



# Dysfonction endothéliale et polyarthrite rhumatoïde : cinétique, mécanismes et traitements. Etude chez le rat

Perle Totoson

## ► To cite this version:

Perle Totoson. Dysfonction endothéliale et polyarthrite rhumatoïde : cinétique, mécanismes et traitements. Etude chez le rat. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Université de Franche-Comté, 2015. Français. NNT : 2015BESA3013 . tel-01397002

HAL Id: tel-01397002

<https://theses.hal.science/tel-01397002>

Submitted on 15 Nov 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.

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE / FRANCHE-COMTÉ  
École Doctorale Environnement-Santé

## THÈSE

Pour l'obtention du grade de  
**Docteur de l'Université de Franche-Comté**  
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

**« Dysfonction endothéliale et polyarthrite rhumatoïde : cinétique d'évolution, mécanismes et traitements. Étude chez le rat. »**

Préparée au sein de l'équipe d'accueil 4267 « Fonctions et Dysfonctions Epithéliales », à Besançon.

Présentée et soutenue publiquement

par

**Perle TOTOSON**

Le 30 novembre 2015

Devant les membres du Jury :

Madame <b>Nathalie NIEDERHOFFER</b>	Rapporteur	MCU-HDR, Université de Strasbourg.
Madame <b>Isabelle LARTAUD</b>	Rapporteur	PU, Université de Lorraine.
Monsieur <b>Luca SEMERANO</b>	Examinateur	MCU-PH, Université Paris 13.
Monsieur <b>Christophe RIBUOT</b>	Examinateur	PU, Université Joseph Fourier de Grenoble.
Monsieur <b>Daniel WENDLING</b>	Co-directeur	PU-PH, Université de Franche-Comté.
Madame <b>Katy MAGUIN-GATE</b>	Co-encadrant	MCU, Université de Lorraine.
Madame <b>Céline DEMOUGEOT</b>	Directeur	PU, Université de Franche-Comté.

« Il n'y a pas plus grande ni plus constante volupté que la santé du corps et la tranquillité du cœur ».

**Epicure (341-271 av. J.-C)**

*Je dédie ce travail à la famille, l'amour et l'amitié.*

*À mes deux grands-pères paternel et maternel, VERNY et GODROLAHY, paix à leur âme,  
qui m'ont donné le goût du travail bien fait.*

*À mes parents Monique et Paul qui m'ont soutenue de toute leur force.*

*À mon frère Perlin et ma sœur Perlette qui me font totalement confiance.*

*À Alain mon meilleur ami, celui qui m'accompagne tous les jours.*

*À tous mes amis que j'ai rencontrés à Madagascar, en Algérie, en France, à Grenoble, à Besançon,  
avec lesquels à un moment ou à un autre, j'ai appris, et partagé la vie.*

## **Remerciements**

Cette thèse commencée en octobre 2012, est l'aboutissement de trois années de travail. Elle a été réalisée au sein du Laboratoire de Physiologie-Pharmacologie de l'unité EA 4267, à l'UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques de Besançon. Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes qui m'ont encadrée, soutenue, encouragée et qui ont contribué de près ou de loin à son évaluation et à son bon déroulement.

À ma directrice de thèse, le Professeur Céline DEMOUGEOT, merci de m'avoir accordée ta confiance pour mener ce projet. Reçois ma reconnaissance pour ton encadrement, tes conseils, tes compétences et ton dynamisme qui ont contribué à la réussite de cette thèse. J'ai également apprécié ta grande disponibilité et tes qualités humaines durant ces années de travail ensemble. Grâce à toi, j'ai beaucoup appris, je t'en remercie.

À Katy MAGUIN-GATE, qui a co-encadré ce projet, et avec qui j'ai partagé des journées entières de manipulations de vaisseaux. Merci pour tes conseils, et pour ta rigueur qui n'a pas empêché ta grande simplicité. Tu m'as énormément soutenue dans les difficultés techniques rencontrées.

Je m'adresse aussi au Professeur Daniel WENDLING : merci pour votre soutien et encouragement tout au long du projet. Mes travaux de recherche fondamentale avaient quand même plus de sens quand je savais possible de partager avec vous ses retombées cliniques.

Aux Docteurs et Professeurs Nathalie NIEDERHOFFER, Isabelle LARTAUD, Luca SEMERANO, Christophe RIBUOT. Merci pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury en tant que rapporteur et examinateur, malgré vos impératifs professionnels et vos multiples occupations.

Merci plus particulièrement à Christophe RIBUOT et Marie JOYEUX, qui m'ont accompagnée dans mes premières expériences de recherche, lors de mon stage de Master 2 au sein de l'équipe HP2 à Grenoble, qui m'ont parrainée pour mon insertion au sein de la Société Française de Pharmacologie, et qui m'ont réellement soutenue lors de ma recherche de laboratoire et du financement de thèse.

Ma profonde gratitude va au Professeur Anne TESSIER ainsi qu'à toute l'équipe INSERM U1093 de Dijon, pour leur soutien et leur collaboration durant mes manipulations de « Western Blot ».

Je n'oublie pas mes chers collègues enseignants-chercheur Sylvie DEVAUX, Johnny MORETTO qui m'ont témoigné leur passion pour ce métier. À Maude TOURNIER qui a participé avec enthousiasme à mes travaux et qui m'a gentiment nourrie durant les périodes « critiques » de rédaction, merci, je me suis sentie entourée. À Sonia GIRARDOT pour les discussions animées qui ont rendu agréable le quotidien au laboratoire.

