See Figure 5 for definitions.

cardiovascular mortality, the underlying mechanisms are poorly understood. In addition, data on endothelial dysfunction in experimental models of arthritis are scarce. In the present study, we investigated endothelial function in the AIA model, which is commonly accepted as having many histologic and clinical features in common with human RA (31) and which is widely used to predict clinical efficacy of new therapies in RA (32). In accordance with previous studies (12–16,33–35), our data show that endothelial function assessed by the vasodilating response to ACh is impaired in AIA rats. We also demonstrated that endothelial dysfunction correlates with disease activity. To confirm that the abnormal response of vessels from AIA rats to ACh was not due to decreased response of vascular smooth muscle cells to NO, we demonstrated that the relaxing effect of the NO donor SNP was not impaired in the AIA rats. This result is in accordance with recent study findings in AIA rats (12,14,36) as well as in RA patients (37–40). Likewise, we verified that the contractile response of vessels from AIA rats to NE was not different from that of control rats.

By using the nonselective competitive NOS inhibitor L-NAME, we demonstrated that ACh-induced NOS activity is decreased in AIA rats compared with control rats. To the best of our knowledge, we provide the first demonstration that ACh-induced NO production is impaired in AIA rats. In contrast, the expression of eNOS

did not differ between AIA rats and controls. This result is not in accordance with the data of Haruna et al (12,13), who reported increased eNOS expression in aortas from AIA rats with endothelial dysfunction. However, in their study, neither the activity of NOS nor the functional impact of L-NAME was investigated, and it was not determined whether the eNOS overexpression was associated with increased eNOS activity. In our study, this discrepancy between activity and expression of eNOS is of particular interest, because it strongly suggests that the decrease in NOS activity is due to decreased availability of the cofactor and/or of the substrate of the enzyme (i.e., L-arginine).

In recent years, a growing number of studies have focused interest on arginase as a regulator of L-arginine-dependent pathways within the vessel. Arginase uses L-arginine (the substrate of NOS) as substrate and can thereby limit the availability of L-arginine for NO synthesis. Consistent with this theory are the studies demonstrating that arginase inhibition enhanced NO-mediated vasodilatory function under pathologic conditions such as aging, hypertension, diabetes, and atherosclerosis (19–24). Therefore, inhibition of vascular arginase activity might represent a new pharmacologic strategy for increasing availability of arginine for NO synthesis in conditions associated with endothelial dysfunction. Our results demonstrate for the first time that arginase activity as well as expression of arginase II are increased in vessels from AIA rats. Moreover, we found that the greater the severity of arthritis, the greater the increase in arginase expression and activity.

Although there is little information on regulatory mechanisms of arginase gene expression or activity in endothelial cells under disease conditions, two hypotheses might be formulated to explain increased arginase activity/expression in AIA. First, arginase up-regulation might rely on systemic inflammation and increased proinflammatory cytokines. Indeed, previous data demonstrated that arginase expression in cultured endothelial cells can be regulated by various proinflammatory cytokines or by lipopolysaccharide (41–43). In our study, in accordance with a systemic state of inflammation in AIA rats 21 days after the onset of arthritis, plasma levels of IL-6 increased by 62% in AIA rats compared with controls. However, the lack of correlation between IL-6 and arginase expression makes it unlikely that IL-6 is a direct inducer of arginase overexpression in AIA rats. This result is concordant with those of a recent clinical study conducted in hemodialysis patients with coronary heart disease, in which the high plasma arginase levels failed to correlate with plasma levels of IL-6 (44). Second, recent in vitro data suggested the involve-

ment of reactive oxygen species and NO produced by inducible NOS (iNOS) in arginase up-regulation (22,45–47). Since aortas from AIA rats were reported to overproduce O_2^- (12,13) and to exhibit increased iNOS expression (36), the contribution of these species cannot be excluded.

To determine whether increased arginase activity contributes to endothelial dysfunction, vessels were incubated with nor-NOHA, a potent, selective, and competitive arginase inhibitor (48). We found that nor-NOHA improved the vasodilating response of aortas to ACh in AIA rats. Moreover, the arginase inhibitor inhibited the effect of the competitive NOS inhibitor L-NAME on vasodilation. In contrast, nor-NOHA had no effect on ACh-induced relaxation in control rats. These findings indicate that increased arginase contributes to endothelial dysfunction, probably by limiting the L-arginine availability for NOS, as previously observed in animal models of cardiovascular diseases (19–22,24). It is noteworthy that beyond its effect on vascular NO production, decreased L-arginine availability secondary to arginase up-regulation might theoretically contribute to the eNOS uncoupling recently identified in vessels of AIA rats (12). Vascular eNOS uncoupling is secondary to deficiency in the substrate L-arginine or in the cofactor BH_4 . Consistent with a link between high arginase activity and eNOS uncoupling are the recent data showing that the treatment of aging rats with an arginase inhibitor reduced O_2^- production and preserved the eNOS dimer:monomer ratio in aortas (47). It remains to be determined whether such a beneficial effect of arginase inhibition occurs in AIA rats.

Interestingly, our data may help in the understanding of the recent results obtained by Haruna et al (12) in AIA rats. In their study, in which production of O_2^- was measured in aortic homogenates, the authors showed that incubation of homogenates with L-arginine did not decrease but rather, paradoxically, increased O_2^- production in AIA rats. Given the previous report that under the condition of a low NOS:arginase molar ratio the activity of arginase exceeds that of NOS (49), our new findings of increased aortic arginase activity led us to hypothesize that in the case of L-arginine supplementation, L-arginine metabolism might be shifted to arginase rather than to eNOS. Further experiments will be needed to validate this hypothesis.

In conclusion, our results have documented for the first time the vascular up-regulation of the arginase pathway in rat AIA as well as the efficiency of arginase inhibition for improving endothelial dysfunction in vitro. Because a better understanding of the pathophysiology of endothelial dysfunction is relevant for determining

optimal primary cardiovascular prevention strategies, these data provide a rational basis for investigating the potential of arginase inhibition as a new strategy for treating endothelial dysfunction in arthritis. Further studies are warranted to understand the mechanisms involved in arginase up-regulation and to investigate whether systemic administration of an arginase inhibitor might be an effective therapy for improving vascular function and reducing cardiovascular risk in arthritis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Demougeot had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Prati, Berthelot, Wendling, Demougeot.
Acquisition of data. Prati, Demougeot.

Analysis and interpretation of data. Prati, Berthelot, Wendling, Demougeot.

REFERENCES

1. Ciftci O, Yilmaz S, Topcu S, Caliskan M, Gullu H, Erdogan D, et al. Impaired coronary microvascular function and increased intima-media thickness in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2008;198:332–7.
2. Van Halm VP, Peters MJ, Voskuyl AE, Boers M, Lems WF, Visser M, et al. Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease: a cross-sectional study, the CARRE Investigation. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1395–400.
3. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, et al. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:481–94.
4. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Miranda-Fillojo JA, Garcia-Porrúa C, Llorca J, Martín J. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother* 2006;60:673–77.
5. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–26.
6. Victor VM, Rocha M, Sola E, Banuls C, Garcia-Malpartida K, Hernandez-Mijares A. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 2009;15:2988–3002.
7. Gonzalez MA, Selwyn AP. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am J Med* 2003;115 Suppl 8A:99–106S.
8. Ku IA, Imboden JB, Hsue PY, Ganz P. Rheumatoid arthritis: model of systemic inflammation driving atherosclerosis. *Circ J* 2009;73:977–85.
9. Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep* 2003;5:473–80.
10. Tain YL. Endothelial dysfunction links cardiovascular disease to pediatric chronic kidney disease: the role of nitric oxide deficiency. *Acta Paediatr Taiwan* 2007;48:246–50.
11. Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Munzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1115–26.
12. Haruna Y, Morita Y, Komai N, Yada T, Sakuta T, Tomita N, et al. Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis: vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase and uncoupled endothelial nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 2006;54:1847–55.
13. Haruna Y, Morita Y, Yada T, Satoh M, Fox DA, Kashihara N. Fluvastatin reverses endothelial dysfunction and increased vascu-

- lar oxidative stress in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:1827–35.
14. Sakuta T, Morita Y, Satoh M, Fox DA, Kashihara N. Involvement of the renin-angiotensin system in the development of vascular damage in a rat model of arthritis: effect of angiotensin receptor blockers. *Arthritis Rheum* 2010;62:1319–28.
 15. Can C, Cinar M, Kosay S, Evinc A. Vascular endothelial dysfunction associated with elevated serum homocysteine levels in rat adjuvant arthritis: effect of vitamin E administration. *Life Sci* 2002;71:401–10.
 16. Cinar MG, Can C, Ulker S, Gok S, Coker C, Soykan N, et al. Effect of vitamin E on vascular responses of thoracic aorta in rat experimental arthritis. *Gen Pharmacol* 1998;31:149–53.
 17. Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1996;114:107–32.
 18. Buga GM, Singh R, Pervin S, Rogers NE, Schmitz DA, Jenkinson CP, et al. Arginase activity in endothelial cells: inhibition by N_G-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *Am J Physiol* 1996;271:1988–98.
 19. Demougeot C, Prigent-Tessier A, Marie C, Berthelot A. Arginase inhibition reduced endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2005;23:971–8.
 20. Demougeot C, Prigent-Tessier A, Bagnost T, Andre C, Guillaume Y, Bouhaddi M, et al. Time course of vascular arginase expression and activity in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2007;80:1128–34.
 21. Yang Z, Ming XF. Endothelial arginase: a new target in atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep* 2006;8:54–9.
 22. Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, El-Remessy AB, Bartoli M, et al. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res* 2008;102:95–102.
 23. Bivalacqua TJ, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ, Champion HC. Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:923–7.
 24. Katusic ZS. Mechanisms of endothelial dysfunction induced by aging: role of arginase I. *Circ Res* 2007;101:640–1.
 25. Chicoine LG, Paffett ML, Young TL, Nelin LD. Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L60–8.
 26. Nelin LD, Chicoine LG, Reber KM, English BK, Young TL, Liu Y. Cytokine-induced endothelial arginase expression is dependent on epidermal growth factor receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:394–401.
 27. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 2003;426:454–60.
 28. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 1994;174:231–35.
 29. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
 30. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Martin J, Llorca J. Endothelial dysfunction, carotid intima-media thickness, and accelerated atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2008;38:67–70.
 31. Brahn E. Animal models of rheumatoid arthritis: clues to etiology and treatment. *Clin Orthop Relat Res* 1991;265:42–53.
 32. Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1505–15.
 33. Fang ZY, Fontaine J, Unger P, Berkenboom G. Alterations of the endothelial function of isolated aortae in rats with adjuvant arthritis. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1991;311:122–30.
 34. Egan C, Lockhart J, Ferrell W. Pathophysiology of vascular dysfunction in a rat model of chronic joint inflammation. *J Physiol* 2004;557:635–43.
 35. Ulker S, Onal A, Hatip FB, Surucu A, Alkanat M, Kosay S, et al. Effect of nabumetone treatment on vascular responses of the thoracic aorta in rat experimental arthritis. *Pharmacology* 2000;60:136–42.
 36. Nozaki K, Goto H, Nakagawa T, Hikiami H, Koizumi K, Shibahara N, et al. Effects of keishibukuryogan on vascular function in adjuvant-induced arthritis rats. *Biol Pharm Bull* 2007;30:1042–7.
 37. Maki-Petaja KM, Cheriyan J, Booth AD, Hall FC, Brown J, Wallace SM, et al. Inducible nitric oxide synthase activity is increased in patients with rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction. *Int J Cardiol* 2008;129:399–405.
 38. Syngle A, Vohra K, Kaur L, Sharma S. Effect of spironolactone on endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2009;38:15–22.
 39. Kerekes G, Szekanez Z, Der H, Sandor Z, Lakos G, Muszbek L, et al. Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: a multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity. *J Rheumatol* 2008;35:398–406.
 40. Bilsborough W, Keen H, Taylor A, O'Driscoll GJ, Arnolda L, Green DJ. Anti-tumour necrosis factor- α therapy over conventional therapy improves endothelial function in adults with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2006;26:1125–31.
 41. Gao X, Xu X, Belmadani S, Park Y, Tang Z, Feldman AM, et al. TNF- α contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1269–75.
 42. Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE₂) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;206:667–73.
 43. Louis CA, Mody V, Henry WL Jr, Reichner JS, Albina JE. Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages. *Am J Physiol* 1999;276:237–42.
 44. Eleftheriadis T, Liakopoulos V, Antoniadi G, Stefanidis I, Galaktidou G. Arginase type I as a marker of coronary heart disease in hemodialysis patients. *Int Urol Nephrol* 2010. E-pub ahead of print.
 45. Matthiesen S, Lindemann D, Warnken M, Juergens UR, Racke K. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin inhibits lipopolysaccharide (LPS) induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *Eur J Pharmacol* 2008;579:403–10.
 46. Kim JH, Bugaj LJ, Oh YJ, Bivalacqua TJ, Ryoo S, Soucy KG, et al. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *J Appl Physiol* 2009;107:1249–57.
 47. Santhanam L, Lim HK, Lim HK, Miriel V, Brown T, Patel M, et al. Inducible NO synthase-dependent S-nitrosylation and activation of arginase 1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Circ Res* 2007;101:692–702.
 48. Huynh NN, Harris EE, Chin-Dusting JF, Andrews KL. The vascular effects of different arginase inhibitors in rat isolated aorta and mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 2009;156:84–93.
 49. Santhanam L, Christianson DW, Nyhan D, Berkowitz DE. Arginase and vascular aging. *J Appl Physiol* 2008;105:1632–42.

***B. Deuxième étude : Le traitement par l'inhibiteur d'arginase
Nw-hydroxy-nor-L-arginine restaure la fonction endothéliale
dans le modèle d'arthrite induite à adjuvant.***

**Treatment with the arginase inhibitor Nw-hydroxy-nor-L-arginine restores endothelial
function in rat adjuvant-induced arthritis.**

Clément Prati, Alain Berthelot, Bernadette Kantelip, Daniel Wendling, Céline Demougeot.

Arthritis Research and Therapy, 14: R130 (2012)

1. Introduction et objectifs de l'étude

Dans l'étude précédente, nous avons tout d'abord confirmé les données de la littérature attestant de l'existence d'une DE dans le modèle d'AIA, du moins lorsque la fonction endothéliale est évaluée 3 semaines après les premiers symptômes de l'arthrite. Nos résultats qui révèlent une corrélation positive entre la sévérité de l'arthrite et le niveau d'activité et d'expression de l'arginase, et qui montrent l'effet bénéfique de l'incubation des vaisseaux avec un inhibiteur d'arginase, sont en faveur d'un rôle important de cette enzyme dans la physiopathologie de la DE associée à l'arthrite. Afin de confirmer son rôle et de déterminer si les inhibiteurs d'arginase pourraient constituer un traitement spécifique de cette anomalie en cas de PR, nous avons étudié les effets de l'administration chronique – *in vivo* cette fois-ci – de l'inhibiteur d'arginase utilisé précédemment, la nor-NOHA. Les études précédentes du Laboratoire avec la nor-NOHA (210-211) ainsi que celles d'autres équipes utilisant des inhibiteurs d'arginase par voie ip ou orale (cf tableau 10 p94) ont démontré : 1) l'absence de toxicité apparente de l'inhibition de l'arginase chez l'animal, 2) l'efficacité d'un tel traitement sur la DE associée à l'HTA (210), l'âge (205) ou l'athérosclérose (225). Afin de comprendre par quels mécanismes un inhibiteur d'arginase peut améliorer la dysfonction endothéliale, nous avons exploré de façon plus approfondie que dans l'étude précédente les différentes voies métaboliques endothéliales potentiellement altérées en cas d'arthrite. En effet, les données de la littérature révélaient un rôle controversé du stress oxydant (178-180) et des cyclo-oxygénases (176), et aucune étude n'avait étudié le rôle de l'EDHF, des dérivés métaboliques des COX, ou encore des médiateurs vasoconstricteurs d'origine endothéliale.

Dans la mesure où nos données précédentes ont montré que la DE ainsi que les anomalies de l'arginase sont proportionnelles à la sévérité de l'arthrite, une diminution de sévérité de la maladie devrait en théorie conduire à une réduction de la DE. Par conséquent, nous avons également étudié dans cette étude l'impact du traitement par la nor-NOHA sur la sévérité de l'arthrite (mesurée par le score clinique), sur l'atteinte articulaire (mesurée par radiographie et histologie) et sur l'inflammation systémique (mesurée par le dosage des cytokines plasmatiques). En effet, quelques études ont identifié l'existence d'anomalies de l'arginase au niveau articulaire, avec des résultats controversés. Une étude rapporte une réduction de l'activité arginase dans le liquide synovial des patients atteints de PR (215), alors qu'une autre étude a montré au contraire une augmentation de l'activité arginase (212). Le rôle physiopathologique de l'arginase dans l'atteinte articulaire reste donc inconnu, mais

l'existence d'un effet des inhibiteurs d'arginase sur la progression de l'arthrite ne peut pas être exclue.

2. Méthodologie

Les expériences ont été conduites sur le modèle d'AIA chez des rats Lewis mâles âgés de 6 semaines au moment de l'injection du *M. Butyricum* dans l'adjuvant de Freund. Les premiers symptômes articulaires apparaissent 10 à 12 jours après cette injection et le sacrifice a été réalisé 3 semaines après l'apparition d'arthrite. Des rats non arthritiques de même âge ont servi de contrôles.

Les animaux ont été traités par la N ω -hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA), inhibiteur des 2 isoformes d'arginase, administré quotidiennement par voie i.p. à la dose de 40mg/kg/j, dès l'apparition des premiers signes d'arthrite, pendant 3 semaines. Deux groupes témoins recevaient dans le même temps du sérum physiologique, un groupe AIA et un groupe non arthritique.

Quotidiennement, les rats des 3 groupes ont été pesés, ils ont été examinés cliniquement afin d'établir un score arthritique quotidien selon la cotation du tableau 9. Le diamètre des chevilles a été également mesuré tous les jours.

Les taux plasmatiques d'IL6, IL-1 β , VEGF et de TNF α ont été mesurés par kit ELISA sur des prélèvements effectués au moment du sacrifice, soit 3 semaines après le début des symptômes articulaires.

La réactivité vasculaire a été étudiée trois semaines après le début des signes cliniques d'arthrite, sur des artères thoraciques qui ont été nettoyées, et coupées en anneaux de 2 à 3 mm de largeur. Chaque anneau aortique est disposé entre une tige fixe, et une tige mobile reliée à un capteur de tension (en g), au sein d'une cuve à organe isolé contenant une solution physiologique. Afin de déterminer l'existence d'une dysfonction endothéliale, les anneaux sont contractés à la NA ($3 \cdot 10^{-7}$ M) puis relaxés par des concentrations croissantes d'Ach (10^{-11} - 10^{-4} M), après incubation 30 minutes avec un inhibiteur de NOS, la N-nitro-L-arginine-méthyl-ester (L-NAME, 10^{-4} M), d'inhibiteur spécifique de l'iNOS (1400W, 10^{-5} M), d'inhibiteur des canaux potassiques calcium-dépendants (apamine, 10^{-7} M et charybdotoxine, 10^{-7} M), d'inhibiteur non sélectif des COX (indométacine, 10^{-5} M), d'inhibiteur sélectif des

COX 2 (NS398, 10^{-5} M), d'inhibiteur de la prostacycline synthase (tranylcypromine, 10^{-5} M), d'inhibiteur de la thromboxane synthase (furegrelate, 10^{-6} M), et d'inhibiteur de la NADPH oxydase (apocynine, $3 \cdot 10^{-4}$ M), d'un analogue de la superoxyde dismutase (SOD) (tempol 10^{-4} M).