À tous les collègues et doctorants « du dessus » : les spécialistes en pharmacognosie, en chimie, en galénique et en toxicologie.

À tous les collègues rhumatologues du CHRU Minjoz de Besançon.

À tous les techniciens, les agents administratifs et les agents de services, discrets, modestes, mais sans lesquels une équipe de recherche ne pourrait pas fonctionner.

À vous tous, je dis ...MERCI.

**« Ny hazo hono no ho vanon-ko lakana, dia satria ny tany naniriany no tsara”**  
Proverbe Malgache.

Traduction: « L'arbre a grandi, muri (*se dit lorsque l'on va pouvoir utiliser son tronc pour fabriquer une pirogue*), c'est parce que la terre où il a poussé (évolué) était bonne et fertile ».

## Table des matières

Table des matières .....	i
Liste des abréviations .....	iii
Liste des figures .....	iv
Liste des tableaux .....	iv
Liste des productions scientifiques liées à la thèse .....	v
Résumé / Abstract .....	vii
<b>Introduction générale .....</b>	<b>1</b>

### **1<sup>er</sup> Partie : Données bibliographiques**

<b>Chapitre I. La polyarthrite rhumatoïde .....</b>	<b>3</b>
I.1 Epidémiologie et étiologie de la polyarthrite rhumatoïde.....	3
I.2 Physiopathologie.....	4
I.2.1 Phase d'initiation .....	4
I.2.2 Phase de recrutement et inflammation .....	4
I.2.3 Phase de destruction articulaire .....	6
I.3 Symptomatologie et diagnostic .....	7
I.3.1 Manifestations cliniques de la polyarthrite rhumatoïde.....	7
I.3.2 Diagnostics différentiels .....	10
I.3.3 Examens complémentaires .....	10
I.4 Evaluation de l'activité de la polyarthrite rhumatoïde .....	13
I.4.1 Disease Activity Score 28 .....	13
I.4.2 Simplified Disease Activity Index .....	14
I.4.3 Health Assessment Questionnaire .....	14
I.4.4 Facteurs pronostiques d'une sévérité de la polyarthrite rhumatoïde.....	15
I.5 Prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde .....	16
I.5.1 Les différents types de traitements .....	16
I.5.2 Recommandations de la Société Française de Rhumatologie (2014) .....	19
<b>Chapitre II. La polyarthrite rhumatoïde et le risque cardiovasculaire .....</b>	<b>23</b>
II.1 Prévalence .....	23
II.2 Pathologies cardiovasculaires du patient polyarthritique.....	24
II.3 Origines de l'augmentation du risque cardiovasculaire .....	24
II.3.1 Facteurs de risque « traditionnels » .....	24
II.3.2 Athérosclérose .....	26
II.3.3 Inflammation systémique .....	27
II.3.4 Effets délétères des traitements utilisés dans la PR .....	28
II.4 Evaluation clinique et prise en charge du risque cardiovasculaire dans la polyarthrite rhumatoïde.....	30
<b>Chapitre III. La dysfonction endothéliale dans la polyarthrite rhumatoïde.....</b>	<b>32</b>
III.1 Physiologie de l'endothélium .....	32
III.1.1 Les différents lits vasculaires : structure et fonction .....	32
III.1.2 Rôle de l'endothélium vasculaire .....	34
III.1.3 Les facteurs vasomoteurs endothéliaux .....	34
III.2 Définition de la dysfonction endothéliale .....	37
III.2.1 Mesure de la fonction endothéliale chez l'Homme .....	37
III.2.2 Dysfonction endothéliale et risque cardiovasculaire de la population générale....	40
III.3 Dysfonction endothéliale au cours de la polyarthrite rhumatoïde : données cliniques.....	41
III.3.1 Généralités .....	41
III.3.2 La dysfonction endothéliale selon les lits vasculaires.....	42
III.3.3 Les mécanismes impliqués dans le développement de la dysfonction endothéliale en cas de polyarthrite rhumatoïde .....	43

III.3.4 Effets des traitements de la polyarthrite rhumatoïde sur la dysfonction endothéiale .....	46
III.4 Dysfonction endothéiale au cours de la polyarthrite rhumatoïde : données expérimentales .....	49
III.4.1 Modèles animaux de la polyarthrite rhumatoïde.....	49
III.4.2 Mesure de la fonction endothéiale chez l'animal .....	56
III.4.3 Dysfonction endothéiale dans les modèles animaux de la polyarthrite rhumatoïde : revue de la littérature.....	64
III.4.4 Revue dans <i>Arthritis Research &amp; Therapy</i> .....	66

## **2<sup>ème</sup> Partie : Travaux personnels**

A- Objectifs de la thèse .....	77
B- Travaux personnels .....	79
<b>1<sup>ère</sup> étude : Cinétique des dysfonctions endothéliales macro/microvasculaire dans le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant .....</b>	79
I. Contexte et objectifs .....	80
II. Méthodologie .....	80
III. Principaux résultats .....	82
<b>Publication 1</b> .....	83
<b>2<sup>ème</sup> étude : Mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéiale macrovasculaire dans le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant .....</b>	95
I. Contexte et objectifs .....	97
II. Méthodologie .....	97
III. Principaux résultats .....	98
<b>Publication 2</b> .....	99
<b>3<sup>ème</sup> étude : Effets de l'Etanercept sur la dysfonction endothéiale dans le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant.....</b>	129
I. Contexte et objectifs .....	131
II. Méthodologie .....	132
III. Principaux résultats .....	133
<b>Publication 3</b> .....	134
<b>3<sup>ème</sup> Partie : Discussion générale et perspectives</b>	
Discussion et perspectives .....	167
<b>Références bibliographiques</b> .....	173

## Liste des abréviations

<b>Ach</b>	Acétylcholine	<b>MAP kinases</b>	Mitogen-activated protein kinases
<b>ACPA</b>	Anti-Citrullinated Peptide Antibody	<b>MCP -1</b>	Monocyte chemoattractant protein-1
<b>ACR</b>	American College of Rheumatology	<b>MIP-1</b>	Macrophage inflammatory protein-1
<b>ADMA</b>	Asymmetric dimethylarginine	<b>MTX</b>	Methotrexate
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate		
<b>AIA</b>	Adjuvant-induced arthritis	<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>AINS</b>	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens	<b>NO</b>	Nitric oxide
<b>AMPc</b>	Adénosine monophosphate cyclique	<b>NOS</b>	Nitric oxide synthase
<b>ANGII</b>	Angiotensine II		
<b>AVC</b>	Accident vasculaire cérébral	<b>OPG</b>	Ostéoprotégérine
<b>BH<sub>4</sub></b>	tétrahydrobioptérine	<b>PAS</b>	Pression artérielle systolique
<b>CEC</b>	Cellules endothéliales matures circulantes	<b>PAD</b>	Pression artérielle diastolique
<b>CEP</b>	Cellules progénitrices de l'endothélium	<b>PGI2</b>	Prostacycline
<b>CIA</b>	Collagen-induced arthritis	<b>PR</b>	Polyarthrite Rhumatoïde
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité	<b>RANKL</b>	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand
<b>CML</b>	Cellule musculaire lisse		
<b>COX-2</b>	Cyclooxygénase II	<b>SC</b>	Sous-cutané
<b>CPA</b>	Cellules présentatrices d'antigènes	<b>SCORE</b>	Systemic Coronary Risk Estimation
<b>CRP</b>	Protéine C Réactive	<b>SDAI</b>	Simplified Disease Activity Index
<b>CV</b>	Cardiovasculaire	<b>SFR</b>	Société Française de Rhumatologie
<b>DAS28</b>	Disease Activity Score 28	<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>DE</b>	Dysfonction endothéliale		
<b>DMARD</b>	Disease-modifying anti-rheumatic drug	<b>VCAM</b>	Vascular cell adhesion molecule
<b>EDHF</b>	Endothelium-derived hyperpolarizing factor	<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>ET-1</b>	Endotheline 1	<b>VS</b>	Vitesse de Sédimentation globulaire
<b>EULAR</b>	European League Against Rheumatism		
<b>FR</b>	Facteur rhumatoïde		
<b>FDRCV</b>	Facteur de risque cardiovasculaire		
<b>FMD</b>	Flow-mediated-dilation		
<b>GMPc</b>	Guanosine monophosphate cyclique		
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate		
<b>ICAM</b>	InterCellular adhesion molecule		
<b>IFN</b>	Interféron		
<b>IL</b>	Interleukine		
<b>IM</b>	Intramusculaire		
<b>IV</b>	Intraveineux		
<b>LDL</b>	Low density lipoprotein		

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Schéma général récapitulatif de la physiopathologie de la PR .....	5
<b>Figure 2.</b> Destruction ostéoarticulaire au cours de la PR .....	6
<b>Figure 3.</b> Atteinte inflammatoire précoce de la main dans une PR débutante .....	7
<b>Figure 4.</b> Exemples des déformations dans une PR ancienne .....	9
<b>Figure 5.</b> Radiographie de la face de la main droite et du poignet .....	11
<b>Figure 6.</b> Les 28 sites articulaires proposés par l'EULAR pour calculer le DAS28 .....	13
<b>Figure 7.</b> Critères de classification de la PR selon les collèges américains et européens .....	19
<b>Figure 8.</b> Algorithme de prise en charge de la PR en 2014 selon les recommandations de la Société française de rhumatologie .....	22
<b>Figure 9.</b> Evaluation du risque cardiovasculaire : modèle SCORE .....	30
<b>Figure 10.</b> Les différentes tuniques de la paroi vasculaire .....	33
<b>Figure 11.</b> Production endothéliale de NO et son action sur la cellule musculaire lisse .....	36
<b>Figure 12.</b> Méthodes de mesure clinique de la fonction endothéliale selon les lits vasculaires.....	39
<b>Figure 13.</b> Les facteurs potentiellement impliqués dans l'installation de la DE dans la PR.....	46
<b>Figure 14.</b> Photographies représentant différentes atteintes et évolutions cliniques dans le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant .....	51
<b>Figure 15.</b> Histologie des articulations de la cheville dans le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant au 14 <sup>ème</sup> jour après l'induction de l'arthrite .....	52
<b>Figure 16.</b> Radiographie des pattes dans le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant 33 jours après l'induction de l'arthrite .....	52
<b>Figure 17.</b> Montage technique de la réactivité vasculaire sur anneau aortique isolé .....	57
<b>Figure 18.</b> Les composants du myographe de Mulvany .....	58
<b>Figure 19.</b> Photos du système de Mulvany selon la marque Danish Myo Technology ® .....	58
<b>Figure 20.</b> Schéma de l'artériographe de Halpern .....	61
<b>Figure 21.</b> Schéma représentatif de la proportion NO/EDHF selon les lits vasculaires .....	62
<b>Figure 22.</b> Effet du TNF- $\alpha$ sur la fonction endothéliale et mécanismes potentiellement impliqués...131	