Des radiographies ont été effectuées sur les chevilles et tarses des rats des 3 groupes et un score radiographique d'atteinte articulaire a été calculé.

Des analyses ont été effectuées sur les chevilles et tarses des rats des 3 groupes et un score histologique d'atteinte articulaire a été calculé.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Treatment with the arginase inhibitor N_w-hydroxy-nor-L-arginine restores endothelial function in rat adjuvant-induced arthritis

Clément Prati^{1,2*}, Alain Berthelot¹, Bernadette Kantelip³, Daniel Wendling^{2,4} and Céline Demougeot¹

Abstract

Introduction: Endothelial dysfunction (ED) participates to atherogenesis associated to rheumatoid arthritis. We recently reported increased arginase activity/expression in vessels from adjuvant-induced arthritis (AIA) rats. In the present study, we investigated the effects of a curative treatment with the arginase inhibitor N_w-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA) on vascular dysfunction in AIA rats.

Methods: AIA rats were treated with nor-NOHA (40 mg/kg/d, ip) for 21 days after the onset of arthritis. A group of untreated AIA rats and a group of healthy rats served as controls. ED was assessed by the vasodilatory effect of acetylcholine (ACh) on aortic rings. The role of superoxide anions, prostanoids, endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) and nitric oxide synthase (NOS) pathway was studied. Plasma levels of IL-6 and vascular endothelial growth factor (VEGF) were determined by ELISA kits. Arthritis severity was estimated by a clinical, radiological and histological analysis.

Results: Nor-NOHA treatment fully restored the aortic response to ACh to that of healthy controls. The results showed that this beneficial effect is mediated by an increase in NOS activity and EDHF and reduced superoxide anion production as well as a decrease in the activity of cyclooxygenase (COX)-2, thromboxane and prostacyclins synthases. In addition, nor-NOHA decreased IL-6 and VEGF plasma levels in AIA rats. By contrast, the treatment did not modify arthritis severity in AIA rats.

Conclusions: The treatment with an arginase inhibitor has a potent effect on ED in AIA independently of the severity of the disease. Our results suggest that this new pharmacological approach has the potential as a novel add-on therapy in the treatment of RA.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic inflammatory disease characterized by articular and extra-articular manifestations involving cardiovascular diseases, which accounts for 30 to 50% of all deaths [1]. Recent studies showed that atherosclerosis lesions occur earlier and have a more rapid evolution in RA patients than in the general population [1]. Endothelial dysfunction is thought to be a key event in the development of atherosclerosis and has been identified in patients with RA, even in the early diagnosed arthritis [1]. It is generally defined as impaired endothelium-dependent

vasodilation to specific stimuli and characterized by an imbalance between vasoconstriction and vasodilation factors. Although the improvement of endothelial function is recognized as an important element of the global management of RA patients [2], the precise pathophysiological mechanisms of endothelial dysfunction in RA are still poorly understood.

Consistent with the findings in humans, a few studies reported impaired endothelial function in the model of adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats. In this model, endothelial dysfunction positively correlates with disease activity [3]. However, data concerning the pathophysiological features of endothelial dysfunction are scarce. Previous studies reported that vessels from AIA rats exhibited a deficiency in tetrahydrobiopterin (BH₄), the co-factor of nitric oxide synthase (NOS) [4] and

* Correspondence: praticlement@gmail.com

¹EA 4267 Fonctions et Dysfonctions épithéliales, University of Franche Comté, 19 rue Ambroise Paré, 25030 Besançon, France
Full list of author information is available at the end of the article

overproduced superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) [4-6]. Surprisingly, whether there is an impairment of the production of endothelium-derived vasodilator factors, such as nitric oxide (NO), prostacyclin (PGI_2) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) or of contractile factors such as angiotensin-II (ANG-II), endothelin-1 (ET-1) and thromboxane A_2 (TXA_2) is not known. Recently, we identified the vascular arginase upregulation as a new interesting mechanism contributing to endothelial dysfunction in AIA rats [3].

Arginase (EC 3.5.3.1) is a hydrolytic enzyme responsible for converting L-arginine to L-ornithine and urea. Mammalian arginases exist in two distinct isoforms (type I and type II), which have specific subcellular localizations and tissues distribution. Notably, both arginase isoforms are expressed by endothelial and vascular smooth muscle cells [7]. Because NOS and arginase use L-arginine as a common substrate, arginase may down-regulate NO biosynthesis by competing with NOS for L-arginine degradation. Consistent with this hypothesis, increased vascular arginase activity was reported in various animal models of cardiovascular diseases [8,9] and a few studies demonstrated the benefits of a chronic treatment with an arginase inhibitor for treating endothelial dysfunction associated to hypertension [3,10,11], diabetes [12], atherosclerosis [13] or ageing [14]. These pharmacological data have been partly confirmed by the data obtained from the mouse strains with genetic ablation of arginase expression. Although mice lacking arginase I ($Arg\ I^{-/-}$) die in the perinatal period as a consequence of a non-functional urea cycle [15], mice with homologous deletion of arginase II expression ($Arg\ II^{-/-}$) are viable, have high plasma levels of arginine and exhibit an enhanced vasorelaxation to acetylcholine [16]. In the AIA model, we found that increased arginase activity/expression correlated with arthritis severity [3]. Moreover, our data suggested, at least *in vitro*, that the upregulation of arginase contributes to endothelial dysfunction likely by limiting the L-arginine availability for NOS [3]. However, whether the treatment with an arginase inhibitor may constitute a good strategy for RA-associated endothelial dysfunction is not known.

Besides the vasculature, a few studies investigated the occurrence of arginase pathway abnormalities at the articular level in RA and have yielded controversial results. One study reported decreased arginase activity in the synovial fluid of RA patients [17], whereas other studies demonstrated increased arginase activity and expression in the synovial fluid [18] as well as in plasma [19]. Again, the pathophysiological role of arginase at the articular level is still unknown, and whether arginase inhibition might modify the severity of the disease has never been investigated.

The aim of the present study was to determine the effects of a curative treatment with N_w -hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA), a selective arginase inhibitor, in AIA rats. The effect of nor-NOHA on vascular reactivity to vasodilating and vasoconstrictive drugs was evaluated on aortic rings, with special emphasis on the mechanisms involved in endothelial dysfunction. Additionally, we assessed the impact of the treatment on clinical, radiological and histological articular parameters as well as on peripheral markers of inflammation and endothelial function.

Materials and methods

Induction of AIA, clinical evaluation and treatment

A total of 48 male Lewis rats were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Animals were kept under a 12 h:12 h light:dark cycle and allowed free access to food and water. The investigation conforms with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animal published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996) and was approved by our local animal ethics committee.

Adjuvant arthritis was induced by a single intradermal injection at the base of the tail of 1 mg of heat-killed *Mycobacterium butyricum* (Difco, Detroit, MI, USA) suspended in 0.1 ml of mineral oil (Freund's incomplete adjuvant (Difco)). The animals developed arthritis between Day 10 and Day 15. At the first symptoms of arthritis, arthritic rats were randomly divided into two groups: untreated AIA rats ($n = 20$) and nor-NOHA-treated AIA rats ($n = 20$). Nor-NOHA (Bachem, France) was dissolved in saline and administered once a day (40 mg/kg, ip) for 21 consecutive days. This inhibitor was chosen because it is a potent selective arginase inhibitor without interfering with NOS activity [20] or L-arginine uptake [21]. Nor-NOHA inhibited arginase activity in aorta with an IC_{50} of less than 1 μM , that is, similar to its effects on liver arginase ($IC_{50} = 0.5 \mu M$). We previously demonstrated that the dose of 40 mg/kg/day was well-tolerated and led to reduction of arginase I activity (liver isoform, -41%) and arginase II activity (kidney isoform, -40%) [11], without any modification of plasma urea levels [10]. Untreated AIA received an equal volume of saline daily. With this protocol, the treatment was performed during the secondary chronic phase of AIA, that is, during the development of severe disease and during the phase at which systemic inflammatory markers are high [22-24]. A group of untreated non-arthritic age-matched rats was used as controls ($n = 8$).

Rats were weighed and monitored seven days per week in a blinded fashion for clinical signs of arthritis. The scoring system was employed as follows [25]: arthritis of one finger scores 0.1, weak and moderate arthritis of one big joint (ankle or wrist) scores 0.5 and

intense arthritis of one big joint scores 1. Tarsus and ankle was considered as the same joint. Sum of joints scores of four limbs leads to an arthritic score of maximum 6 to each rat. The ankle diameter was measured with a digital caliper (Vernier Stainless, Guangxi, China).

Tissue preparation

Twenty-one days after the onset of arthritis, rats were anaesthetized with pentobarbital (60 mg/kg, ip). Blood was withdrawn from the abdominal aorta, immediately centrifuged at 4,000 g for 10 minutes, and plasma was stored at -80°C until analysis. Thoracic aortas were removed, cleaned and immediately used for vascular reactivity studies. Ankles were removed and placed in 4% formalin.

Vascular reactivity

Arthritis was induced in five rats per week so that the onset of arthritis was shifted by one week for the different groups. For one given rat, studies were performed on both endothelium intact and endothelium denuded rings, five days a week. For the experiments without incubation of an inhibitor, the same ring was used for different experiments. With this protocol, the study of aortic vasodilator response was conducted over a 10-week period. The thoracic aorta was excised, cleaned of connective tissue and cut into rings of approximately 2 mm in length. Rings were suspended in Krebs solution (NaCl 118 mmol/liter, KCl 4.65 mmol/liter, CaCl₂ 2.5 mmol/liter, KH₂PO₄ 1.18 mmol/liter, NaHCO₃ 24.9 mmol/liter, MgSO₄ 1.18 mmol/liter, glucose 12 mmol/liter, pH 7.4), maintained at 37°C and continuously aerated with 95% O₂, 5% CO₂, for isometric tension recording in organ chambers, as previously described [26]. In some rings, endothelium was mechanically removed. The completeness of endothelial denudation was confirmed by the absence of relaxation to the endothelium-dependent agonist acetylcholine (ACh, 10⁻⁶ moles/liter). After a 90-minute-equilibration period under a resting tension of 2 g, rings with intact endothelium were constricted with norepinephrine (NE, 3. 10⁻⁷ moles/liter) and endothelium-dependent relaxation was assessed with ACh (10⁻¹¹-10⁻⁴ moles/liter). To dissect the mechanisms of endothelial dysfunction, rings were incubated for 30 minutes respectively with the non-selective NO synthase inhibitor N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10⁻⁴ moles/liter), the selective inhibitor of inducible NOS (1400 W, 10⁻⁵ moles/liter), the Ca²⁺-dependent K⁺ channels inhibitors apamin (10⁻⁷ moles/liter) and charybdotoxin (10⁻⁷ moles/liter), the non-selective COX inhibitor indometacin (10⁻⁵ moles/liter), the selective COX-2 inhibitor (NS398, 10⁻⁵ moles/liter), the prostacyclin (PGI₂) synthase inhibitor tranylcypromine (10⁻⁵ moles/liter), the thromboxane

(TX) synthase inhibitor furegrelate (10⁻⁶ moles/liter), the superoxide dismutase mimetic (SOD) Tempol (10⁻⁴ moles/liter) and with the add of “respectively” above we must let “and” the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase inhibitor apocynin (3. 10⁻⁴ moles/liter). To determine the sensitivity of vascular smooth muscle cells to physiological vasoconstrictive factors, endothelium-denuded rings were constricted with NE (10⁻¹¹-10⁻⁴ moles/liter), ET-1 (10⁻¹⁰-10⁻⁶ moles/liter) or ANG-II (10⁻¹⁰-10⁻⁶ moles/liter). Finally, we evaluated the endothelium-independent relaxation to the NO donor sodium nitroprussiate (SNP, 10⁻¹¹-10⁻⁴ moles/liter) after constriction with NE 3. 10⁻⁷ moles/liter.

Plasma IL-6, IL-1β, TNFα and VEGF levels

Plasma levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β) and tumor necrosis factor-alpha (TNFα), three peripheral markers of inflammation and plasma concentration of the vascular endothelial growth factor (VEGF), a peripheral marker of endothelial dysfunction in many cardiovascular diseases [27,28], were determined by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturer's instructions (Bender MedSystems, Vienna, Austria). The limits of detection of ELISA kits provided by the manufacturer for TNF α, IL-6, IL-1β and VEGF were 11.2 pg/mL, 12 pg/mL, 4 pg/mL and 27 pg/mL, respectively.

Radiographical *ex vivo* analysis of joints of ankle and foot

The high resolution digital X-rays (25 kV, 10 mA) of hind paws of rats in three groups were performed with a Nova Siemens Mammomat 3000 (Erlangen, Germany) the city is Erlangen at Day 21 after the onset of inflammatory joint signs. A score of 0 to 3 was determined for each paw, according to Du *et al.* [29]. This score takes into account the swelling of soft parts, the thickness of the joint space, bone destruction and the neoformation of periosteal tissue, as follows: 0 = normal, 1 = soft tissue swelling only, 2 = soft tissue swelling and early erosions and 3 = severe erosions, the maximum score for each rat being 6.

Histological analysis

Ankles were decalcified and embedded in paraffin and sections of 6 μm were performed and stained with hematoxylin-eosin and safranin (HES). The histological features of cartilage, bone and periarticular soft tissue were evaluated in a blind fashion by using the score of Kinne *et al.* [30]. According to this score, the degree of inflammatory infiltration is scored from 0 to 3 where 0 = no infiltration, 1 = slight infiltration, 2 = moderate infiltration and 3 = severe infiltration. The degree of bone and cartilage destruction is scored from 0 to 4,

where 0 = no erosion of cartilage or bone, 1 = unequivocal erosion \leq 10% of cartilage or bone trabeculae, 2 = erosions \leq 50% 3 = erosions from 50 to 90% and 4 = erosions $>$ 90%. The maximum score per rat is 7.

Data and statistical analysis

Values are presented as the mean \pm SEM. The values of maximal relaxation (Emax values) were determined by fitting the original dose-response curves using the Sigma Plot program (Systat Software, Chicago, IL USA). The curves obtained from aortic rings were compared by two-way analysis of variance. Comparison between groups was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. The analysis of the relationship between two parameters was determined by linear regression analysis and Spearman's correlation coefficient was calculated between these variables. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Arthritis severity was unaffected by nor-NOHA treatment

Body weights, ankle diameters and arthritis scores are shown in Table 1. Compared to control rats, AIA rats exhibited a significantly reduced body weight and a higher ankle diameter. The nor-NOHA treatment did not affect body weight, ankle diameter or arthritic score in AIA rats. Nor-NOHA did not modify the time-course of arthritic scores and did not delay the occurrence of arthritis symptoms, as presented in more details in Additional file 1. The radiological and histological analysis of AIA rats showed bone and cartilage erosions with joint space narrowing, inflammatory synovitis and inflammatory infiltration of the soft parts that were unaffected by nor-NOHA (Figure 1). Accordingly, the

Table 1 Clinical, histological and radiological scores and plasma levels of IL-6 and VEGF

	control rats (n = 8)	AIA rats (n = 20)	nor-NOHA treated rats (n = 20)
Body weight (g)	310 \pm 3	279 \pm 10*	269 \pm 5*
Arthritis score	0	1.3 \pm 0.2*	1.1 \pm 0.2*
Ankle diameter (mm)	7.6 \pm 0.1	8.3 \pm 0.2*	8.3 \pm 0.1*
Histological score	0	4.1 \pm	3.7 \pm 1*
Radiological score	0	2.2 \pm	2.1 \pm 0.6*
IL-6 (pg/ml)	366 \pm 22	419 \pm 17*	378 \pm 22
VEGF (pg/ml)	488 \pm 36	642 \pm 34*	500 \pm 65

Data were obtained 21 days after the onset of arthritis in control rats, AIA rats and nor-NOHA treated rats. Values are the mean \pm SEM. * = $P < 0.05$ vs control

histological and radiological scores of nor-NOHA-treated AIA rats were not different from those of untreated AIA rats (Table 1).

Nor-NOHA treatment decreased IL-6 and VEGF plasma levels in AIA rats

TNF α and IL-1 β were not detectable in plasma whatever the group of rats (data not shown). IL-6 and VEGF plasma levels were significantly higher in AIA rats as compared to control rats ($P < 0.05$, Table 1). Nor-NOHA significantly prevented the increase in IL-6 and VEGF levels in AIA rats. A significant positive correlation was found between VEGF and endothelial dysfunction as attested by the negative correlation identified between the Emax of Ach and the plasma VEGF levels ($r = -0.536$, $P = 0.007$). Additional file 2 shows this in more detail. By contrast, IL-6 levels did not correlate with Emax of Ach ($r = 0.001$, $P = 0.959$, data not shown).

Nor-NOHA treatment improved vascular function in AIA rats

To confirm the presence of endothelial dysfunction in AIA rats, we first investigated the vasodilatory response of endothelium-intact rings to Ach. As shown in Figure 2A, as a reflection of endothelial dysfunction, the relaxant effect of Ach was significantly reduced in AIA rats compared to control rats. Importantly, nor-NOHA treatment totally reversed the impairment of Ach-induced relaxation in AIA rats (Figure 2A). By contrast, no difference in SNP-induced vasorelaxation was observed among control rats, untreated AIA and nor-NOHA-treated AIA rats (Figure 2B), thus confirming the normality of the response of VSMC to exogenous NO, as previously reported [3]. To determine whether aortic rings from AIA rats exhibited an altered response to physiologically-relevant vasoconstrictors, the effect of NE, ANG-II and ET-1 was evaluated. As shown in Figures 2C-E, the vasoconstrictive responses to NE, ANG-II and ET-1 were not different between the three groups of rats. Overall results indicate that the impaired Ach-induced vasorelaxation observed in AIA rats strictly resulted from an impairment of endothelial production of relaxant factors.