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Principaux traitements de fond de la PR, effets secondaires, surveillance .....	18
<b>Tableau 2.</b> Les différents types de vaisseaux sanguins : fonction et structure .....	33
<b>Tableau 3.</b> Effets des biothérapies sur la fonction endothéliale dans la PR .....	47
<b>Tableau 4.</b> Comparaison des caractéristiques des modèles expérimentaux d'arthrite : AIA (rat), CIA (souris) avec la PR chez l'Homme .....	54

## Liste des productions scientifiques liées au projet de thèse

Publications dans des journaux internationaux à comité de lecture : 2 acceptées, 2 soumises.

1. **Totoson P**, Maguin-Gaté K, Prigent-Tessier A, Monnier A, Verhoeven F, Marie C, Wendling D, Demougeot C. Etanercept Improves Endothelial Function in Rheumatoid Arthritis: Mechanisms Involved. Soumise à *Rheumatology* (FI 4.475) en octobre 2015.
2. **Totoson P**, Maguin-Gaté K, Nappey M, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis: Mechanistic Insights and Link with Systemic Inflammation. Soumise à *Plos One* (FI 3.354) en septembre 2015.
3. **Totoson P**, Maguin-Gaté K, Nappey M, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Microvascular abnormalities in Adjuvant-Induced Arthritis: Relationship with Macrovascular Endothelial Function and Markers of Endothelial Activation. *Arthritis & Rheumatology*, 2015; 67:1203-1213 (FI 7.764).
4. **Totoson P**, Maguin-Gaté K, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Mechanisms of endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies. (Revue) *Arthritis Research & Therapy*, 2014, 16:R22. (FI 4.12)

Communications à des Congrès Internationaux (dont 1 orale)

1. **Totoson P**, Maguin-Gaté K, Tessier A, Monnier A, Marie C, Verhoeven F, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Cardiovascular effects of Etanercept in an animal model of rheumatoid arthritis: mechanisms involved. Accepté à *ACR/ARHP Annual Scientific Meeting, San Francisco, USA, November 2015*. (poster presentation)
2. Verhoeven F, Maguin-Gaté K, **Totoson P**, Prati C, Wendling D, Demougeot C. High dose glucocorticoids are not deleterious for endothelial function in rheumatoid arthritis: mechanistic insights in adjuvant-induced arthritis. *European Congress of Rheumatology EULAR, Rome, juin 2015*. (written communication)
3. **Totoson P**, Maguin-Gaté K, Nappey M, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Time-course of Microvascular versus Macrovascular Endothelial Dysfunction in Rat Adjuvant-Induced Arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2014;73:849, *European Congress of Rheumatology EULAR, Paris, juin 2014*. (written communication)
4. **Totoson P**, Maguin-Gaté K, Nappey M, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Effect of Etanercept on Endothelial Dysfunction in Rat Adjuvant-Induced Arthritis. *ACR/ARHP Annual Scientific Meeting, Boston, USA, November 2014*. (poster presentation)
5. Verhoeven F, Maguin-Gaté K, **Totoson P**, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Glucocorticoids and vascular function in Arthritis:Benefic or deleterious effects? Study in rat. *ACR/ARHP Annual Scientific Meeting, Boston, USA, November 2014*. (poster presentation)
6. **Totoson P**, Maguin-Gaté K, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Mechanisms of endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies. *9th International Congress on Autoimmunity, Nice, mars 2014, Abstract 278*. (oral communication)

Communications à des Congrès Nationaux (dont 2 orales)

1. **Totoson P**, Maguin-Gaté K, Monnier A, Tessier A, Marie C, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Etanercept improves endothelial function in Rat Adjuvant-Induced Arthritis: mechanisms involved. *Fundamental & Clinical Pharmacology 2015; 29:2, congrès de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique, Caen, mars 2015* (Communication orale)
2. **Totoson P**, Maguin-Gaté K, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Effet de l'Etanercept sur la dysfonction endothéliale associée à la Polyarthrite Rhumatoïde: étude chez le rat. *Congrès Société Française de Rhumatologie, Paris, Décembre 2014 ; Revue du Rhumatisme 2014, 81 :A130.* (Poster)
3. Verhoeven F, Maguin-Gaté K, **Totoson P**, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Glucocorticoïdes et fonction vasculaire en cas de polyarthrite rhumatoïde : Effets bénéfiques ou délétères ? Etude chez le rat. *Congrès Société Française de Rhumatologie, Paris, Dcembre 2014 ; Revue du Rhumatisme 2014, 81 :A289.* (Poster)
4. **Totoson P**, Maguin-Gaté K., Wendling D, Demougeot C. Time-course and mechanisms of macrovascular endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: a study in rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology 2014, 28:30. Congrès de physiologie, de pharmacologie et de thérapeutique, Poitiers, avril 2014* (poster)
5. Maguin-Gaté K., **Totoson P**, Nappey M, Wendling D, Demougeot C. How Early Does Microvascular Dysfunction Appear in Rat Adjuvant-Induced Arthritis? *Fundamental & Clinical Pharmacology 2014, 28:30. Congrès de physiologie, de pharmacologie et de thérapeutique, Poitiers, avril 2014* (poster)
6. **Totoson P**, Maguin-Gaté K, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Cinétique et mécanismes de la dysfonction endothéliale dans la polyarthrite rhumatoïde, étude chez le rat. *Forum des Jeunes Chercheurs (FJC), Besançon, juin 2014.* (Communication orale)
7. **Totoson P**, Maguin-Gaté K., Wendling D, Demougeot C. La dysfonction endothéliale est-elle d'apparition précoce dans la polyarthrite rhumatoïde ? Etude chez le rat. *Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, juin 2013.* (poster)