To determine the mechanisms involved in the beneficial effects of nor-NOHA treatment on endothelial function, we first investigated the contribution of the NOS and EDHF pathways in Ach-induced vasorelaxation in control and AIA rats. As shown in Figure 3, as a reflection of a NOS-activation after Ach challenge, L-NAME, a non-selective NOS inhibitor, significantly reduced the Ach-dependent relaxation in all experimental groups (Figure 3A-C). However, the decrease in the Emax of Ach was greater in controls and nor-NOHA-treated

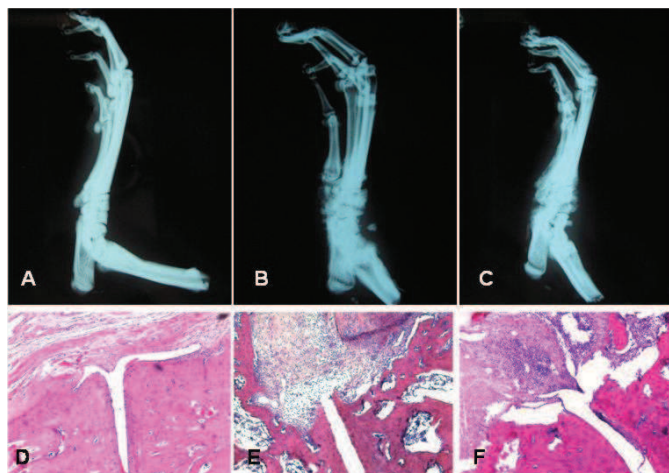


Figure 1 Radiographs and histological aspect of hind limbs at Day 21 after the onset of arthritis. Experiments were performed in controls rats (A, D), AIA rats (B, E) and nor-NOHA treated rats (C, F). On radiographs, both AIA and treated AIA rats exhibited a thickening of the soft tissues of the ankle and foot as well as a joint destruction and periosteal tissue neoformation. Histological slices were stained with HES (enlargement $\times 20$). A severe joint destruction associated to synovial proliferation was present in AIA and treated AIA rats.

AIA rats ($-45 \pm 12\%$ and $-50 \pm 6\%$, respectively) compared to untreated AIA group ($-32 \pm 6\%$). This result demonstrated that NOS activation is blunted in the case of arthritis and restored after nor-NOHA treatment.

Conversely, the selective inducible NOS inhibitor 1400 W did not affect the response to Ach, whatever the group (data not shown). Because the role of EDHF is of critical importance for endothelial function, when NO production is compromised [31], we investigated the

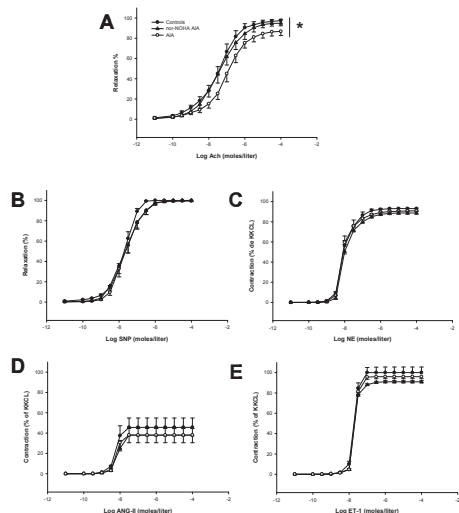


Figure 2 Vascular reactivity to vasodilators and vasoconstrictive agents. Experiments were performed on thoracic aortic rings from control rats, AIA rats and nor-NOHA AIA rats 21 days after the onset of arthritis. **A**, Concentration - response curve for Ach in endothelium-intact rings precontracted with NE 3×10^{-7} moles/liter. **B**, Concentration - response curve for SNP in endothelium-denuded rings precontracted with NE 3×10^{-7} moles/liter. **C**, Concentration - response curve for NE in endothelium-denuded rings, **D**, Concentration - response curve for ANG-II in endothelium-denuded rings, **E**, Concentration - response curve for ET-1 in endothelium-denuded rings. Values are the mean \pm SEM from 8 to 12 rings. * = $P < 0.05$. KCl = Krebs potassium chloride solution.

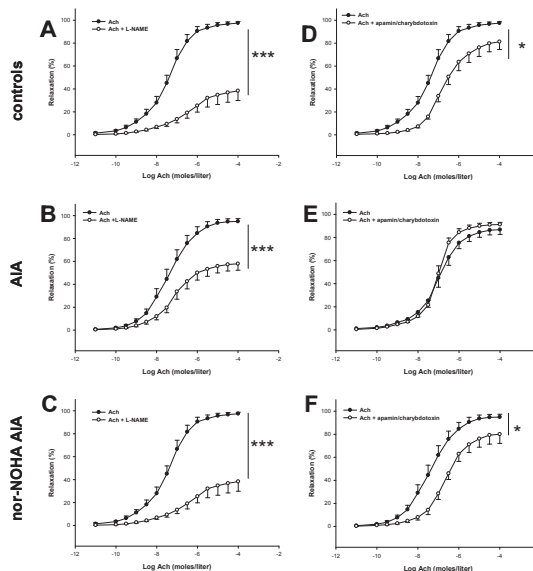


Figure 3 Effect of L-NAME and the combination of apamin/charybdotoxin on vasodilation response to Ach. Experiments were performed on aortic rings isolated from control rats (A, D), AIA rats (B, E) and nor-NOHA AIA rats (C, F) 21 days after the onset of arthritis. Cumulative concentration-responses curves with Ach were obtained after a 60-minute incubation period with L-NAME at 10^{-4} moles/liter (A, B, C) or with apamin-charybdotoxin at 10^{-7} moles/liter each (D, E, F). Values are the mean \pm SEM from 8 to 12 rings. * = $P < 0.05$, *** = $P < 0.001$.

effect of nor-NOHA on EDHF production by incubating the rings with apamin and charybdotoxin. In favor of decreased EDHF production in arthritis, the combination of apamin/charybdotoxin significantly decreased the effect of Ach in control rats (Figure 3D) but not in AIA rats (Figure 3E) suggesting that the EDHF-mediated compensatory vasodilator system is lacking in arthritis. Nor-NOHA fully restored the EDHF component of Ach-induced relaxation in AIA rats (Figure 3F). To determine the role of prostanoids in endothelial dysfunction in AIA, aortic rings were first incubated with the non-selective COX inhibitor indometacin. While indometacin did not modify the relaxation to Ach in the control group (Figure 4A), it significantly improved vasodilation in untreated AIA rats (Figure 4B), indicating a deleterious role of COX activation in arthritis-induced endothelial dysfunction. More precisely, as a reflection of a deleterious role of the overactivation of COX-2, TX synthase and PGI₂ synthase in endothelial dysfunction, the same patterns were observed after incubation with NS398 (Figure 4A), furegrelate and tranylcypromine, respectively, in controls (Figure 4B) and in AIA rats (Figure 4C, D). The treatment with nor-NOHA

normalized the effect of these prostanoids inhibitors to that of control rats (Figures 4E, F).

To assess whether the beneficial effects of nor-NOHA were linked to a decrease in O₂⁻ production in the aorta, rings were incubated with the SOD mimetic Tempol and with the NADPH oxidase inhibitor apocynin. Although neither Tempol nor apocynin altered relaxation to Ach in control group (Figure 5A, B), they significantly improved vasodilation in untreated AIA rats (Figure 5C, D), thus indicating that overproduction of O₂⁻ as well as overactivation of NADPH oxidase contribute to endothelial dysfunction in arthritis, as previously demonstrated [4]. After treatment with nor-NOHA, the Ach-induced relaxation remained unaffected by both compounds suggesting a normalization of O₂⁻ production and NADPH oxidase activity (Figure 5E, F).

Discussion

Regarding how important is the prevention of cardiovascular events in RA, the understanding of the mechanisms associated to endothelial dysfunction, as well as the identification of new relevant treatments are of particular importance. The present study investigated for the first time the effect of a curative treatment with an arginase inhibitor (nor-NOHA) on vascular function of AIA rats. Our results demonstrated that this treatment improves endothelial function via an increase in NOS

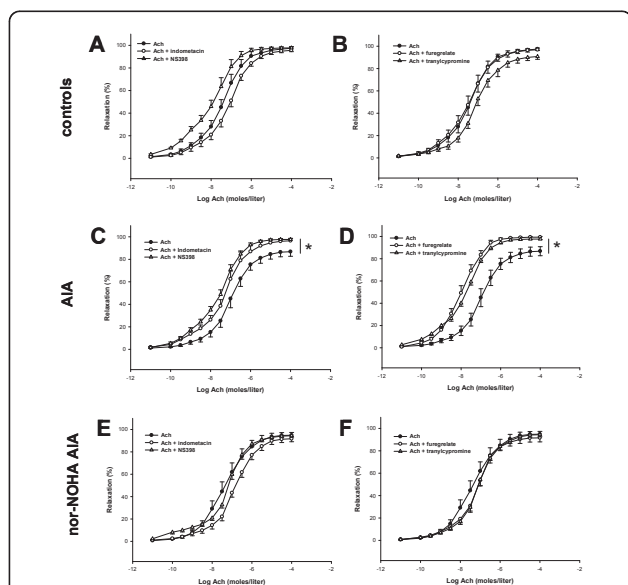


Figure 4 Effect of indometacin, NS398, furegrelate and tranylcypromin on vasodilation response to Ach. Cumulative concentration curves were obtained in aortic rings isolated from AIA, nor-NOHA AIA and control rats 21 days after the onset of arthritis. Cumulative concentration curves with Ach were obtained after a 60-minute incubation period with indometacin at 10⁻⁵ moles/liter or with NS398 at 10⁻⁴ moles/liter in controls (A), AIA (C) and nor-NOHA AIA (E) or with furegrelate at 10⁻⁶ moles/liter or with tranylcypromine at 10⁻⁵ moles/liter in controls (B), AIA (D) and nor-NOHA AIA (F). Values are the mean ± SEM from 8 to 12 aortic rings. * = P < 0.05.

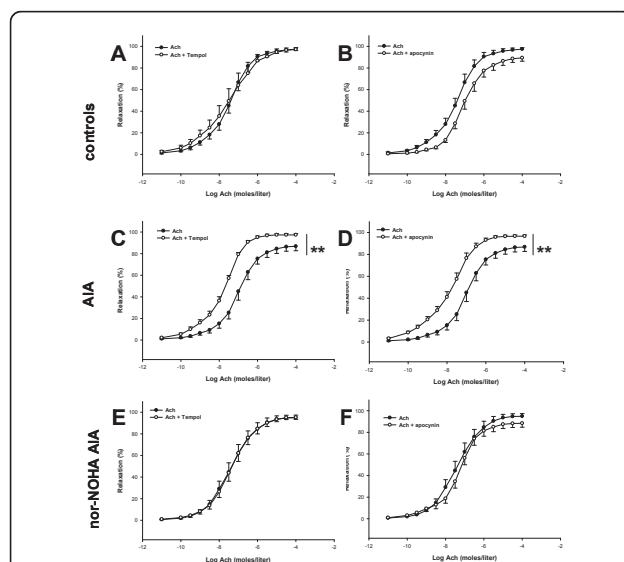


Figure 5 Effect of Tempol and apocynin on vasodilation response to Ach. Experiments were performed on aortic rings isolated from control rats (A, B), AIA rats (C, D) and nor-NOHA AIA rats (E, F) 21 days after the onset of arthritis. Cumulative concentration-responses curves with Ach were obtained after a 60-minute incubation period with Tempol at 10⁻⁴ moles/liter (A, C, E) or with apocynin at 3 × 10⁻⁴ moles/liter (B, D, F). Values are the mean ± SEM from 8 to 12 rings. ** = P < 0.01.

activity and EDHF production, a decrease in COX-2, TX synthase and PGI₂ synthase activities as well as a decrease in O₂⁻ production. However, our data did not argue for a role of arginase in the chronic phase of inflammatory joint damages in the AIA model.

In accordance with previous studies [3-5,32-34], our data showed impaired endothelial function in AIA rats. To ascertain that the abnormal response of vessels from AIA rats to Ach was not due to decreased response of vascular smooth muscle cells (VSMCs) to NO, we demonstrated that the relaxing effect of the NO donor SNP is not impaired in AIA rats, in agreement with recent studies in rats [4,6,35] as well as in RA patients [36-38]. Likewise, to eliminate the contribution of an abnormal response of VSMCs to endothelium-derived vasoconstrictive mediators, we demonstrated that the effects of NE, ANG-II and ET-1 are unaltered in AIA rats. To understand the mechanisms involved in the effects of nor-NOHA, and because arginase and endothelial NOS share the same substrate L-arginine, aortic rings were first incubated with the non-selective NOS inhibitor L-NAME. Our data showed that the treatment with nor-NOHA significantly restored the decreased NOS activity observed in AIA rats. This result argues for the contribution of increased vascular arginase activity to NO deficiency in AIA rats, and demonstrated that *in vivo* arginase inhibition restores the equilibrium between NOS and arginase pathways, as previously identified in animal models of cardiovascular diseases, such as hypertension [10,11], atherosclerosis [13] or ageing [14]. Another new finding is the lack of effect of the selective iNOS inhibitor 1400 W on endothelial dysfunction in AIA. Data on vascular iNOS expression in AIA are controversial since the expression was found to be unchanged [4] or increased [35]. Our data showing the lack of effect of 1400 W on Ach-induced vasodilation, whatever the group of rats, did not argue for a contribution of the iNOS pathway in the impaired endothelial function associated to RA. This result contrasts with that of a study conducted in a small cohort of RA patients suggesting a deleterious role of increased vascular iNOS expression in vascular dysfunction [36]. However, in this study, the iNOS inhibitor used was aminoguanidine, which has a wide range of pharmacological actions besides iNOS inhibition including antioxidant effects [39], and it cannot be excluded that this latter property accounted for its vascular effect. Collectively, these data emphasize the need for further studies to define the role of iNOS in RA-associated endothelial dysfunction.

The COX pathway plays an important role in endothelial function. COX-1 is expressed constitutively and is usually abundant in all animal and human endothelial cells, whereas endothelial COX-2 is induced

mainly during inflammatory response [40]. Physiologically, COX synthesizes both vasorelaxant prostanoids, such as PGI₂ and vasoconstrictive prostanoids, such as TXA₂. On the basis of the effects observed for indomethacin and the preferential COX-2 inhibitor NS-398, the present study demonstrates for the first time that COX-2 activation contributes to endothelial dysfunction in aorta of AIA rats. Our result is consistent with the results of a recent study showing that vascular COX-2 expression was overexpressed in rabbits with both chronic AIA and atherosclerosis [41]. Although the contribution of COX-2 and TX synthase overactivation to endothelial dysfunction has been already demonstrated in animal models of cardiovascular diseases [40], the negative role of PGI₂ is more surprising. In fact, our results confirm the janus face of PGI₂ and suggest that, as described in spontaneously hypertensive rats (SHR) [42], PGI₂ can induce vasoconstriction in AIA rats. Importantly, nor-NOHA treatment totally normalized the COX-pathway dysfunction in AIA rats. These data are in accordance with a previous study conducted in SHR in which nor-NOHA treatment was able to improve the COX-dependent component of Ach by decreasing vascular COX-2 expression [11].

Despite the ongoing debate of the molecular identity and signalling pathways, the contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor(s) (EDHFs) to the endothelium-dependent relaxation is also considered as an important feature of normal endothelium function [31]. EDHF has been demonstrated unequivocally in various blood vessels from different species, including human [43]. The acronym 'EDHF' is applied to a factor inducing vascular relaxation in the presence of COX plus NOS inhibitors and which is inhibited by charybdotoxin + apamin but unaffected by iberiotoxin + apamin. Animal studies have identified several mediators that might act as EDHF, such as K⁺, cytochrome P450 metabolites, lipoxygenase products, NO itself, H₂O₂, cyclic adenosine monophosphate, C-type natriuretic peptide and electrical coupling through myoendothelial gap junctions [43,44]. Whatever the mediator, EDHF induces a potassium-mediated event associated to a reduction in intracellular K⁺ in vascular smooth muscle [45]. Experimental evidence indicates that EDHF action is of critical importance for endothelial function when NO production is compromised [31]. Our data showed for the first time that EDHF production is impaired in AIA rats, suggesting that the EDHF-mediated compensatory dilator system is lacking in RA. Of interest, our data reported that arginase inhibition restored the EDHF contribution to that of control rats. Because of the existence of a cross-talk between NO and EDHF pathways [31], it can be hypothesized that the improvement of NO production by nor-NOHA contributes to the

recovery of EDHF production in AIA treated rats. However, albeit non-elucidated, a direct effect of nor-NOHA on EDHF production cannot be excluded.

Previous reports suggested that the overproduction of O_2^- contributes to endothelial dysfunction in AIA rats [4,5]. Consistent with these findings, the present study demonstrates the improvement of ACh-induced vasorelaxation with a SOD mimetic. In the AIA model, previous data reported that statins [5] as well as ANG-II receptor antagonists [6] were able to decrease aortic O_2^- overproduction. In the present study, we provide evidence that this beneficial effect can also be obtained with an arginase inhibitor. It is worth noting that recent reports reported that statins inhibit arginase activity [46,47] and that blockade of ANG-II AT1 receptors prevents the ANG II-induced elevation of arginase activity and expression [48]. Although speculative, we hypothesize that arginase could be the downstream common effector of these two types of drugs. Because the deficiency of L-arginine causes a NOS uncoupling leading to O_2^- production [40], the beneficial effect of arginase inhibition on O_2^- production might be due to the decrease in vascular eNOS uncoupling, as recently demonstrated in the vasculature of aged rats treated with the arginase inhibitor 2S-amino-6-boronoheptanoic acid [49]. Additionally, since COX-2 was found to contribute to O_2^- production [40], the nor-NOHA-induced decrease in COX-2 activity might also contribute to this effect. Moreover, our results confirmed the deleterious impact of increased NADPH oxidase activity to endothelial function in AIA [4] and demonstrated that nor-NOHA reverses this phenomenon. Whether arginase inhibition can directly reduce NADPH oxidase activity/expression is currently unknown but a recent study showing that NADPH oxidase inhibition reduced arginase upregulation in retinal cells [50] suggests an interplay between the two enzymes.

Although there is now ample evidence that RA is associated with endothelial dysfunction [1], several issues remain unresolved concerning the potential contribution of disease activity and classical cardiovascular risk factors. In addition, whether endothelial dysfunction occurs before the onset of RA or is a consequence of the disease is still a matter of debate. The presence of endothelial dysfunction in the very early stages of RA was recently demonstrated and was not explained by differences in disease activity and inflammatory markers [51]. Conversely, no impairment of endothelial function was observed in patients with < 7 years' disease duration whereas longer disease duration (> 14 years) was associated with severe endothelial dysfunction [52]. Others showed that endothelial dysfunction reflects enhanced inflammatory disease activity [38,53]. Moreover, on the observation that elevated inflammatory molecules are

associated with increased risk of cardiovascular diseases in the general population, it has been speculated that RA-related inflammation might contribute to endothelial dysfunction [1]. However, as emphasized in a recent review [1], there is surprisingly no direct evidence supporting such an association between systemic inflammation and vascular dysfunction in RA patients. Therefore, two hypotheses might be formulated to explain how a treatment can improve endothelial function in RA. First, the benefits might be secondary to decreased systemic and/or vascular inflammation and disease activity. Second, the treatment may act directly on endothelial homeostasis independently of inflammation or disease activity. In our study, we showed that nor-NOHA treatment did not modify disease severity assessed by clinical, histological and radiological parameters, whereas it fully reversed endothelial dysfunction in AIA rats. These results demonstrate that the reduction of endothelial dysfunction is possible even though articular parameters are not improved and that endothelial dysfunction is not the consequence of the disease, at least in the chronic phase of the AIA model. These data are in keeping with a recent report showing that an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor improved endothelial dysfunction without any change in disease activity in RA patients [54]. In this study, treatment with ramipril markedly improved endothelial function, although it modestly reduced circulating cytokines, indicating that other mechanisms than the reduction of vascular inflammation are likely involved in the beneficial effects of the ACE inhibitor. Likewise, our data showing that plasma IL-6 levels did not correlate with endothelial dysfunction strongly suggest that the benefits provided by nor-NOHA are related to the direct modulation of endothelium-derived vasorelaxant pathways rather than an anti-inflammatory effect. In addition, our data also suggest that arginase is not upregulated at the articular level and/or not involved in the evolution of the disease between the Day 13 and the Day 34 post-immunization, that is, during the chronic phase of AIA. These data are in agreement with a recent study conducted on arthritic mice showing that arginase gene expression in synovial tissue increased during acute inflammation but not during chronic inflammation [55]. Further studies will be necessary to explore the role of arginase at the articular level in RA.