## Résumé

La polyarthrite rhumatoïde (PR) représente le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. En plus d'une atteinte ostéo-articulaire responsable de l'invalidité fonctionnelle, la PR est associée à une surmortalité d'origine cardiovasculaire (CV). Les données récentes de la littérature identifient la dysfonction endothéliale (DE) comme la pierre angulaire du processus athéromateux et des complications CV au cours de la PR. Cependant, la physiopathologie et les possibilités thérapeutiques de cette DE sont mal connues. L'objectif de mon travail a été d'étudier la cinétique de la DE au cours de la PR, la différence de sa survenue entre les lits macrovasculaire et microvasculaire, le lien entre la DE et des marqueurs circulants d'inflammation ou d'activation endothéliale, et l'impact de l'Etanercept, un anti-TNF $\alpha$  utilisé comme traitement de fond de la PR, sur la DE. Les expériences ont été réalisées sur le modèle d'Arthrite Induite à l'Adjuvant (AIA) chez le rat Lewis, la fonction endothéliale étant étudiée sur des anneaux aortiques isolés (macrocirculation) ou des artères mésentériques isolées (microcirculation).

Dans la première étude, nous avons montré que la DE microvasculaire est d'apparition plus précoce que la DE macrovasculaire (premiers symptômes d'arthrite versus inflammation maximale), et plus durable. Les taux circulants de CRP, ICAM-1 et VCAM-1 ne peuvent pas être utilisés comme marqueurs de DE dans l'arthrite.

Dans la deuxième étude, nos résultats ont montré que, malgré l'absence de DE aortique au stade précoce de l'arthrite (premiers symptômes d'arthrite), les anomalies endothéliales sont déjà présentes mais initialement compensées par une augmentation de l'activité de la NOS. Nous avons identifié l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et le MIP-1 $\alpha$  plasmatiques comme des marqueurs circulants potentiels de la DE macrovasculaire dans la PR.

Notre troisième étude a démontré la capacité d'un traitement curatif par Etanercept : un anti TNF- $\alpha$ , à améliorer la fonction endothéliale dans le modèle AIA, indépendamment de son impact sur les facteurs traditionnels de risque CV et sur la sévérité de la maladie.

En conclusion, nos travaux ont permis de mieux comprendre la DE en cas d'arthrite, et ont apporté des éléments qui ouvrent des perspectives diagnostiques et thérapeutiques pour une meilleure prise en charge du risque CV du patient PR.

---

## Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common systemic autoimmune disease which is associated with excessive cardiovascular (CV) mortality and morbidity. Endothelial dysfunction (ED) has been identified as a key element in the development of atherosclerosis and CV complications in RA. However, both pathophysiology and therapeutic options of ED are still ill-defined. In this work we aimed to determine the time-course of ED in RA, the differences of ED between macro- and microvasculature, the link between ED and circulating markers of inflammation or endothelial activation, and the effect of an anti-TNF $\alpha$  agent, Etanercept, for reversing ED. Experiments have been conducted on the model of adjuvant-induced arthritis (AIA) in Lewis rats. Endothelial function was assessed in isolated aortic rings (macrovasculature) and in isolated mesenteric arteries (microvasculature).

In a first study, we showed that ED occurred earlier in microvascular bed (first symptoms of arthritis) than in macrovascular bed (at maximal inflammation), and is more sustainable. Circulating levels of CRP, ICAM-1 and VCAM-1 cannot be used as markers of ED in arthritis.

In a second study, we characterized the mechanisms involved in ED in AIA rats. Our results showed that despite the absence of aortic ED in the early stage of arthritis (first symptoms of arthritis), endothelial abnormalities are already present but initially compensated by an increase in NOS activity. We identified plasma levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  as potential circulating markers of macrovascular ED in RA.

Our third study demonstrated the ability of a curative treatment with Etanercept, an anti-TNF $\alpha$ , to improve endothelial function in the AIA model, regardless its impact on traditional CV risk factors and on the severity of the disease.

In conclusion, our results led to improve the understanding of ED in case of arthritis. They provide diagnostic and therapeutic perspectives to enhance the management of CV risk in RA patients.

## Introduction générale

La polyarthrite rhumatoïde (PR) représente le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques et la plus fréquente des maladies auto-immunes. Outre les atteintes articulaires responsables de l'invalidité fonctionnelle, la PR se caractérise par une incidence élevée de maladies cardiovasculaires (CV) responsables d'une réduction de l'espérance de vie d'environ 5 à 10 ans par rapport à la population générale. Depuis 2010, la Société Européenne de Rhumatologie (EULAR) a reconnu la PR comme un facteur indépendant de risque CV, et a édité les premières recommandations concernant le diagnostic et la prise en charge du risque CV. Cependant, cette prise de conscience de la communauté rhumatologique a permis de constater le manque de données scientifiques de haut niveau de preuve dans ce domaine tant cliniques qu'expérimentales. La prise de conscience a également mis en évidence le besoin d'intensifier les recherches visant à comprendre et à enrayer les mécanismes impliqués dans les complications CV de la PR.