With the aim to identify clinically relevant peripheral markers of endothelial dysfunction in RA, we measured plasma VEGF levels in control and AIA rats. Although increased VEGF level is considered as a marker of endothelial dysfunction in hypercholesterolemia, atherosclerosis or hypertension [28], whether VEGF is a marker of endothelial dysfunction in RA is not known. Previous studies conducted in RA patients reported

elevated VEGF levels in serum, which were related to angiogenesis of synovial pannus but not with endothelial dysfunction [56]. In the present study, we showed that VEGF levels are increased in AIA rats, and that nor-NOHA treatment decreased VEGF levels, whereas arthritis severity was unchanged. Importantly, we identified the existence of a negative correlation between VEGF levels and endothelial function, suggesting for the first time that high plasma VEGF levels might reflect endothelial dysfunction in RA. The mechanisms explaining the decrease in VEGF levels after arginase inhibition were not determined in the present study but might rely on decreased IL-6 production since VEGF synthesis is IL-6 dependent [57].

Conclusions

In conclusion, the present study on AIA rats gives important new data for the management of endothelial dysfunction in RA. First, it identifies decreased EDHF production and increased COX-2 activity as new pathophysiological mechanisms of endothelial dysfunction besides decreased NOS activity and $O_2^{\cdot-}$ overproduction, thus providing new potential targets for the treatment of this cardiovascular risk factor in RA. Second, it demonstrates that the treatment with an arginase inhibitor is a promising and efficient approach for reversing endothelial dysfunction in RA, as originally suggested in animal models of "traditional" cardiovascular diseases [58]. Although these data obtained in AIA rats have to be confirmed by clinical studies, our data strongly suggest that arginase inhibition has the potential as a novel add-on therapy in the treatment of RA.

Additional material

Additional file 1: Time-course of clinical arthritic score in AIA and nor-NOHA-treated AIA rats. AIA rats were monitored seven days per week in a blinded fashion for clinical signs of arthritis. Day 0 = day of injection with *Mycobacterium butyricum*. The nor-NOHA treatment was started with the first clinical signs of arthritis. $n = 20$ rats per group. NS, Non-significant.

Additional file 2: Regression analysis between plasma VEGF and endothelial dysfunction. A significant positive correlation was found between plasma VEGF levels and endothelial dysfunction as attested by the negative correlation identified between the E_{max} of Ach and the plasma VEGF levels of control, AIA and nor-NOHA-treated AIA rats ($n = 8$ rats per group).

Abbreviations

ACE: angiotensin-converting enzyme; Ach: acetylcholine; AIA: arthritis induced adjuvant; ANG-II: angiotensin-II; ANOVA: one-way analysis of variance; BH4: tetrahydrobiopterin; COX: cyclooxygenase; ED: endothelial dysfunction; EDHF: endothelium-derived hyperpolarizing factor; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; E_{max} values: The values of maximal relaxation; eNOS: endothelial Nitric Oxide Synthase; ET-1: endothelin-1; HES: hematoxylin-eosin and safranin; IL: interleukin; iNOS: induced Nitric Oxide Synthase; L-NAME: N^G -nitro-L-arginine methyl ester; MB: *Mycobacterium*

butyricum; NADPH: the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NE: norepinephrine; NO: nitric oxide; nor-NOHA: N^G -hydroxy-nor-L-arginine; NOS: nitric oxide synthase; $O_2^{\cdot-}$: superoxide anions; PGI_2 : prostacyclin; RA: rheumatoid arthritis; SEM: standard error of the mean; SHR: spontaneously hypertensive rats; SNP: sodium nitroprussiate SOD: superoxide dismutase mimetic; TNF α : tumor necrosis factor α ; TXA_2 : thromboxane A_2 ; VEGF: vascular endothelial growth factor; VSMCs: vascular smooth muscle cells

Acknowledgements

We thank all the staff of the laboratories of physiology and pathology, and the Franc-Comtoise Association of Training, Research, and Teaching in Rheumatology

Author details

¹EA 4267 Fonctions et Dysfonctions épithéliales, University of Franche Comté, 19 rue Ambroise Paré, 25030 Besançon, France. ²Department of Rheumatology, University Hospital Jean Minjoz, 3 bd Fleming, 25000 Besançon, France. ³Department of Pathologic Anatomy, University Hospital Jean Minjoz, 3 bd Fleming, 25000 Besançon, France. ⁴EA 4266 Agents pathogènes et inflammation, University of Franche Comté, 2 place St Jacques, 2503 Besançon, France.

Authors' contributions

CP conceived of the study, and participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. He also carried out histology, radiology, vascular function analysis, treatment of animals and ELISA kits. AB conceived of the study, participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. BK carried out the histology analysis and helped to draft the manuscript. DW conceived of the study, participated in the design of the study and coordination, and helped to draft the manuscript. CD conceived of the study, and participated in its design and coordination, helped to draft the manuscript and performed the statistical analysis. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 17 November 2011 Revised: 30 January 2012

Accepted: 30 May 2012 Published: 30 May 2012

References

1. Sandoo A, Veldhuijzen van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD: **Vascular function and morphology in rheumatoid arthritis: a systematic review.** *Rheumatology (Oxford)* 2011, **50**:2125-2139.
2. Södergren A, Karp K, Boman K, Eriksson C, Lundström E, Smedby T, Söderlund L, Rantapää-Dahlqvist S, Wällberg-Jonsson S: **Atherosclerosis in early rheumatoid arthritis: very early endothelial activation and rapid progression of intima media thickness.** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**:R158.
3. Prati C, Berthelot A, Wendling D, Demougeot C: **Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis: up-regulation of the vascular arginase pathway.** *Arthritis Rheum* 2011, **63**:2309-2317.
4. Haruna Y, Morita Y, Komai N, Yada T, Sakuta T, Tomita N, Fox DA, Kashiwara N: **Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis: vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase and uncoupled endothelial nitric oxide synthase.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:1847-1855.
5. Haruna Y, Morita Y, Yada T, Satoh M, Fox D, Kashiwara N: **Fluvastatin reverses endothelial dysfunction and increased vascular oxidative stress in rat adjuvant-induced arthritis.** *Arthritis Rheum* 2007, **56**:1827-1835.
6. Sakuta T, Morita Y, Satoh M, Fox D, Kashiwara N: **Involvement of the renin-angiotensin system in the development of vascular damage in a rat model of arthritis: effect of angiotensin receptor blockers.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**:1319-1328.
7. Buga GM, Singh R, Pervin S, Rogers NE, Schmitz DA, Jenkinson CP, Cederbaum SD, Ignarro LJ: **Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production.** *Am J Physiol* 1996, **271**:1988-1998.
8. Santhanam L, Christianson DW, Nyhan D, Berkowitz DE: **Arginase and vascular aging.** *J Appl Physiol* 2008, **105**:1632-1642.
9. Michell DL, Andrews KL, Chin-Dusting JP: **Endothelial dysfunction in hypertension: the role of arginase.** *Front Biosci (Schol Ed)* 2011, **3**:946-960.

10. Bagnost T, Berthelot A, Bouhaddi M, Laurant P, André C, Guillaume Y, Demougeot C: **Treatment with the arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine improves vascular function and lowers blood pressure in adult spontaneously hypertensive rat.** *J Hypertens* 2008, **26**:1110-1118.
11. Bagnost T, Ma L, Da Silva RF, Rezakhanliha R, Houdayer C, Stergiopoulos N, André C, Guillaume Y, Berthelot A, Demougeot C: **Cardiovascular effects of arginase inhibition in spontaneously hypertensive rats with fully developed hypertension.** *Cardiovasc Res* 2010, **87**:569-577.
12. Grönros J, Jung C, Lundberg JO, Cerrato R, Ostenson CG, Pernow J: **Arginase inhibition restores in vivo coronary microvascular function in type 2 diabetic rats.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011, **300**:H1174-1181.
13. Yang Z, Ming XF: **Endothelial arginase: a new target in atherosclerosis.** *Curr Hypertens Rep* 2006, **8**:54-59.
14. Katusic ZS: **Mechanisms of endothelial dysfunction induced by aging: role of arginase I.** *Circ Res* 2007, **101**:640-641.
15. Iyer RK, Yoo PK, Kern RM, Rozenfurt N, Tsoa R, O'Brien WE, Yu H, Grody WW, Cederbaum SD: **Mouse model for human arginase deficiency.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:4491-4498.
16. Lim HK, Lim HK, Ryoo S, Benjo A, Shuleri K, Miriel V, Baraban E, Camara A, Soucy K, Nyhan D, Shoukas A, Berkowitz DE: **Mitochondrial arginase II constrains endothelial NOS-3 activity.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, **293**:H3317-3324.
17. Sarban S, Isikan UE, Kocabay Y, Kocuyigit A: **Relationship between synovial fluid and plasma manganese, arginase, and nitric oxide in patients with rheumatoid arthritis.** *Biol Trace Elem Res* 2007, **115**:97-106.
18. Corraliza I, Moncada S: **Increased expression of arginase II in patients with different forms of arthritis. Implications of the regulation of nitric oxide.** *J Rheumatol* 2002, **29**:2261-2265.
19. Huang LW, Chang KL, Chen CJ, Liu HW: **Arginase levels are increased in patients with rheumatoid arthritis.** *Kaohsiung J Med Sci* 2001, **17**:358-363.
20. Tenu JP, Lepoivre M, Moali C, Brollo M, Mansuy D, Boucher JL: **Effects of the new arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine on NO synthase activity in murine macrophages.** *Nitric Oxide* 1999, **3**:427-438.
21. Topal G, Brunet A, Walch L, Boucher JL, David-Dufilho M: **Mitochondrial arginase II modulates nitric-oxide synthesis through nonfreely exchangeable L-arginine pools in human endothelial cells.** *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **318**:1368-1374.
22. Theisen-Popp P, Müller-Peddinghaus R: **Antirheumatic drug profiles evaluated in the adjuvant arthritis of rats by multiparameter analysis.** *Agents Actions* 1994, **42**:50-55.
23. Carter JL, Lubahn C, Lorton D, Osredkar T, Der TC, Schaller J, Evelsizer S, Flowers S, Ruff N, Reese B, Bellingier DL: **Adjuvant-induced arthritis induces c-Fos chronically in neurons in the hippocampus.** *J Neuroimmunol* 2011, **230**:85-94.
24. Cai X, Wong YF, Zhou H, Xie Y, Liu ZQ, Jiang ZH, Bian ZX, Xu HX, Liu L: **The comparative study of Sprague-Dawley and Lewis rats in adjuvant-induced arthritis.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006, **373**:140-147.
25. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihama T, Matsutani T, Negishi I, Nakatsuru S, Sakaguchi S: **Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice.** *Nature* 2003, **426**:454-460.
26. Demougeot C, Prigent-Tessier A, Marie C, Berthelot A: **Arginase inhibition reduced endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats.** *J Hypertens* 2005, **23**:971-978.
27. Felmeden DC, Bland AD, Lip GY: **Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease.** *Eur Heart J* 2003, **24**:586-603.
28. Tsai WC, Li YH, Huang YY, Lin CC, Chao TH, Chen JH: **Plasma vascular endothelial growth factor as a marker for early vascular damage in hypertension.** *Clin Sci (Lond)* 2005, **109**:39-43.
29. Du F, Lü LJ, Fu Q, Dai M, Teng JL, Fan W, Chen SL, Ye P, Shen N, Huang XF, Qian J, Bao CD: **T-614, a novel immunomodulator, attenuates joint inflammation and articular damage in collagen-induced arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10**:R136.
30. Kinne RW, Schmidt-Weber CB, Hoppe R, Buchner E, Palombo-Kinne E, Nürnberg E, Emmrich F: **Long-term amelioration of rat adjuvant arthritis following systemic elimination of macrophages by clodronate-containing liposomes.** *Arthritis Rheum* 1995, **8**:1777-1790.
31. Fang ZY, Fontaine J, Unger P, Berkenboom G: **Alterations of the endothelial function of isolated aortae in rats with adjuvant arthritis.** *Arch Int Pharmacodyn* 1991, **311**:122-130.
32. Ozkor MA, Quyyumi AA: **Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function.** *Cardiol Res Pract* 2011, **2011**:156146.
33. Egan C, Lockhart J, Ferrell W: **Pathophysiology of vascular dysfunction in a rat model of chronic joint inflammation.** *J Physiol* 2004, **557**:635-643.
34. Ulker S, Onal A, Hatip FB, Surucu A, Alkanat M, Kosay S, Evinç A: **Effect of nabumetone treatment on vascular responses of the thoracic aorta in rat experimental arthritis.** *Pharmacology* 2000, **60**:136-142.
35. Nozaki K, Goto H, Nakagawa T, Hikiyama H, Koizumi K, Shibahara N, Shimada Y: **Effects of Keishibukuryogon on vascular function in adjuvant-induced arthritis rats.** *Biol Pharm Bull* 2007, **30**:1042-1047.
36. Mäki-Petäjä KM, Cheriyan J, Booth AD, Hall FC, Brown J, Wallace SM, Ashby MJ, McEniery CM, Wilkinson IB: **Inducible nitric oxide synthase activity is increased in patients with rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction.** *Int J Cardiol* 2008, **129**:399-405.
37. Syngle A, Vohra K, Kaur L, Sharma S: **Effect of spironolactone on endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis.** *Scand J Rheumatol* 2009, **38**:15-22.
38. Kerekes G, Szekanez Z, Dér H, Sándor Z, Lakos G, Muszbek L, Csipö I, Sipka S, Seres I, Paragh G, Kappelmayer J, Szomják E, Veres K, Szegedi G, Shoenfeld Y, Soltész P: **Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: a multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity.** *J Rheumatol* 2008, **35**:398-406.
39. Philis-Tsimikas A, Parthasarathy S, Picard S, Palinski W, Witztum JL: **Aminoguanidine has both pro-oxidant and antioxidant activity toward LDL.** *Arterioscler Thromb Biol* 1995, **15**:367-376.
40. Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM: **Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products.** *Br J Pharmacol* 2011, **164**:894-912.
41. Largo R, Sánchez-Pernaute O, Marcos ME, Moreno-Rubio J, Aparicio C, Granado R, Ortega L, Egido J, Herrero-Beaumont G: **Chronic arthritis aggravates vascular lesions in rabbits with atherosclerosis: a novel model of atherosclerosis associated with chronic inflammation.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**:2723-2734.
42. Félétou M, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM: **Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors.** *Br J Pharmacol* 2009, **156**:563-574.
43. Flammer AJ, Lüscher TF: **Human endothelial dysfunction: EDRFs.** *Pflugers Arch* 2010, **459**:1005-1013.
44. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH: **K+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries.** *Nature* 1998, **396**:269-272.
45. Feletou M, Vanhoutte PM: **Endothelium-derived hyper-polarizing factor: where are we now?** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, **26**:1215-1225.
46. Holowatz LA, Santhanam L, Webb A, Berkowitz DE, Kenney WL: **Oral atorvastatin therapy restores cutaneous microvascular function by decreasing arginase activity in hypercholesterolaemic humans.** *J Physiol* 2011, **589**:2093-2103.
47. Ming XF, Barandier C, Viswambharan H, Kwak BR, Mach F, Mazzolai L, Hayoz D, Ruffieux J, Rusconi S, Montani JP, Yang Z: **Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction.** *Circulation* 2004, **110**:3708-3714.
48. Shatanawi A, Romero MJ, Iddings JA, Chandra S, Umapathy NS, Verin AD, Caldwell RB, Caldwell RW: **Angiotensin II-induced vascular endothelial dysfunction through RhoA/Rho kinase/p38 mitogen-activated protein kinase/arginase pathway.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2011, **300**:C1181-1192.
49. Kim JH, Bugaj LJ, Oh YJ, Bivalacqua TJ, Ryoo S, Soucy KG, Santhanam L, Webb A, Camara A, Sikka G, Nyhan D, Shoukas AA, Ilies M, Christianson DW, Champion HC, Berkowitz DE: **Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats.** *J Appl Physiol* 2009, **107**:1249-1257.
50. Zhang W, Baban B, Rojas M, Tofigh S, Virmani SK, Patel C, Behzadian MA, Romero MJ, Caldwell RW, Caldwell RB: **Arginase activity mediates retinal inflammation in endotoxin-induced uveitis.** *Am J Pathol* 2009, **175**:891-902.
51. Chatterjee Adhikari M, Guin A, Chakraborty S, Sinhamahapatra P, Ghosh A: **Subclinical atherosclerosis and endothelial dysfunction in patients with early rheumatoid arthritis as evidenced by measurement of carotid intima-media thickness and flow-mediated vasodilatation: an observational study.** *Semin Arthritis Rheum* 2012, **41**:669-675.

52. González-Juanatey C, Llorca J, González-Gay MA: **Correlation between endothelial function and carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis patients with long-standing disease.** *Arthritis Res Ther* 2011, **13**:R101.
53. Syngle A, Vohra K, Garg N, Kaur L, Chand P: **Advanced glycation end-products inhibition improves endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis.** *Int J Rheum Dis* 2012, **15**:45-55.
54. Flammer AJ, Sudano I, Hermann F, Gay S, Forster A, Neidhart M, Künzler P, Enseleit F, Périat D, Hermann M, Nussberger J, Luscher TF, Corti R, Noll G, Ruschitzka F: **Angiotensin converting enzyme inhibition improves vascular function in rheumatoid arthritis.** *Circulation* 2008, **117**:2262-2269.
55. Takahashi N, de Jager VC, Glück A, Letzkus M, Hartmann N, Staedtler F, Ribeiro-Dias F, Heuvelmans-Jacobs M, van den Berg WB, Joosten LA: **The molecular signature of oxidative metabolism and the mode of macrophage activation determine the shift from acute to chronic disease in experimental arthritis: critical role of interleukin-12p40.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**:3471-3484.
56. Clavel G, Bessis N, Boissier MC: **Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis.** *Joint Bone Spine* 2003, **70**:321-326.
57. Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, Nishimoto N: **Antiinterleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**:1521-1529.
58. Morris SM Jr: **Arginine metabolism in vascular biology and disease.** *Vasc Med* 2005, **10**:S83-87.

doi:10.1186/ar3860

Cite this article as: Prati et al.: Treatment with the arginase inhibitor N_w-hydroxy-nor-L-arginine restores endothelial function in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2012 **14**:R130.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



IV. Conclusions – Perspectives

Il est avéré que l'excès de maladies cardiovasculaires dans la PR, en particulier celles secondaires à l'athérosclérose, explique la surmortalité par rapport à la population générale.

Depuis quelques années, une prise de conscience pour une prise en charge globale du patient PR s'est installée, incluant notamment la nécessité de prendre en compte ce risque cardiovasculaire excessif. En accord avec cela, les recommandations de l'EULAR insistent sur l'évaluation du risque cardiovasculaire chez le patient PR, en se basant sur une matrice d'évaluation du risque de développer un événement cardiovasculaire. Cependant, une fois le risque évalué, le rhumatologue est relativement démuné car aujourd'hui aucune stratégie de prise en charge spécifique des anomalies cardiovasculaires du patient PR n'est clairement validée. De plus, la DE, élément initiateur des complications athéromateuses, n'est pas systématiquement recherchée chez le patient PR (par méconnaissance et par manque de techniques simples et validées), et ses mécanismes physiopathologiques en cas de PR ne sont pas connus.

Nos travaux réalisés sur le modèle de rat AIA ont donc apporté des éléments originaux et importants concernant la DE associée à la PR :

Ils ont identifié plusieurs nouveaux mécanismes physiopathologiques impliqués dans le DE.

Parmi ces mécanismes, nos travaux ont clairement identifié la surexpression de la voie de l'arginase comme un élément fondamental de cette dysfonction endothéliale.

Ils ont démontré l'efficacité d'un traitement chronique par un inhibiteur d'arginase pour restaurer la fonction endothéliale, de façon indépendante de l'atteinte clinique et biologique.

Aussi l'ensemble de ces résultats permettent d'envisager l'arginase comme une nouvelle cible thérapeutique spécifique de la DE associée à la PR.

De nombreuses questions restent cependant en suspens concernant la DE de la PR.

La DE en cas d'arthrite possède-t-elle les mêmes caractéristiques physiopathologiques que celles associées aux pathologies cardiovasculaires « conventionnelles » ?

Nos travaux sur l'arginase ont démontré le rôle de la surexpression et de l'augmentation de l'activité de l'enzyme dans la DE associée au modèle AIA. Ces anomalies vasculaires endothéliales liées à l'arginase ne sont pas spécifiques de l'arthrite puisqu'elles ont déjà été rapportées dans des modèles animaux de pathologies cardiovasculaires ou métaboliques telles que l'HTA, le diabète, l'insuffisance coronaire ou l'âge. Par ailleurs, nous avons identifié d'autres mécanismes impliqués dans la DE: excès de stress oxydant, diminution des facteurs EDHF, rôle pathologique de la COX-2, de la PGI2 synthase et de la TX synthase.

Toutes ces anomalies sont communes aux différents modèles de pathologies cardiovasculaires. Pendant la réalisation de la thèse, l'équipe de Sakuta et coll. a complété nos travaux en démontrant l'implication du Système Rénine Angiotensine Aldostérone dans la DE associée à l'AIA chez le rat (226). Ces anomalies physiopathologiques sont communes aux différents modèles de pathologies cardiovasculaires. Il serait donc tentant de considérer la DE de la PR comme une DE « classique », sans caractéristiques propres, mais qui présenterait l'intérêt de répondre aux mêmes traitements qui améliorent déjà la DE dans d'autres pathologies cardiovasculaires.

Plusieurs arguments vont dans ce sens.

Plusieurs études ont noté l'efficacité des statines et des IEC sur la DE en cas de PR, même si les résultats avec les IEC sont moins homogènes qu'avec les statines, indépendamment d'un effet sur la sévérité de l'arthrite (227). D'autre part l'inflammation semble être un dénominateur commun aux différents types de DE: Il existe d'apparentes similitudes entre la DE dans la PR et la DE dans le processus d'athérogénèse qui est décrite comme un processus dynamique inflammatoire d'activation endothéliale, de recrutement de leucocytes et d'oxydation lipidique (228). Tout comme l'athérosclérose, la PR est liée à des anomalies lipidiques qui pourraient participer à l'athérogénèse précoce (229). Ces convergences restent cependant à démontrer.

Cependant, des différences existent :

La plupart des pathologies cardiovasculaires sont caractérisées par une inflammation de « bas grade », or la PR est une maladie avec une inflammation de « haut grade », avec une évolution par poussées inflammatoires. De plus, la PR est caractérisée par une dysrégulation du système immunitaire non retrouvée dans les autres pathologies.

L'effet du tabagisme et de l'élévation du taux de cholestérol serait probablement moins marqué sur le risque cardiovasculaire en cas de PR par rapport aux autres pathologies cardiovasculaires (228).

Une étude récente a montré que chez des patients avec une PR (durée moyenne de 8 ans), les taux d'ADMA ne sont pas corrélés à la DE macro et microvasculaire ou à la rigidité artérielle (168). Ces résultats contrastent avec les données dans les autres pathologies cardiovasculaires où l'ADMA est considéré comme un marqueur de DE (229). De la même manière, une étude réalisée sur des patients PR avec une maladie sévère (230) n'a pas trouvé de corrélation entre la DE macrovasculaire les taux plasmatiques d'ICAM-1, VCAM-1, P-selectine et E-selectine, qui sont utilisés comme biomarqueurs systémiques de la DE associée aux pathologies cardiovasculaires.

De façon surprenante, le rôle de l'inflammation dans la pathogénèse de la DE reste peu clair.

Récemment, une étude menée chez des patients atteints de PR récentes (moins d'un an) avec FR positif, a démontré une DE macrovasculaire, celle-ci ne pouvant pas être expliquée par l'activité de la maladie ou le niveau d'inflammation, suggérant que la DE survient avant le début de la maladie, et qu'elle pourrait être initiée par d'autres paramètres que la seule inflammation (137). Ces résultats très intéressants incitent à réaliser des études chez l'animal visant à caractériser la cinétique d'apparition de la DE, et à réaliser d'autres études chez l'Homme pour confirmer ce résultat et rechercher des marqueurs systémiques de la DE précoce. Les études cliniques démontrant que les anti-TNF alpha n'améliorent pas le risque cardiovasculaire du patient PR (229) vont dans le même sens et ne sont pas en faveur d'un lien entre inflammation et DE.

Ces données suggèrent que les mécanismes impliqués dans la DE associée à la PR comportent une composante dépendante de l'inflammation mais également une composante indépendante de l'inflammation. Dans ce contexte, il semble logique d'envisager que la prise en charge adéquate du risque cardiovasculaire du patient PR devrait associer un traitement de fond de la PR et un traitement spécifique du risque cardiovasculaire qui reste à déterminer. Les travaux menés dans notre thèse suggèrent que les inhibiteurs d'arginase pourraient constituer cette «add-on» thérapie. Avant de confirmer cette hypothèse audacieuse, plusieurs points sont à résoudre.

Quelle est la pertinence clinique des résultats obtenus sur le modèle AIA pour l'étude de la DE en cas de PR ?

Dans notre étude, notre choix du modèle a été contraint par les données existant dans la littérature concernant la DE. En effet toutes les études ont été faites sur le modèle du rat AIA, qui présente limites et intérêts énoncés précédemment dans la thèse. Nos données ont rapporté l'existence d'une corrélation positive entre la sévérité de l'atteinte arthritique et la dysfonction endothéliale, ce qui est en accord avec les données obtenues chez l'Homme. L'efficacité démontrée d'une statine sur la DE du rat AIA (180) a été confirmée chez le patient PR (153-156), suggérant que ce modèle est prédictif en termes d'efficacité thérapeutique. Cependant, l'absence d'implication des lymphocytes B et l'absence de FR pourraient être des biais qui justifieraient la confirmation des résultats dans d'autres modèles que l'AIA. En effet il a été montré que la présence de FR était prédictive de l'altération de la fonction endothéliale dans la PR. Très récemment, une étude conduite sur le modèle d'arthrite à collagène (CIA) chez la souris a indiqué l'absence de DE aortique à un temps précoce mais la présence d'une dysfonction contractile (232). Cette étude, qu'il serait intéressant de confirmer chez le rat,

montre la complexité des mécanismes impliqués dans la DE associée à l'arthrite et la nécessité de conduire des études chez l'animal à différents moments de la maladie arthritique afin de déterminer si la DE est précoce et durable, comme suggéré par les études chez l'homme.

En ce qui concerne le rôle de l'arginase, aucune étude aujourd'hui n'a recherché l'existence d'anomalies vasculaires de l'arginase chez le patient PR. Techniquement, il serait possible d'étudier l'expression/activité de l'arginase sur des biopsies vasculaires (tissu adipeux, biopsies coronarienne) mais ces prélèvements ne sont pas courants. Alternativement, Holowatz a proposé une technique de perfusion (233) de l'inhibiteur d'arginase via une sonde de microdialyse implantée en sous cutané, couplée à l'étude de la vasodilatation cutanée réflexe. Enfin, et de façon encore plus simple, il serait possible de mesurer l'activité arginase plasmatique et/ou de quantifier la quantité d'arginase plasmatique chez les patients PR, et de rechercher une corrélation avec des marqueurs périphériques de DE ou avec la mesure de la DE par FMD. En effet, bien que les mécanismes sous-jacents restent indéterminés, une augmentation de l'arginase plasmatique a été notée chez les patients atteints de pathologies dans lesquelles l'arginase était augmentée au niveau endothélial dans les modèles animaux de ces pathologies (diabète, HTA ...) (219-221).

Dans l'éventualité où des anomalies de l'arginase vasculaire seraient mises en évidence chez l'homme, nos résultats montrant qu'un traitement chronique par la nor-NOHA restaure la fonction endothéliale macrovasculaire du rat AIA sont en faveur de la réalisation d'essais cliniques avec un inhibiteur d'arginase. A ce jour, aucun inhibiteur d'arginase n'a été testé chez l'Homme. Plusieurs études réalisées sur différents modèles animaux ont administré *in vivo*, par différentes voies, les principaux inhibiteurs d'arginase disponibles dans le commerce : nor-NOHA, BEC (S-(2-boronoethyl)-L-cysteine), ABH (2(S)-amino-6-borono-hexanoic acid) (tableau 10). Ces trois inhibiteurs sont tous des inhibiteurs compétitifs réversibles de l'arginase, non sélectifs des deux isoformes de l'enzyme. Avant d'envisager leur administration chez l'Homme, il sera nécessaire de conduire des études permettant de disposer de données pharmacocinétiques sur ces inhibiteurs chez l'animal, absentes pour l'instant. L'autre point critique qui devra être également résolu est l'absence d'études toxicologiques sur ces composés. Ce dernier point est particulièrement important puisque l'arginase est une enzyme clé du cycle de l'urée au niveau hépatique. Les quelques données de tolérance disponibles sont néanmoins rassurantes, du moins pour la nor-NOHA. En effet, nous avons précédemment montré qu'une injection quotidienne chronique de nor-NOHA pendant 3 ou 10 semaines ne modifiait ni le poids de l'animal, ni son comportement, ni son taux d'urée plasmatique. Ceci s'explique probablement par le fait que la quantité d'arginase

dans le foie est 100 à 1000 fois supérieure à celle de l'endothélium vasculaire, rendant l'impact hépatique d'un inhibiteur d'arginase très modéré aux posologies efficaces au niveau vasculaire (234).

Tableau 10. Etudes ayant utilisé un inhibiteur d'arginase *in vivo* chez l'animal. A : oral ; B : injection ; C : inhalation ; D : topic

<i>Species (strain)</i>	<i>Inhibitor</i>	<i>Dose and route of administration</i>		<i>Duration</i>	<i>References</i>
Mouse (ApoE ^{-/-})	ABH	A	~200 µg/day; in drinking water	14 days	Ryoo <i>et coll.</i> 2008 (225)
Mouse (B6/129)	ABH	B	3.2 µg/kg; intracavernosal	20 min	Bivalacqua <i>et coll.</i> 2007 (207)
Mouse (C57BL/6)	ABH	B	0.7 mg/day; i.p.	23 days	Xu <i>et coll.</i> 2003 (235)
Mouse (C57BL/6)	nor-NOHA	B	2 × 100 mg/kg; i.v.	≤24 h	Jeyabalan <i>et coll.</i> 2008 (236)
Mouse (C57BL/6)	nor-NOHA	B	100 µg/day; i.p.	14 days	Bratt <i>et coll.</i> 2009 (237)
Rat (Lewis)	nor-NOHA	B	2 × 100 mg/kg; i.v.	≤24 h	Reid <i>et coll.</i> 2007 (238)
Rat (SHR)	nor-NOHA	B	10 or 40 mg/kg/day; i.p.	21 days	Bagnost <i>et coll.</i> 2008 (211)
Mouse (BALB/c)	BEC	C	2.3 µg; single aspiration	48 h	Ckless <i>et coll.</i> 2008 (239)
Guinea pig (Dunkin Hartley)	ABH	C	25 mmol·L ⁻¹ in aerosol; 1–3 × 15 min inhalation	≤24 h	Maarsingh <i>et coll.</i> 2008 (240)
Mouse C57BL/6	Nor-NOHA	B	250 mg/mouse twice a day	6-12 days	Martins <i>et coll.</i> 2012 (241)
Mouse C57BL/6	BEC	A	20µL (50-100µmol/L) twice a day	3 days	Kim 2011 <i>et coll.</i> (242)
Mouse C57BL/6	ABH	A	8 mg·kg ⁻¹ ·day	2 days	Shatanawi 2011 <i>et coll.</i> (243)
Mouse NC/Nga	Nor-NOHA	C	100 µg/10 µl saline	3 days	Takahashi 2010 <i>et coll.</i> (244)
Mouse C57BL/6	BEC	A	?	3 days	Lewis 2010 <i>et coll.</i> (245)
Rat Fischer 344	ABH	A	400 µg a day	25 days	Kim 2009 <i>et coll.</i> (246)
Mouse C57BL/6	ABH	D	0.1 ml of 0,1mM	14 days	Kavalukas 2012 <i>et coll.</i> (247)
Guinea Pig	ABH	C	?	12 weeks	Maarsingh 2011 <i>et coll.</i> (248)
Mouse MHC ODC	Nor-NOHA	B	50 mg/kg	8 days	Giordano <i>et coll.</i> 2012 (249)

L'arginase joue-t-elle un rôle dans l'atteinte articulaire de la PR ?

Bien que nous n'ayons pas pour objectif premier d'étudier le rôle de l'arginase dans les manifestations articulaires de l'arthrite, les résultats obtenus après traitement quotidien des rats AIA pendant 3 semaines nous a conduit à nous intéresser à ce point. Dans notre étude, le traitement a été débuté en mode « curatif », c'est-à-dire une fois les premiers symptômes de l'arthrite apparus. Dans ce contexte, malgré une légère tendance à une réduction du score clinique, le traitement par inhibiteur d'arginase n'a pas eu d'effets significatifs sur l'atteinte clinique, radiologique ou histologique. Ce résultat n'est donc pas en faveur d'un rôle de l'arginase à ce stade de l'arthrite. Il serait donc intéressant de réaliser un traitement cette fois-ci « préventif » avec un inhibiteur d'arginase pour déterminer son rôle dans la phase de développement de l'arthrite. En effet, dans une étude étudiant l'expression des gènes du tissu synovial dans le modèle d'injection de fragments de streptocoques chez la souris, Takahashi et coll. ont montré que la phase aiguë de l'inflammation était caractérisée par la présence de macrophages de type « alternatively activated », qui expriment fortement l'arginase de type 1, alors que la phase chronique présentait des macrophages de type « classically activated », exprimant fortement la NOS inductible (229). Dans une étude réalisée chez des patients PR, Corraliza et coll. (226) ont révélé l'existence d'une surexpression de l'arginase de type 2 dans les macrophages et fibroblastes du liquide synovial, alors que Rotondo et coll. (250) identifient une surexpression de l'arginase de type 1 dans le liquide synovial de patients PR, et émettent l'hypothèse d'une exocytose de l'enzyme à partir des polynucléaires neutrophiles. Ainsi, si le rôle de l'arginase au niveau articulaire ne peut pas être exclu, d'autres études seront nécessaires pour préciser ses anomalies et les types cellulaires pouvant exprimer cette enzyme au niveau articulaire.

En conclusion, nos travaux de thèse ont apporté de nouvelles données permettant de mieux comprendre la DE du patient arthritique. Ils ouvrent des perspectives pour des études cliniques visant à préciser le rôle de l'arginase dans la DE, qui permettront peut-être d'envisager l'inhibition de l'arginase comme une nouvelle thérapeutique dans la PR.