Les études cliniques ont identifié chez le patient arthritique l'existence d'une dysfonction endothéliale (DE) à l'étage macrovasculaire (vaisseaux de conductance), qui constitue le *primum movens* du processus d'athérogénèse. Cependant, il n'est pas exclu que la DE macrovasculaire s'accompagne d'une DE à l'étage microvasculaire (vaisseaux de résistance) qui pourrait quant à elle être impliquée dans le développement de dysfonctions cardiaques ou rénales, et pourrait constituer un marqueur plus précoce des atteintes cardiovasculaires que la DE macrovasculaire. Même si ces données font de la DE la cible de stratégies médicamenteuses pour réduire le risque CV du patient arthritique, certains points essentiels sont à élucider avant d'envisager des thérapeutiques adaptées notamment le moment d'apparition de la DE et son évolution au cours de la maladie, le lien entre la DE et les poussées inflammatoires, les mécanismes biochimiques sous-jacents. Par ailleurs, alors que l'arsenal thérapeutique pour le traitement de fond de la PR s'est largement étoffé dans les 15 dernières années avec l'avènement des biothérapies, permettant ainsi une amélioration considérable des symptômes articulaires, l'effet de ces traitements sur la fonction vasculaire est encore très mal connu.

Ce travail de thèse a eu pour objectifs d'étudier ces différents aspects physiopathologiques et pharmacologiques sur le modèle d'arthrite induite à adjuvant (AIA) chez le rat Lewis. Les travaux antérieurs du Laboratoire ont permis d'identifier sur ce modèle l'existence d'une DE au niveau aortique lors de la phase inflammatoire aiguë. Les expériences conduites dans le cadre de cette thèse ont visé à caractériser la cinétique de la DE à l'étage micro et macrovasculaire aux différents stades de l'arthrite, à identifier des éléments physiopathologiques permettant de comprendre les mécanismes qui sous-tendent le développement de la DE et à étudier l'impact d'un anti-TNF $\alpha$ , l'étanercept, sur la DE. Les résultats obtenus pourraient permettre d'améliorer la prise en charge CV du patient arthritique, tant sur le plan diagnostique que pharmacologique.



**1<sup>ère</sup> partie :**

**Données bibliographiques**



## I.1 Epidémiologie et étiologie de la polyarthrite rhumatoïde

L'existence de la polyarthrite rhumatoïde (PR) remonterait à très longtemps. Des textes anciens d'Hippocrate décriraient déjà des signes articulaires semblables à celles de la PR. Les premières déclarations en Europe seraient apparues au début du 17<sup>ème</sup> siècle. Sur un autoportrait familial aujourd'hui exposé au musée Prado de Madrid, le peintre flamand Jacobs Jordaeus [1593-1678] peint la main de sa femme avec des déformations proches de celles de la PR. Le médecin anglais Thomas Sydenham [1624-1689] lui aussi publia un rapport de cas en 1676<sup>1</sup>.

En France, Augustin-Jacob Landré-Beauvais [1772-1840], en 1800, la décrit dans sa thèse de docteur en médecine, elle était appelée alors « goutte asthénique primitive », car à cette époque toute articulation inflammatoire était dénommée « goutte ». Jean-Martin Charcot [1825-1893] s'y intéressa dans sa thèse en 1853 et la fit entrer dans les « Rhumatismes inflammatoires chroniques ». Il faudra attendre 1931, pour que trois jeunes rhumatologues français Florent Coste, Jacques Forestier et Jean Lacapère, définissent une nouvelle entité « la polyarthrite chronique évolutive ». Cette appellation sera conservée jusque dans les années 1960 où le nom de « Polyarthrite Rhumatoïde » apparaît<sup>2</sup>.

Aujourd'hui, la PR représente le plus fréquent et le plus sévère des rhumatismes inflammatoires chroniques avec une prévalence estimée entre 0,3 à 1% de la population générale adulte. L'âge moyen de début est de 50 ans. Elle est classée parmi les maladies auto-immunes en raison de nombreux signes d'auto-réactivité, tels la présence d'autoanticorps rapportée dans 70 à 90% des cas. Elle entraîne une destruction articulaire progressive et des répercussions fonctionnelles, psychologiques, sociales et professionnelles parfois graves pour le patient. Il s'agit aussi d'une maladie systémique puisqu'elle occasionne des manifestations extra-articulaires délétères<sup>3</sup>.

Plusieurs facteurs participent au déclenchement de la maladie notamment un terrain génétique prédisposé, des facteurs hormonaux et environnementaux. En effet, l'association de la PR au polymorphisme des molécules HLA a été identifiée et il existe aussi des cas familiaux. De plus, cette maladie prédomine chez la femme et survient majoritairement en période péri-ménopausique. Cette contribution hormonale se traduit également par une rémission quasi constante pendant la grossesse, et souvent par une poussée au décours de l'accouchement. Le tabagisme reste un facteur environnemental important. Ainsi, ces facteurs activent une réponse immunitaire innée et acquise incontrôlée à l'origine d'un syndrome inflammatoire, d'une atteinte articulaire (érosions, déformations, voire destructions) et des manifestations extra-articulaires. L'évolution de la PR se caractérise par des poussées, qui en l'absence de prise en charge, peuvent entraîner un handicap majeur. Les causes de mortalité dans la PR sont essentiellement d'origine CV ou infectieuse<sup>4</sup>.