Bibliographie

1. Gonzalez A, Maradit Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Davis JM 3rd, Thorneau TM, Roger VL, Gabriel SE. The widening mortality gap between rheumatoid arthritis patients and the general population. *Arthritis Rheum.* 2007 Nov;56(11):3583-7
2. Pham T, Gossec L, Constantin A, Pavy S, Bruckert E, Cantagrel A, et al. Cardiovascular risk and rheumatoid arthritis : clinical practice guidelines based on published evidence and expert opinion. *Joint Bone Spine* 2006 ; 73(4) : 379-87
3. Bacon PA, Stevens RJ, Carruthers DM, Young SP, Kitas GD. Accelerated atherogenesis in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev.* 2002 Dec;1(6):338-47
4. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 ; 340(2) : 115-26
5. Bergholm R, Leirisalo-Repo M, Vehkavara S, Makimattila S, Taskinen MR, Yki-Jarvinen H. Impaired responsiveness to NO in newly diagnosed patients with rheumatoid arthritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 ; 1(22) : 1637-41
6. Zimmermann N, Rothenberg ME. The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation. *Eur J Pharmacol* 2006 ; 533(1-3) : 253-62
7. Haute Autorité de Santé. Avril 2008. Guide - Affection de longue durée. Polyarthrite rhumatoïde évolutive grave
8. Arend WP, Firestein GS. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat Rev Rheumatol.* 2012 Aug 21
9. Hjeltnes G, Hollan I, Førre Ø, Wiik A, Mikkelsen K, Agewall S. Anti-CCP and RF IgM: predictors of impaired endothelial function in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol.* 2011 Nov;40(6):422-7
10. Jantti J, Aho K, Kaarela K et al. Work disability in an inception cohort of patients with seropositive rheumatoid arthritis in the first years of the disease. *Rheumatology* 1999;38:423-30
11. Combe B, Cantagrel A, Goupille P, et al. Predictive factors of 5-year health assessment questionnaire disability in early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol* 2003;30:2344-2349

12. Gossec L , Dougados M, Goupille P, et al..Prognostic factors for remission in early rheumatoid arthritis : a multiparameter prospective study *Ann Rheum Dis* 2004;63:675-680
13. Shamma RM, Ranganath VK, Paulus HE. Remission in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2010 Oct;12(5):355-62
14. Girbal E, Sebbag M, Gomès-Daudrix V et al. Characterisation of the rat oesophagus epithelium antigens defined by the so-called “ antikeratin antibodies ”, specific for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1993 ; 52 : 749-757
15. Karlson EW, Deane K. Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2012 May;38(2):405-26
16. Combe B, Eliaou JF, Daurès JP.Prognostic factors in rheumatoid arthritis. Comparison of 2 subtypes of patients according to severity of articular damage. *Brit J Rheumatol* 1995, 34, 529-534
17. Hoes JN, Jacobs JW, Boers M, Boumpas D, Buttgerit F, Caeyers N, Choy EH, Cutolo M, Da Silva JA, Esselens G, Guillevin L, Hafstrom I, Kirwan JR, Rovensky J, Russell A, Saag KG, Svensson B, Westhovens R, Zeidler H, Bijlsma JW. EULAR evidence-based recommendations on the management of systemic glucocorticoid therapy in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2007 Dec;66(12):1560-7
18. Smolen JS, Landewé R, Breedveld FC, Dougados M, Emery P, Gaujoux-Viala C, Gorter S, Knevel R, Nam J, Schoels M, Aletaha D, Buch M, Gossec L, Huizinga T, Bijlsma JW, Burmester G, Combe B, Cutolo M, Gabay C, Gomez-Reino J, Kouloumas M, Kvien TK, Martin-Mola E, McInnes I, Pavelka K, van Riel P, Scholte M, Scott DL, Sokka T, Valesini G, van Vollenhoven R, Winthrop KL, Wong J, Zink A, van der Heijde D. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis.* 2010 Jun;69(6):964-75
19. Pearson CM. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956 Jan;91(1):95-101
20. Banik RK, Kasai M, Mizumura K. Reexamination of the difference in susceptibility to adjuvant-induced arthritis among LEW/Crj, Slc/Wistar/ST and Slc/SD rats. *Exp Anim.* 2002 Apr;51(2):197-201
21. Waksman BH. Immune regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis. *Scand J Immunol.* 2002 Jul;56(1):12-34

22. Joe B, Griffiths MM, Remmers EF, Wilder RL. Animal models of rheumatoid arthritis and related inflammation. *Curr Rheumatol Rep.* 1999 Dec;1(2):139-48
23. Wilbrink B, Holewijn M, Bijlsma JW, Van Roy JL, van der Zee R, Boog CJ, Den Otter W, Van Eden W. Antigen-activated T cells inhibit cartilage proteoglycan synthesis independently of T-cell proliferation. *Scand J Immunol.* 1992 Nov;36(5):733-43
24. Konttinen YT, Honkanen VE, Grönblad M, Keinonen M, Santavirta N, Santavirta S. The relation of extraarticular tenderness to inflammatory joint disease and personality in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1992 Jun;19(6):851-5
25. Kojima T, Mwale F, Yasuda T, Girard C, Poole AR, Lavery S. Early degradation of type IX and type II collagen with the onset of experimental inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001 Jan;44(1):120-7
26. Bush KA, Walker JS, Lee CS, Kirkham BW. Cytokine expression and synovial pathology in the initiation and spontaneous resolution phases of adjuvant arthritis: interleukin-17 expression is upregulated in early disease. *Clin Exp Immunol.* 2001 Mar;123(3):487-95
27. Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, Gremese E, Tolusso B, De Benedetti F. Interleukin-1 β and interleukin-6 in arthritis animal models: roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Mol Med.* 2010 Nov-Dec;16(11-12):552-7
28. Zlacka D, Vavrincova P, Hien Nguyen TT, Hromadnikova I. Frequency of anti-hsp60, -65 and -70 antibodies in sera of patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Autoimmun.* 2006 Sep;27(2):81-8
29. Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008 Nov;67(11):1505-15
30. Brand DD. Rodent models of rheumatoid arthritis. *Comp Med.* 2005 Apr;55(2):114-22
31. Wilder RL, Remmers EF, Kawahito Y, Gulko PS, Cannon GW, Griffiths MM. Genetic factors regulating experimental arthritis in mice and rats. *Curr Dir Autoimmun.* 1999;1:121-65

32. Goodson NJ, Wiles NJ, Lunt M, Barrett EM, Silman AJ, Symmons DP. Mortality in early inflammatory polyarthritis: cardiovascular mortality is increased in seropositive patients. *Arthritis Rheum.* 2002 Aug;46(8):2010-9
33. Del Rincon I, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum* 2001;44:2737e45
34. Levy L, Fautrel B, Barnetche T, Schaeffer T. Incidence and risk of fatal myocardial infarction and stroke events in rheumatoid arthritis patients. A systematic review of the literature. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:673e9
35. Boyer JF, Gourraud PA, Cantagrel A, Davignon JL, Constantin A. Traditional cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Joint Bone Spine.* 2011 Mar;78(2):179-83
36. Meune C, *Arch Cardiovasc Dis.* 2010 Apr;103(4):253-61
37. Nurmohamed MT. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2009;8:663–7
38. Gravallesse EM, Corson JM, Coblyn JS, Pinkus GS, Weinblatt ME. Rheumatoid aortitis: a rarely recognized but clinically significant entity. *Medicine (Baltimore)* 1989;68:95–106
39. Turiel M, Sitia S, Atzeni F, Tomasoni L, Gianturco L, Giuffrida M, et al. The heart in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2010;9:414–8
40. Kitas G, Banks MJ, Bacon PA. Cardiac involvement in rheumatoid disease. *Clin Med* 2001;1:18–21
41. Turesson C, Matteson EL. Management of extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:206–11
42. Chung CP, Oeser A, Solus JF, Avalos I, Gebretsadik T, Shintani A, Raggi P, Sokka T, Pincus T, Stein CM. Prevalence of the metabolic syndrome is increased in rheumatoid arthritis and is associated with coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2008 Feb;196(2):756-63
43. Kaplan MJ. Is rheumatoid arthritis a risk factor for cardiovascular disease? *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007 May;3(5):260-1. Epub 2007 Mar 27. PubMed PMID: 48 Peters MJ, van Halm VP, Voskuyl AE, Smulders YM, Boers M, Lems WF, Visser M, Stehouwer CD, Dekker JM, Nijpels G,

Heine R, Dijkmans BA, Nurmohamed MT. Does rheumatoid arthritis equal diabetes mellitus as an independent risk factor for cardiovascular disease? A prospective study. *Arthritis Rheum.* 2009 Nov 15;61(11):1571-9

44. Peters MJ, van Halm VP, Nurmohamed MT, Damoiseaux J, Tervaert JW, Twisk JW, Dijkmans BA, Voskuyl AE. Relations between autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein, inflammation, subclinical atherosclerosis, and cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2008 Aug;35(8):1495-9

45. Pieringer H, Brummaier T, Schmid M, Pichler M, Hayat-Khayyati A, Ebner S, Biesenbach G, Pohanka E. Rheumatoid Arthritis Is an Independent Risk Factor for an Increased Augmentation Index Regardless of the Coexistence of Traditional Cardiovascular Risk Factors. *Semin Arthritis Rheum.* 2012 Apr 2

46. Finckh A, *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012 Jun;64(6):817-25

47. Peters MJ, Symmons DP, McCarey D, Dijkmans BA, Nicola P, Kvien TK, McInnes IB, Haentzschel H, Gonzalez-Gay MA, Provan S, Semb A, Sidiropoulos P, Kitis G, Smulders YM, Soubrier M, Szekanecz Z, Sattar N, Nurmohamed MT. EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010 Feb;69(2):325-31

48. Montecucco F, Mach F. Common inflammatory mediators orchestrate pathophysiological processes in rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48: 11–22

49. Edwards CJ, Syddall H, Goswami R, Goswami P, Dennison EM, Arden NK, et al. The autoantibody rheumatoid factor may be an independent risk factor for ischaemic heart disease in men. *Heart* 2007;93:1263–7

50. Montecucco F, Vuilleumier N, Pagano S, Lenglet S, Bertolotto M, Braunersreuther V, et al. Anti-Apolipoprotein A-1 autoantibodies are active mediators of atherosclerotic plaque vulnerability. *Eur Heart J* 2011;32:412–21

51. Harney SM, Timperley J, Daly C, Harin A, James T, Brown MA, et al. Brain natriuretic peptide is a potentially useful screening tool for the detection of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis [letter]. *Ann Rheum Dis* 2006;65:136

52. Den Ruijter HM, Peters SA, Anderson TJ, Britton AR, Dekker JM, Eijkemans MJ, Engström G, Evans GW, de Graaf J, Grobbee DE, Hedblad B, Hofman A, Holewijn S, Ikeda A, Kavousi M, Kitagawa K, Kitamura A, Koffijberg H, Lonn EM, Lorenz MW, Mathiesen EB, Nijpels G, Okazaki S, O'Leary DH, Polak JF, Price JF, Robertson C, Rembold CM, Rosvall M, Rundek T, Salonen JT, Sitzer M, Stehouwer CD, Witteman JC, Moons KG, Bots ML. Common carotid intima-media thickness measurements in cardiovascular risk prediction: a meta-analysis. *JAMA*. 2012 Aug 22;308(8):796-803
53. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA*. 2001 Aug 22-29;286(8):954-9
54. Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG, Redston M, Solomon SD, Kim K, Tang J, Rosenstein RB, Wittes J, Corle D, Hess TM, Woloj GM, Boisserie F, Anderson WF, Viner JL, Bagheri D, Burn J, Chung DC, Dewar T, Foley TR, Hoffman N, Macrae F, Pruitt RE, Saltzman JR, Salzberg B, Sylwestrowicz T, Gordon GB, Hawk ET; APC Study Investigators. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N Engl J Med*. 2006 Aug 31;355(9):873-84
55. Cannon CP, Curtis SP, FitzGerald GA, Krum H, Kaur A, Bolognese JA, Reicin AS, Bombardier C, Weinblatt ME, van der Heijde D, Erdmann E, Laine L; MEDAL Steering Committee. Cardiovascular outcomes with etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis in the Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term (MEDAL) programme: a randomised comparison. *Lancet*. 2006 Nov 18;368(9549):1771-81
56. Curtis SP, Ko AT, Bolognese JA, Cavanaugh PF, Reicin AS. Pooled analysis of thrombotic cardiovascular events in clinical trials of the COX-2 selective Inhibitor etoricoxib. *Curr Med Res Opin*. 2006 Dec;22(12):2365-74
57. McGettigan P, Henry D. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *JAMA*. 2006 Oct 4;296(13):1633-44
58. Kearney PM, Baigent C, Godwin J, Halls H, Emberson JR, Patrono C. Do selective cyclooxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ*. 2006 Jun 3;332(7553):1302-8
59. Wei L, MacDonald TM, Walker BR. Taking glucocorticoids by prescription is associated with subsequent cardiovascular disease. *Ann Intern Med*. 2004 Nov 16;141(10):764-70

60. Del Rincón I, O'Leary DH, Haas RW, Escalante A. Effect of glucocorticoids on the arteries in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Dec;50(12):3813-22.
61. Davis JM 3rd, Maradit Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Thorneau TM, Roger VL, Gabriel SE. Glucocorticoids and cardiovascular events in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis Rheum.* 2007 Mar;56(3):820-30
62. Wållberg-Jonsson S, Johansson H, Ohman ML, Rantapää-Dahlqvist S. Extent of inflammation predicts cardiovascular disease and overall mortality in seropositive rheumatoid arthritis. A retrospective cohort study from disease onset. *J Rheumatol.* 1999 Dec;26(12):2562-71
63. Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum.* 2005 Mar;52(3):722-32
64. Sihvonen S, Korpela M, Mustonen J, Huhtala H, Karstila K, Pasternack A. Mortality in patients with rheumatoid arthritis treated with low-dose oral glucocorticoids. A population-based cohort study. *J Rheumatol.* 2006 Sep;33(9):1740-6
65. Ruysse-Witrand A, Fautrel B, Saraux A, Le Loët X, Pham T. Cardiovascular risk induced by low-dose corticosteroids in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Joint Bone Spine.* 2011 Jan;78(1):23-30
66. Choi HK, Hernán MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet.* 2002 Apr 6;359(9313):1173-7
67. Goodson NJ, Farragher TM, Symmons DP. Rheumatoid factor, smoking, and disease severity: associations with mortality in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2008 Jun;35(6):945-9
68. Landewé RB, van den Borne BE, Breedveld FC, Dijkmans BA. Methotrexate effects in patients with rheumatoid arthritis with cardiovascular comorbidity. *Lancet.* 2000 May 6;355(9215):1616-7
69. Westlake SL, Colebatch AN, Baird J, Kiely P, Quinn M, Choy E, Ostor AJ, Edwards CJ. The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Feb;49(2):295-307
70. van Halm VP, Nurmohamed MT, Twisk JW, Dijkmans BA, Voskuyl AE. Disease-modifying antirheumatic drugs are associated with a reduced risk for cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a case control study. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(5):R151

71. Naranjo A, Sokka T, Descalzo MA, Calvo-Alén J, Hørslev-Petersen K, Luukkainen RK, Combe B, Burmester GR, Devlin J, Ferraccioli G, Morelli A, Hoekstra M, Majdan M, Sadkiewicz S, Belmonte M, Holmqvist AC, Choy E, Tunc R, Dimic A, Bergman M, Toloza S, Pincus T; QUEST-RA Group. Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: results from the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(2):R30
72. Suissa S, Bernatsky S, Hudson M. Antirheumatic drug use and the risk of acute myocardial infarction. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug 15;55(4):531-6
73. Hochberg MC, Johnston SS, John AK. The incidence and prevalence of extra-articular and systemic manifestations in a cohort of newly-diagnosed patients with rheumatoid arthritis between 1999 and 2006. *Curr Med Res Opin*. 2008 Feb;24(2):469-80
74. Greenberg JD, Kremer JM, Curtis JR, Hochberg MC, Reed G, Tsao P, Farkouh ME, Nasir A, Setoguchi S, Solomon DH; CORRONA Investigators. Tumour necrosis factor antagonist use and associated risk reduction of cardiovascular events among patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Apr;70(4):576-82
75. Reiss AB, Carsons SE, Anwar K, Rao S, Edelman SD, Zhang H, Fernandez P, Cronstein BN, Chan ES. Atheroprotective effects of methotrexate on reverse cholesterol transport proteins and foam cell transformation in human THP-1 monocyte/macrophages. *Arthritis Rheum*. 2008 Dec;58(12):3675-83
76. Solomon DH, Avorn J, Katz JN, Weinblatt ME, Setoguchi S, Levin R, Schneeweiss S. Immunosuppressive medications and hospitalization for cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006 Dec;54(12):3790-8
77. Park YB, Choi HK, Kim MY, Lee WK, Song J, Kim DK, Lee SK. Effects of antirheumatic therapy on serum lipid levels in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Am J Med*. 2002 Aug 15;113(3):188-93
78. Schiff MH, DiVittorio G, Tesser J, Fleischmann R, Schechtman J, Hartman S, Liu T, Solinger AM. The safety of anakinra in high-risk patients with active rheumatoid arthritis: six-month observations of patients with comorbid conditions. *Arthritis Rheum*. 2004 Jun;50(6):1752-60
79. Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, Mysler EF, da Silva NA, Alecock E, Woodworth T, Gomez-Reino JJ. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in

rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum.* 2008 Oct;58(10):2968-80

80. Nishimoto N, Ito K, Takagi N. Safety and efficacy profiles of tocilizumab monotherapy in Japanese patients with rheumatoid arthritis: meta-analysis of six initial trials and five long-term extensions. *Mod Rheumatol.* 2010 Jun;20(3):222-32

81. Maini RN, Taylor PC, Szechinski J, Pavelka K, Bröll J, Balint G, Emery P, Raemen F, Petersen J, Smolen J, Thomson D, Kishimoto T; CHARISMA Study Group. Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate. *Arthritis Rheum.* 2006 Sep;54(9):2817-29. Erratum in: *Arthritis Rheum.* 2008 Mar;58(3):887

82. Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study. *Ann Rheum Dis.* 2009 Oct;68(10):1580-4

83. Kerekes G, Soltész P, Dér H, Veres K, Szabó Z, Végyvári A, Szegedi G, Shoenfeld Y, Szekanecz Z. Effects of rituximab treatment on endothelial dysfunction, carotid atherosclerosis, and lipid profile in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2009 Jun;28(6):705-10

84. Mathieu S, Pereira B, Dubost JJ, Lusson JR, Soubrier M. No significant change in arterial stiffness in RA after 6 months and 1 year of rituximab treatment. *Rheumatology (Oxford).* 2012 Jun;51(6):1107-11

85. Keystone E, Fleischmann R, Emery P, Furst DE, van Vollenhoven R, Bathon J, Dougados M, Baldassare A, Ferraccioli G, Chubick A, Udell J, Cravets MW, Agarwal S, Cooper S, Magrini F. Safety and efficacy of additional courses of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: an open-label extension analysis. *Arthritis Rheum.* 2007 Dec;56(12):3896-908

86. Lewis MJ, Malik TH, Ehrenstein MR, Boyle JJ, Botto M, Haskard DO. Immunoglobulin M is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2009 Aug 4;120(5):417-26

87. van Vollenhoven RF, Emery P, Bingham CO 3rd, Keystone EC, Fleischmann R, Furst DE, Macey K, Sweetser M, Kelman A, Rao R. Longterm safety of patients receiving rituximab in rheumatoid arthritis clinical trials. *J Rheumatol*. 2010 Mar;37(3):558-67
88. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res*. 2007 Apr;48(4):751-62
89. Barnabe C, Martin BJ, Ghali WA. Systematic review and meta-analysis: anti-tumor necrosis factor α therapy and cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011 Apr;63(4):522-9
90. Westlake SL, Colebatch AN, Baird J, Curzen N, Kiely P, Quinn M, Choy E, Ostor AJ, Edwards CJ. Tumour necrosis factor antagonists and the risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Mar;50(3):518-31
91. Dixon WG, Watson KD, Lunt M, Hyrich KL; British Society for Rheumatology Biologics Register Control Centre Consortium, Silman AJ, Symmons DP; British Society for Rheumatology Biologics Register. Reduction in the incidence of myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis who respond to anti-tumor necrosis factor alpha therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Arthritis Rheum*. 2007 Sep;56(9):2905-12
92. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. 1990 Jul 26;323(4):236-41
93. Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT; Anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure Investigators. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation*. 2003 Jul 1;107(25):3133-40
94. Hürlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, Béchir M, Spiekler LE, Neidhart M, Michel BA, Gay RE, Lüscher TF, Gay S, Ruschitzka F. Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2002 Oct 22;106(17):2184-7