## I.2 Physiopathologie<sup>5-7</sup>

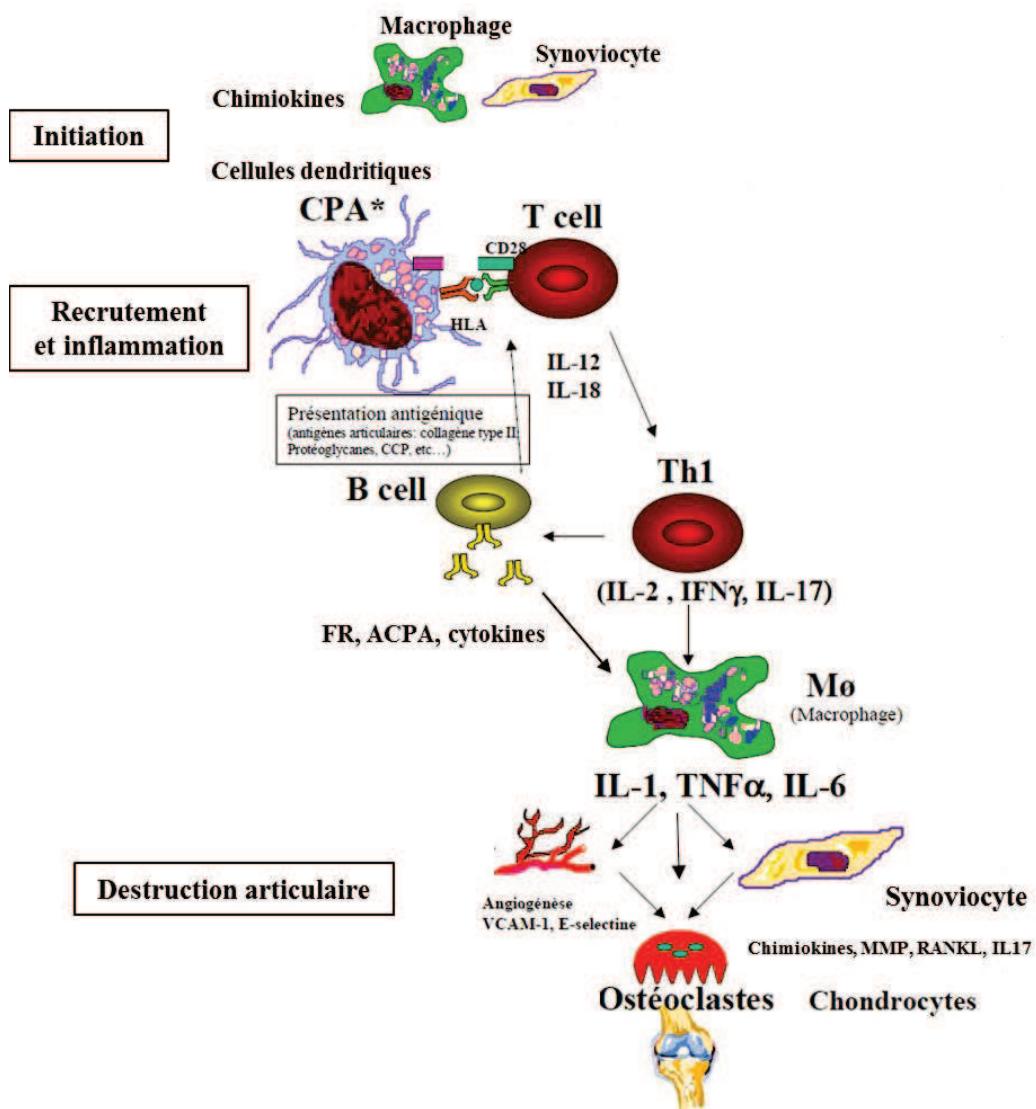
Bien que l'étiologie exacte de la maladie reste inconnue, les connaissances de la pathogénie de la PR ont progressé de manière importante au cours de ces dernières années<sup>8</sup>. L'inflammation de la membrane synoviale constitue la lésion élémentaire à l'origine de la destruction articulaire. Elle est liée à des anomalies de l'immunité à médiation cellulaire, avec activation des lymphocytes T et s'installe suivant plusieurs phases très intriquées : initiation, recrutement et inflammation, destruction articulaire (**Figure 1**). Pour une meilleure présentation, chaque phase est détaillée individuellement et de manière schématique ci-dessous.

### I.2.1 Phase d'initiation

La membrane synoviale normale est constituée d'un tissu conjonctif lâche avec une monocouche bordante de synoviocytes pouvant être de type fibroblastique (rôle nourricier du cartilage) ou macrophagique (rôle phagocytaire). Le premier événement à l'origine de la synovite serait une réponse inflammatoire « non spécifique » à un stimulus encore non identifié. Les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les mastocytes sont attirés dans la membrane synoviale par des chimiokines telles que le monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), le macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1), le CCL-5 (RANTES) et l'interleukine-8 (IL-8). Cette accumulation cellulaire aboutit à une production de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 (IL-1), le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine-6 (IL-6). Les peptides antigéniques qui déclenchaient spécifiquement la PR demeurent inconnus. On tend actuellement à incriminer des autoantigènes situés dans l'articulation (collagène de type II, protéoglycans, protéines de la matrice) ainsi que des peptides d'origine exogène, issus de bactéries ou de virus.