95. Dixon WG, Symmons DP. What effects might anti-TNFalpha treatment be expected to have on cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis? A review of the role of TNFalpha in cardiovascular pathophysiology. *Ann Rheum Dis*. 2007 Sep;66(9):1132-6
96. Solomon DH, Massarotti E, Garg R, Liu J, Canning C, Schneeweiss S. Association between disease-modifying antirheumatic drugs and diabetes risk in patients with rheumatoid arthritis and psoriasis. *JAMA*. 2011 Jun 22;305(24):2525-31
97. Blake GJ, Ridker PM. Are statins anti-inflammatory? *Curr Control Trials Cardiovasc Med*. 2000;1(3):161-165
98. McCarey DW, McInnes IB, Madhok R, Hampson R, Scherbakov O, Ford I, Capell HA, Sattar N. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004 Jun 19;363(9426):2015-21
99. Karakas M, Koenig W. CRP in cardiovascular disease. *Herz*. 2009 Dec;34(8):607-13
100. *Histologie humaine*, Stevens et Lowe (1997)
101. *Anatomie*, tome 2, Khale, Leonhardt et Platzer (1990)
102. Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins*. 1976 Dec;12(6):897-913
103. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373-6
104. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev*. 1978 Sep;30(3):293-331
105. Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*. 1995 Dec 1;92(11):3337-49
106. Müller-Esterl W. Kininogens, kinins and kinships. *Thromb Haemost*. 1989 Feb 28;61(1):2-6
107. Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J*. 1989 Jan;3(1):31-6

108. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988 Mar 31;332(6163):411-5
109. Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation*. 1988 Jun;77(6 Pt 2):I4-13
110. Svensson J, Hamberg M. Thromboxane A2 and prostaglandin H2: potent stimulators of the swine coronary artery. *Prostaglandins*. 1976 Dec;12(6):943-50
111. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 5;1411(2-3):273-89
112. Russwurm M, Koesling D. NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J*. 2004 Nov 10;23(22):4443-50. Epub 2004 Oct 28
113. Schini VB, Vanhoutte PM. Role of the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle. *Eur Heart J*. 1993 Nov;14 Suppl I:16-21
114. Stuehr DJ. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J Nutr*. 2004 Oct;134(10 Suppl):2748S-2751S; discussion 2765S-2767S
115. Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Lévy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res*. 1998 Dec 14-28;83(12):1271-8
116. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest*. 1997 Nov 1;100(9):2146-52
117. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*. 1989 Jun;13(6 Pt 2):658-67
118. Schini VB, Busse R, Vanhoutte PM. Inflammatory mediators induce the production of nitric oxide in vascular smooth muscle. *Exp Nephrol*. 1994 Mar-Apr;2(2):139-44
119. Stoclet JC, Muller B, György K, Andriantsiohaina R, Kleschyov AL. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur J Pharmacol*. 1999 Jun 30;375(1-3):139-55

120. Muller B, Kleschyov AL, Gyorgy K, Stoclet JC. Inducible NO synthase activity in blood vessels and heart: new insight into cell origin and consequences. *Physiol Res.* 2000;49(1):19-26
121. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature.* 1976 Oct 21;263(5579):663-5
122. Vanhoutte PM. [Endothelial dysfunction and vascular disease]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu.* 2002:1-15
123. Félétou M, Busse R, Edwards G, Fleming I, Weston AH, Vanhoutte PM. [Communication between endothelial and smooth muscle cells]. *Med Sci (Paris).* 2003 Dec;19(12):1242-50
124. Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci.* 2002 Aug;23(8):374-80
125. Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32 Suppl 3:S2-13
126. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature.* 1995 Oct 26;377(6551):748-50
127. Gigante B, Piras O, De Paolis P, Porcellini A, Natale A, Volpe M. Role of the angiotensin II AT2-subtype receptors in the blood pressure-lowering effect of losartan in salt-restricted rats. *J Hypertens.* 1998 Dec;16(12 Pt 2):2039-43
128. Barber MN, Sampey DB, Widdop RE. AT(2) receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT(1) receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension.* 1999 Nov;34(5):1112-6
129. Bacon PA, Raza K, Banks MJ, Townend J, Kitas GD. The role of endothelial cell dysfunction in the cardiovascular mortality of RA. *Int Rev Immunol* 2002 ; 21(1) : 1-17
130. Van Doornum S, McColl G, Jenkins A, Green DJ, Wicks IP. Screening for atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis: comparison of two in vivo tests of vascular function. *Arthritis Rheum.* 2003 Jan;48(1):72-80

131. Mäki-Petäjä KM, Hall FC, Booth AD, Wallace SM, Yasmin, Bearcroft PW, Harish S, Furlong A, McEniery CM, Brown J, Wilkinson IB. Rheumatoid arthritis is associated with increased aortic pulse-wave velocity, which is reduced by anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Circulation*. 2006 Sep 12;114(11):1185-92
132. Foster W, Carruthers D, Lip GY, Blann AD. Inflammation and microvascular and macrovascular endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: effect of treatment. *J Rheumatol*. 2010 Apr;37(4):711-6
133. Kerekes G, Szekanecz Z, Dér H, Sándor Z, Lakos G, Muszbek L, Csipö I, Sipka S, Seres I, Paragh G, Kappelmayer J, Szomják E, Veres K, Szegedi G, Shoenfeld Y, Soltész P. Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: a multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity. *J Rheumatol*. 2008 Mar;35(3):398-406
134. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Vazquez-Rodriguez TR, Diaz-Varela N, Garcia-Quiroga H, Gonzalez-Gay MA. Short-term improvement of endothelial function in rituximab-treated rheumatoid arthritis patients refractory to tumor necrosis factor alpha blocker therapy. *Arthritis Rheum*. 2008 Dec 15;59(12):1821-4
135. Sandoo A, Carroll D, Metsios GS, Kitas GD, Veldhuijzen van Zanten JJ. The association between microvascular and macrovascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jun 21;13(3):R99
136. van Eijk IC, Serné EH, Dijkmans BA, Smulders Y, Nurmohamed M. Microvascular function is preserved in newly diagnosed rheumatoid arthritis and low systemic inflammatory activity. *Clin Rheumatol*. 2011 Aug;30(8):1113-8
137. Chatterjee Adhikari M, Guin A, Chakraborty S, Sinhamahapatra P, Ghosh A. Subclinical atherosclerosis and endothelial dysfunction in patients with early rheumatoid arthritis as evidenced by measurement of carotid intima-media thickness and flow-mediated vasodilatation: an observational study. *Semin Arthritis Rheum*. 2012 Apr;41(5):669-75
138. Foster W, Lip GY, Raza K, Carruthers D, Blann AD. An observational study of endothelial function in early arthritis. *Eur J Clin Invest*. 2012 May;42(5):510-6

139. Södergren A, Karp K, Boman K, Eriksson C, Lundström E, Smedby T, Söderlund L, Rantapää-Dahlqvist S, Wällberg-Jonsson S. Atherosclerosis in early rheumatoid arthritis: very early endothelial activation and rapid progression of intima media thickness. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(4):R158
140. Sandoo A, Veldhuijzen van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. Vascular function and morphology in rheumatoid arthritis: a systematic review. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Nov;50(11):2125-39
141. Cardillo C, Schinzari F, Mores N, Mettimano M, Melina D, Zoli A, Ferraccioli G. Intravascular tumor necrosis factor alpha blockade reverses endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Sep;80(3):275-81
142. Irace C, Mancuso G, Fiaschi E, Madia A, Sesti G, Gnasso A. Effect of anti TNFalpha therapy on arterial diameter and wall shear stress and HDL cholesterol. *Atherosclerosis.* 2004 Nov;177(1):113-8
143. Gonzalez-Juanatey C, Testa A, Garcia-Castelo A, Garcia-Porrúa C, Llorca J, Gonzalez-Gay MA. Active but transient improvement of endothelial function in rheumatoid arthritis patients undergoing long-term treatment with anti-tumor necrosis factor alpha antibody. *Arthritis Rheum.* 2004 Jun 15;51(3):447-50
144. Bosello S, Santoliquido A, Zoli A, Di Campli C, Flore R, Tondi P, Ferraccioli G. TNF-alpha blockade induces a reversible but transient effect on endothelial dysfunction in patients with long-standing severe rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2008 Jul;27(7):833-9
145. Bilborough W, Keen H, Taylor A, O'Driscoll GJ, Arnolda L, Green DJ. Anti-tumour necrosis factor-alpha therapy over conventional therapy improves endothelial function in adults with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2006 Oct;26(12):1125-31
146. Capria A, De Nardo D, Baffetti FR, Barbini U, Violo A, Tondo T, Fontana L. Long-term anti-TNF-alpha treatments reverse the endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: the biological coherence between synovial and endothelial inflammation. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010 Jan-Mar;23(1):255-62
147. Sandoo A, Kitas GD, Carroll D, Veldhuijzen van Zanten JJ. The role of inflammation and cardiovascular disease risk on microvascular and macrovascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional and longitudinal study. *Arthritis Res Ther.* 2012 May 17;14(3):R117

148. Kerekes G, Soltész P, Szucs G, Szamosi S, Dér H, Szabó Z, Csáthy L, Váncsa A, Szodoray P, Szegeci G, Szekanez Z. Effects of adalimumab treatment on vascular disease associated with early rheumatoid arthritis. *Isr Med Assoc J.* 2011 Mar;13(3):147-52
149. Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Miranda-Fillooy JA, Gomez-Acebo I, Testa A, Garcia-Porrua C, Sanchez-Andrade A, Llorca J, González-Gay MA. Anti-TNF-alpha-adalimumab therapy is associated with persistent improvement of endothelial function without progression of carotid intima-media wall thickness in patients with rheumatoid arthritis refractory to conventional therapy. *Mediators Inflamm.* 2012
150. Hänsel S, Lässig G, Pistrosch F, Passauer J. Endothelial dysfunction in young patients with long-term rheumatoid arthritis and low disease activity. *Atherosclerosis.* 2003 Sep;170(1):177-80
151. Protogerou AD, Zampeli E, Fragiadaki K, Stamatelopoulos K, Papamichael C, Sfikakis PP. A pilot study of endothelial dysfunction and aortic stiffness after interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis.* 2011 Dec;219(2):734-6
152. Riksen NP, Barrera P, van den Broek PH, van Riel PL, Smits P, Rongen GA. Methotrexate modulates the kinetics of adenosine in humans in vivo. *Ann Rheum Dis.* 2006 Apr;65(4):465-70
153. Hermann F, Forster A, Chenevard R, Enseleit F, Hürlimann D, Corti R, Spieker LE, Frey D, Hermann M, Riesen W, Neidhart M, Michel BA, Hellermann JP, Gay RE, Lüscher TF, Gay S, Noll G, Ruschitzka F. Simvastatin improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Feb 1;45(3):461-4
154. El-Barbary AM, Hussein MS, Rageh EM, Hamouda HE, Wagih AA, Ismail RG. Effect of atorvastatin on inflammation and modification of vascular risk factors in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2011 Feb;38(2):229-35
155. Mäki-Petäjä KM, Booth AD, Hall FC, Wallace SM, Brown J, McEniery CM, Wilkinson IB. Ezetimibe and simvastatin reduce inflammation, disease activity, and aortic stiffness and improve endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Aug 28;50(9):852-8
156. Tikiz C, Utuk O, Pirildar T, Bayturan O, Bayindir P, Taneli F, Tikiz H, Tuzun C. Effects of Angiotensin-converting enzyme inhibition and statin treatment on inflammatory markers and endothelial functions in patients with longterm rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2005 Nov;32(11):2095-101

157. Syngle A, Vohra K, Kaur L, Sharma S. Effect of spironolactone on endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2009 Jan-Feb;38(1):15-22
158. Syngle A, Vohra K, Garg N, Kaur L, Chand P. Advanced glycation end-products inhibition improves endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2012 Feb;15(1):45-55
159. Wong M, Jiang BY, McNeill K, Farish S, Kirkham B, Chowienczyk P. Effects of selective and non-selective cyclo-oxygenase inhibition on endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2007 Jul-Aug;36(4):265-9
160. Ikonomidis I, Lekakis JP, Nikolaou M, Paraskevaidis I, Andreadou I, Kaplanoglou T, Katsimbri P, Skarantavos G, Soucacos PN, Kremastinos DT. Inhibition of interleukin-1 by anakinra improves vascular and left ventricular function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2008 May 20;117(20):2662-9
161. Sidiropoulos PI, Siakka P, Pagonidis K, Raptopoulou A, Kritikos H, Tsetis D, Boumpas DT. Sustained improvement of vascular endothelial function during anti-TNF α treatment in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol*. 2009 Jan-Feb;38(1):6-10
162. Hafström I, Rohani M, Deneberg S, Wörnert M, Jogestrand T, Frostegård J. Effects of low-dose prednisolone on endothelial function, atherosclerosis, and traditional risk factors for atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis--a randomized study. *J Rheumatol*. 2007 Sep;34(9):1810-6
163. Flammer AJ, Sudano I, Hermann F, Gay S, Forster A, Neidhart M, Künzler P, Enseleit F, Périat D, Hermann M, Nussberger J, Luscher TF, Corti R, Noll G, Ruschitzka F. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves vascular function in rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2008 Apr 29;117(17):2262-9
164. Veselinovic MV, Zivkovic VI, Toncev S, Tasic N, Bogdanovic V, Djuric DM, Jakovljevic VLj. Carotid artery intima-media thickness and brachial artery flow-mediated vasodilatation in patients with rheumatoid arthritis. *Vasa*. 2012 Sep;41(5):343-51
165. Galarraga B, Belch JJ, Pullar T, Ogston S, Khan F. Clinical improvement in rheumatoid arthritis is associated with healthier microvascular function in patients who respond to antirheumatic therapy. *J Rheumatol*. 2010 Mar;37(3):521-8.
166. Galarraga B, Khan F, Kumar P, Pullar T, Belch JJ. C-reactive protein: the underlying cause of microvascular dysfunction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Dec;47(12):1780-4

167. Kwaśny-Krochin B, Głuszko P, Undas A. Plasma asymmetric dimethylarginine in active rheumatoid arthritis: links with oxidative stress and inflammation. *Pol Arch Med Wewn.* 2012;122(6):270-6
168. Sandoo A, Dimitroulas T, Veldhuijzen van Zanten JJ, Smith JP, Metsios GS, Nightingale P, Stavropoulos-Kalinoglou A, Kitas GD. Lack of association between asymmetric dimethylarginine and in vivo microvascular and macrovascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2012 May-Jun;30(3):388-96
169. Di Franco M, Spinelli FR, Metere A, Gerardi MC, Conti V, Boccalini F, Iannuccelli C, Ciciarello F, Agati L, Valesini G. Serum levels of asymmetric dimethylarginine and apelin as potential markers of vascular endothelial dysfunction in early rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.* 2012
170. Sandoo A, Dimitroulas T, Toms TE, Hodson J, Veldhuijzen van Zanten JJ, Smith JP, Kitas GD. Clinical remission following treatment with tumour necrosis factor-alpha antagonists is not accompanied by changes in asymmetric dimethylarginine in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 2012
171. Turiel M, Tomasoni L, Sitia S, Cicala S, Gianturco L, Ricci C, Atzeni F, De Gennaro Colonna V, Longhi M, Sarzi-Puttini P. Effects of long-term disease-modifying antirheumatic drugs on endothelial function in patients with early rheumatoid arthritis. *Cardiovasc Ther.* 2010 Oct;28(5):e53-64
172. Hermann C, Assmus B, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000
173. Veale DJ, Maple C, Kirk G, McLaren M, Belch JJ. Soluble cell adhesion molecules--P-selectin and ICAM-1, and disease activity in patients receiving sulphasalazine for active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1998;27(4):296-9
174. Vaudo G, Marchesi S, Gerli R, Allegrucci R, Giordano A, Siepi D, Pirro M, Shoenfeld Y, Schillaci G, Mannarino E. Endothelial dysfunction in young patients with rheumatoid arthritis and low disease activity. *Ann Rheum Dis.* 2004 Jan;63(1):31-5
175. Fang ZY, Fontaine J, Unger P, Berkenboom G. Alterations of the endothelial function of isolated aortae in rats with adjuvant arthritis. *Arch int Pharmacodyn* 1991 ; 311 : 122-30

176. Egan C, Lockhart J, Ferrell W. Pathophysiology of vascular dysfunction in a rat model of chronic joint inflammation. *J Physiol* 2004 ; 1(557) : 635-43
177. Ulker S, Onal A, Hatip FB, Surucu A, Alkanat M, Kosay S, et al. Effect of nabumetone treatment on vascular responses of the thoracic aorta in rat experimental arthritis. *Pharmacology* 2000 ; 60(3) : 136-42
178. Can C, Cinar M, Kosay S, Evinc A. Vascular endothelial dysfunction associated with elevated serum homocysteine levels in rat adjuvant arthritis: effect of vitamine E administration. *Life Sciences* 2002 ; 71(4) : 401-10
179. Haruna Y, Morita Y, Komai N, Yada T, Sakuta T, Tomita N, et al. Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis rheumatism* 2006 ; 54(6) : 1847-55
180. Haruna Y, Morita Y, Yada T, Satoh M, Fox D, Kashihara N. Fluvastatin reverses endothelial dysfunction and increased vascular oxidative stress in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis rheumatism* 2007 ; 56(6) : 1827-35
181. Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1996 May;114(1):107-32
182. Cederbaum SD, Yu H, Grody WW, Kern RM, Yoo P, Iyer RK. Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Genet Metab.* 2004 Apr;81 Suppl 1:S38-44
183. Kanyo ZF, Scolnick LR, Ash DE, Christianson DW. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature.* 1996 Oct 10;383(6600):554-7
184. Cox JD, Kim NN, Traish AM, Christianson DW. Arginase-boronic acid complex highlights a physiological role in erectile function. *Nat Struct Biol.* 1999 Nov;6(11):1043-7
185. Cama E, Colleluori DM, Emig FA, Shin H, Kim SW, Kim NN, Traish AM, Ash DE, Christianson DW. Human arginase II: crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal. *Biochemistry.* 2003 Jul 22;42(28):8445-51
186. Haraguchi Y, Takiguchi M, Amaya Y, Kawamoto S, Matsuda I, Mori M. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Jan;84(2):412-5

187. Mora A, del Ara Rangel M, Fuentes JM, Soler G, Centeno F. Implications of the S-shaped domain in the quaternary structure of human arginase. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Feb 9;1476(2):181-90
188. Scaglia F, Brunetti-Pierri N, Kleppe S, Marini J, Carter S, Garlick P, Jahoor F, O'Brien W, Lee B. Clinical consequences of urea cycle enzyme deficiencies and potential links to arginine and nitric oxide metabolism. *J Nutr*. 2004 Oct;134(10 Suppl):2775S-2782S
189. Méndez JD, Yáñez R, Wong C, Hicks JJ. Uterine arginase inhibition affect the rat embryonic development. *Contraception*. 1986 Jun;33(6):597-604
190. Flynn NE, Wu G. Glucocorticoids play an important role in mediating the enhanced metabolism of arginine and glutamine in enterocytes of postweaning pigs. *J Nutr*. 1997 May;127(5):732-7
191. Kim PS, Iyer RK, Lu KV, Yu H, Karimi A, Kern RM, Tai DK, Cederbaum SD, Grody WW. Expression of the liver form of arginase in erythrocytes. *Mol Genet Metab*. 2002 Jun;76(2):100-10
192. Bruch-Gerharz D, Schnorr O, Suschek C, Beck KF, Pfeilschifter J, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. *Am J Pathol*. 2003 Jan;162(1):203-11
193. Estévez AG, Sahawneh MA, Lange PS, Bae N, Egea M, Ratan RR. Arginase 1 regulation of nitric oxide production is key to survival of trophic factor-deprived motor neurons. *J Neurosci*. 2006 Aug 16;26(33):8512-6
194. Li H, Meininger CJ, Hawker JR Jr, Haynes TE, Kepka-Lenhart D, Mistry SK, Morris SM Jr, Wu G. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Jan;280(1):E75-82
195. Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003 Mar;6(2):223-8
196. Jansen A, Lewis S, Cattell V, Cook HT. Arginase is a major pathway of L-arginine metabolism in nephritic glomeruli. *Kidney Int*. 1992 Nov;42(5):1107-12
197. Cook HT, Jansen A, Lewis S, Largen P, O'Donnell M, Reaveley D, Cattell V. Arginine metabolism in experimental glomerulonephritis: interaction between nitric oxide synthase and arginase. *Am J Physiol*. 1994 Oct;267(4 Pt 2):F646-53

198. Gotoh T, Mori M. Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol.* 1999 Feb 8;144(3):427-34
199. Chang CI, Liao JC, Kuo L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol.* 1998 Jan;274(1 Pt 2):H342-8
200. Buga GM, Singh R, Pervin S, Rogers NE, Schmitz DA, Jenkinson CP, Cederbaum SD, Ignarro LJ. Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *Am J Physiol.* 1996 Nov;271(5 Pt 2):H1988-98
201. Bachetti T, Comini L, Francolini G, Bastianon D, Valetti B, Cadei M, Grigolato P, Suzuki H, Finazzi D, Albertini A, Curello S, Ferrari R. Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Aug;37(2):515-23
202. Chicoine LG, Paffett ML, Young TL, Nelin LD. Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 Jul;287(1):L60-8
203. Zhang C, Hein TW, Wang W, Chang CI, Kuo L. Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. *FASEB J.* 2001 May;15(7):1264-6
204. Hein TW, Zhang C, Wang W, Chang CI, Thengchaisri N, Kuo L. Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. *FASEB J.* 2003 Dec;17(15):2328-30
205. Berkowitz DE, White R, Li D, Minhas KM, Cernetich A, Kim S, Burke S, Shoukas AA, Nyhan D, Champion HC, Hare JM. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation.* 2003 Oct 21;108(16):2000-6
206. Shin W, Berkowitz DE, Ryoo S. Increased arginase II activity contributes to endothelial dysfunction through endothelial nitric oxide synthase uncoupling in aged mice. *Exp Mol Med.* 2012 Aug 2. [Epub ahead of print]

207. Bivalacqua TJ, Burnett AL, Hellstrom WJ, Champion HC. Overexpression of arginase in the aged mouse penis impairs erectile function and decreases eNOS activity: influence of in vivo gene therapy of anti-arginase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Mar;292(3):H1340-51
208. Grönros J, Jung C, Lundberg JO, Cerrato R, Ostenson CG, Pernow J. Arginase inhibition restores in vivo coronary microvascular function in type 2 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Apr;300(4):H1174-81
209. Johnson FK, Johnson RA, Peyton KJ, Durante W. Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Apr;288(4):R1057-62
210. Bagnost T, Ma L, da Silva RF, Rezakhaniha R, Houdayer C, Stergiopoulos N, André C, Guillaume Y, Berthelot A, Demougeot C. Cardiovascular effects of arginase inhibition in spontaneously hypertensive rats with fully developed hypertension. *Cardiovasc Res*. 2010 Aug 1;87(3):569-77
211. Bagnost T, Berthelot A, Bouhaddi M, Laurant P, André C, Guillaume Y, Demougeot C. Treatment with the arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine improves vascular function and lowers blood pressure in adult spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*. 2008 Jun;26(6):1110-8
212. Acquaviva P, Lapousse JC, Recordier AM. Study of the enzymatic activity of pathological synovial fluid in rheumatology. *Mars Med* 1972 ; 109(1) : 35-8
213. Huang LW, Chang KL, Chen CJ, Liu HW. Arginase levels are increased in patients with rheumatoid arthritis. *Kaohsiung J Med Sci* 2001 ; 17(7) : 358-63
214. Corraliza I, Moncada S. Increased expression of arginase II in patients with different forms of arthritis. Implications of the regulation of nitric oxide. *J Rheumatol* 2002 ; 29(11) : 2261-5
215. Sarban S, Isikan UE, Kocabey Y, Kocyigit A. Relationship between synovial fluid and plasma manganese, arginase, and nitric oxide in patients with rheumatoid arthritis. *Biol Trace Elem Res* 2007 ; 115(2) : 97-106
216. Ko AR, Huh YH, Lee HC, Song WK, Lee YS, Chun JS. Identification and characterization of arginase II as a chondrocyte phenotype-specific gene. *IUBMB Life* 2006 ; 58(10) : 597-605

217. Takahashi N, de Jager VC, Glück A, Letzkus M, Hartmann N, Staedtler F, et al. The molecular signature of oxidative metabolism and the mode of macrophage activation determine the shift from acute to chronic disease in experimental arthritis: critical role of interleukin-12p40. *Arthritis Rheum* 2008 ; 58(11) : 3471-84
218. Demougeot C, Prigent-Tessier A, Marie C, Berthelot A. Arginase inhibition reduced endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2005;23: 971–8
219. Demougeot C, Prigent-Tessier A, Bagnost T, Andre C, Guillaume Y, Bouhaddi M, et al. Time course of vascular arginase expression and activity in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2007;80: 1128–34
220. Yang Z, Ming XF. Endothelial arginase: a new target in atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep* 2006;8:54–9
221. Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, El-Remessy AB, Bartoli M, et al. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res* 2008;102:95–102
221. Bivalacqua TJ, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ, Champion HC. Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:923–7
222. Gao X, Xu X, Belmadani S, Park Y, Tang Z, Feldman AM, et al. TNF- α contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1269–75
223. Huynh NN, Harris EE, Chin-Dusting JF, Andrews KL. The vascular effects of different arginase inhibitors in rat isolated aorta and mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 2009;156:84–93
224. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 1994;174:231–35
225. Ryoo S, Gupta G, Benjo A, Lim HK, Camara A, Sikka G, Lim HK, Sohi J, Santhanam L, Soucy K, Tuday E, Baraban E, Ilies M, Gerstenblith G, Nyhan D, Shoukas A, Christianson DW, Alp NJ, Champion HC, Huso D, Berkowitz DE. Endothelial arginase II: a novel target for the treatment of atherosclerosis. *Circ Res.* 2008 Apr 25;102(8):923-32

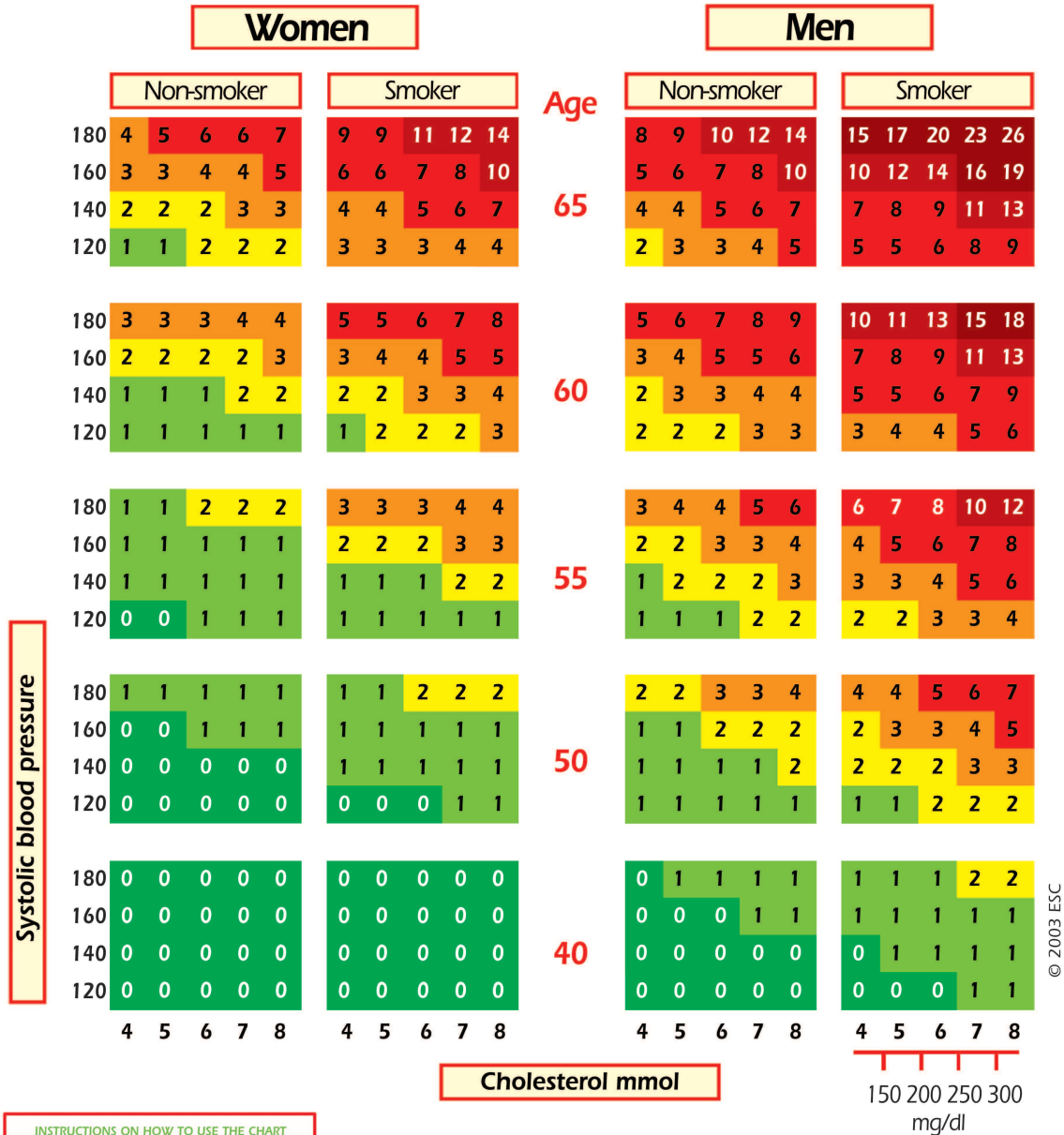
226. Sakuta T, Morita Y, Satoh M, Fox DA, Kashihara N. Involvement of the renin-angiotensin system in the development of vascular damage in a rat model of arthritis: effect of angiotensin receptor blockers. *Arthritis Rheum.* 2010 May;62(5):1319-28
227. Paraskevas KI. Statin treatment for rheumatoid arthritis: a promising novel indication. *Clin Rheumatol.* 2008 Mar;27(3):281-7
228. Ku IA, Imboden JB, Hsue PY, Ganz P. Rheumatoid arthritis: model of systemic inflammation driving atherosclerosis. *Circ J.* 2009 Jun;73(6):977-85
229. Onat A, Direskeneli H. Excess cardiovascular risk in inflammatory rheumatic diseases: pathophysiology and targeted therapy. *Curr Pharm Des.* 2012;18(11):1465-77
230. Siervo M, Corander M, Stranges S, Bluck L. Post-challenge hyperglycaemia, nitric oxide production and endothelial dysfunction: the putative role of asymmetric dimethylarginine (ADMA). *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011 Jan;21(1):1-10
231. González-Gay MA, González-Juanatey C, Miranda-Fillooy JA, García-Unzueta MT, Llorca J. Lack of association between flow-mediated endothelium-dependent vasodilatation and biomarkers of endothelial dysfunction in patients with severe rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2011
232. Reynolds S, Williams A, Williams H, Smale S, Stephenson H, Amos N, George S, O'Donnell V, Lang D. Contractile, but not endothelial, dysfunction in early inflammatory arthritis: a possible role for matrix metalloproteinase-9. *Br J Pharmacol.* 2012 Oct;167(3):505-14
233. Holowatz LA, Thompson CS, Kenney WL. L-Arginine supplementation or arginase inhibition augments reflex cutaneous vasodilatation in aged human skin. *J Physiol.* 2006 Jul 15;574(Pt 2):573-81
234. Santhanam L, Christianson DW, Nyhan D, Berkowitz DE. Arginase and vascular aging. *J Appl Physiol.* 2008 Nov;105(5):1632-42 257 Xu L, Hilliard B, Carmody RJ, Tsabary G, Shin H, Christianson DW, Chen YH. Arginase and autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunology.* 2003 Sep;110(1):141-8
235. Xu L, Hilliard B, Carmody RJ, Tsabary G, Shin H, Christianson DW, Chen YH. Arginase and autoimmune inflammation in the central nervous system. *Imunology.* 2003ep;110(1):141-8

236. Jeyabalan G, Klune JR, Nakao A, Martik N, Wu G, Tsung A, Geller DA. Arginase blockade protects against hepatic damage in warm ischemia-reperfusion. *Nitric Oxide*. 2008 Aug;19(1):29-35
237. Bratt JM, Franzi LM, Linderholm AL, Last MS, Kenyon NJ, Last JA. Arginase enzymes in isolated airways from normal and nitric oxide synthase 2-knockout mice exposed to ovalbumin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Feb 1;234(3):273-80
238. Reid KM, Tsung A, Kaizu T, Jeyabalan G, Ikeda A, Shao L, Wu G, Murase N, Geller DA. Liver I/R injury is improved by the arginase inhibitor, N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Feb;292(2):G512-7
239. Ckless K, Lampert A, Reiss J, Kasahara D, Poynter ME, Irvin CG, Lundblad LK, Norton R, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. Inhibition of arginase activity enhances inflammation in mice with allergic airway disease, in association with increases in protein S-nitrosylation and tyrosine nitration. *J Immunol*. 2008 Sep 15;181(6):4255-64
240. Maarsingh H, Zuidhof AB, Bos IS, van Duin M, Boucher JL, Zaagsma J, Meurs H. Arginase inhibition protects against allergen-induced airway obstruction, hyperresponsiveness, and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Sep 15;178(6):565-73
241. Martins YC, Zanini GM, Frangos JA, Carvalho LJ. Efficacy of different nitric oxide-based strategies in preventing experimental cerebral malaria by *Plasmodium berghei* ANKA. *PLoS One*. 2012;7(2):e32048
242. Kim SH, Langford ML, Boucher JL, Testerman TL, McGee DJ. *Helicobacter pylori* arginase mutant colonizes arginase II knockout mice. *World J Gastroenterol*. 2011 Jul 28;17(28):3300-9
243. Shatanawi A, Romero MJ, Iddings JA, Chandra S, Umapathy NS, Verin AD, Caldwell RB, Caldwell RW. Angiotensin II-induced vascular endothelial dysfunction through RhoA/Rho kinase/p38 mitogen-activated protein kinase/arginase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011 May;300(5):C1181-92
244. Takahashi N, Ogino K, Takemoto K, Hamanishi S, Wang DH, Takigawa T, Shibamori M, Ishiyama H, Fujikura Y. Direct inhibition of arginase attenuated airway allergic reactions and inflammation in a *Dermatophagoides farinae*-induced NC/Nga mouse model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010 Jul;299(1):L17-24

245. Lewis ND, Asim M, Barry DP, Singh K, de Sablet T, Boucher JL, Gobert AP, Chaturvedi R, Wilson KT. Arginase II restricts host defense to *Helicobacter pylori* by attenuating inducible nitric oxide synthase translation in macrophages. *J Immunol*. 2010 Mar 1;184(5):2572-82
246. Kim JH, Bugaj LJ, Oh YJ, Bivalacqua TJ, Ryoo S, Soucy KG, Santhanam L, Webb A, Camara A, Sikka G, Nyhan D, Shoukas AA, Iliés M, Christianson DW, Champion HC, Berkowitz DE. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *J Appl Physiol*. 2009 Oct;107(4):1249-57
247. Kavalukas SL, Uzgaré AR, Bivalacqua TJ, Barbul A. Arginase inhibition promotes wound healing in mice. *Surgery*. 2012 Feb;151(2):287-95
248. Maarsingh H, Dekkers BG, Zuidhof AB, Bos IS, Menzen MH, Klein T, Flik G, Zaagsma J, Meurs H. Increased arginase activity contributes to airway remodelling in chronic allergic asthma. *Eur Respir J*. 2011 Aug;38(2):318-28
249. Giordano E, Hillary RA, Vary TC, Pegg AE, Sumner AD, Caldarera CM, Zhang XQ, Song J, Wang J, Cheung JY, Shantz LM. Overexpression of ornithine decarboxylase decreases ventricular systolic function during induction of cardiac hypertrophy. *Amino Acids*. 2012 Feb;42(2-3):507-18
250. Rotondo R, Bertolotto M, Barisione G, Astigiano S, Mandruzzato S, Ottonello L, Dallegri F, Bronte V, Ferrini S, Barbieri O. Exocytosis of azurophil and arginase 1-containing granules by activated polymorphonuclear neutrophils is required to inhibit T lymphocyte proliferation. *J Leukoc Biol*. 2011 May;89(5):721-7

SCORE - European Low Risk Chart

10 year risk of fatal CVD in low risk regions of Europe by gender, age, systolic blood pressure, total cholesterol and smoking status



Systolic blood pressure

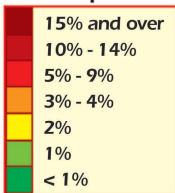
Cholesterol mmol

© 2003 ESC

INSTRUCTIONS ON HOW TO USE THE CHART

- The low risk chart should be used in Belgium, France, Greece, Italy, Luxembourg, Spain, Switzerland and Portugal; the high risk chart should be used in all other countries of Europe.
- To estimate a person's total ten-year risk of CVD death, find the table for their gender, smoking status and age. Within the table find the cell nearest to the person's systolic blood pressure (mmHg) and total cholesterol (mmol/l or mg/dl).
- The effect of lifetime exposure to risk factors can be seen by following the table upwards. This can be used when advising younger people.
- Low risk individuals should be offered advice to maintain their low risk status. Those who are at 5% risk or higher or will reach this level in middle age should be given maximal attention.
- To define a person's relative risk, compare their risk category with that of a non-smoking person of the same age and gender, blood pressure <140/90 mmHg and total cholesterol < 5 mmol/l (190 mg/dl).
- The chart can be used to give some indications of the effect of changes from one risk category to another, for example when the subject stops smoking or reduces other risk factors.

SCORE



10-year risk of fatal CVD in populations at low CVD risk

QUALIFIERS:

Note that total CVD risk may be higher than indicated in the chart:

- as the person approaches the next age category
- in asymptomatic subjects with pre-clinical evidence of atherosclerosis (e.g. CT scan, ultrasonography)
- in subjects with a strong family history of premature CVD
- in subjects with low HDL cholesterol levels, with raised triglyceride levels, with impaired glucose tolerance, and with raised levels of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, apolipoprotein B or Lp(a)
- in obese and sedentary subjects



www.escardio.org/Prevention

"European Guidelines on CVD Prevention: Third Joint European Societies' Task Force on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice
De Backer G., Ambrosioni E., Borch-Johnsen K., et al. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 2003; 10(Suppl 1): S1-S78