### I.2.2 Phase de recrutement et inflammation

Au niveau synovial, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA ou *APC en anglais*) interagissent *in situ* avec les lymphocytes T en leur présentant des peptides antigéniques associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. La réaction lymphocytaire CD4+ induit une réponse immunitaire de type Th1 à forte production d'interféron gamma (IFN $\gamma$ ), d'interleukine-2 (IL-2) ou d'interleukine-17 (IL-17) et active les lymphocytes B en plasmocytes. Les lymphocytes B participent ainsi à la présentation antigénique, à l'interactivation des lymphocytes T, à la production d'auto-anticorps comme le facteur rhumatoïde (FR) et les anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA); et à la production de cytokines inflammatoires.



**Figure 1.** Schéma général récapitulatif de la physiopathologie de la PR. *Figure issue du cours de Bernard Combe « De l'immunopathologie aux traitements de la polyarthrite rhumatoïde », Immunorhumatologie, Hôpital Lapeyronie, CHU de Montpellier - Université Montpellier I, janvier 2008*<sup>9</sup>.

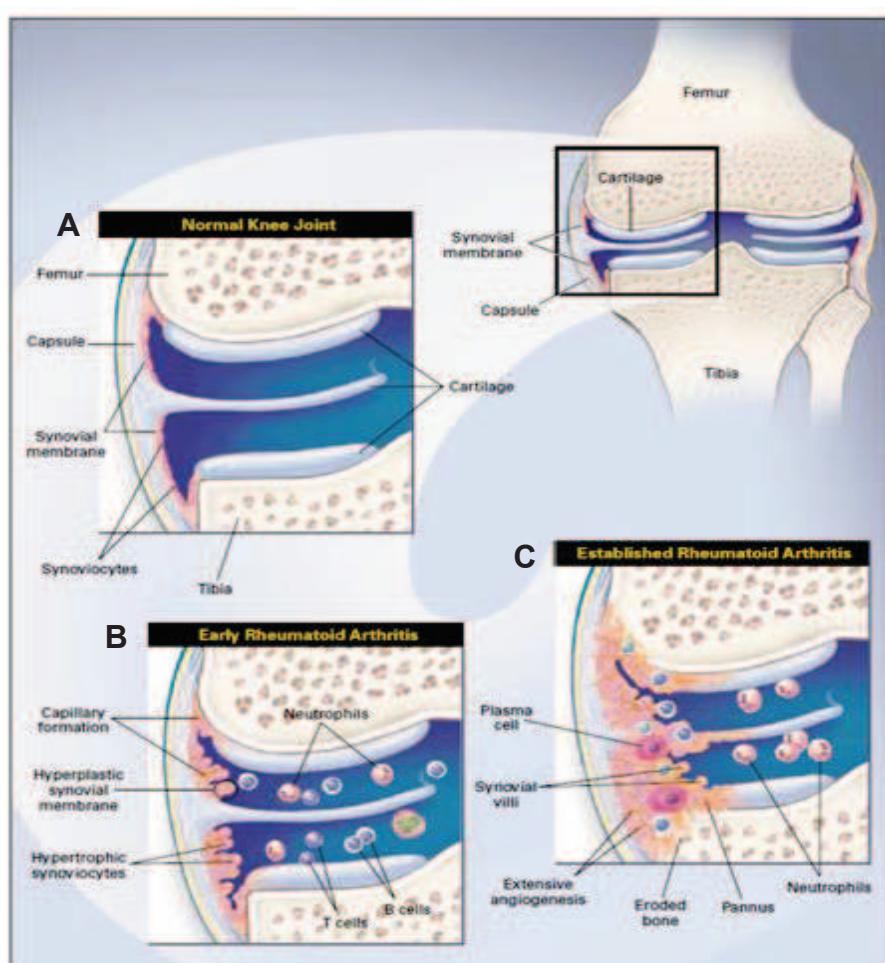
#### Rôle des cytokines :

Il existe dans l'articulation rhumatoïde un déséquilibre entre les cytokines à action pro inflammatoire, tels que le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , IL-17 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'interleukine 1 (IL-1RA), qui sont présents en quantité insuffisante et ne peuvent bloquer l'action des premières. Ces cytokines et leurs récepteurs constituent des cibles thérapeutiques importantes. Des cytokines favorisant l'angiogenèse, la prolifération et l'adhésion cellulaire sont également présentes dans la membrane synoviale comme le Transforming Growth Factor  $\beta$ , le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), le Platelet-Derived Growth Factor, le Fibroblast Growth Factors 1 and 2 (FGF-1 et 2), le vascular cell adhesion molecule (VCAM) et les Sélectines<sup>7</sup>.

### I.2.3 Phase de destruction articulaire

Deux principaux mécanismes lésionnels sont décrits dans la PR. D'abord la chondrolyse qui se traduit en clinique par un pincement du cartilage, est activée sous l'action des métalloprotéases MMP-1 et MMP-3 secrétées par le pannus synovial. Ensuite, l'activation du système RANK-RANK ligand (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B) au niveau des pro-ostéoclastes sous la régulation de TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-17 conduit progressivement à une érosion osseuse.

En résumé, on observe dans la PR, des vascularites segmentaires ou focales, incluant des microthromboses et une néovascularisation. L'ensemble de l'infiltrat de cellules myéloïdes associé à l'hyperplasie des synoviocytes, appelé « pannus » tend à recouvrir l'articulation et serait le siège de la production d'enzymes de destruction du cartilage et de l'os (**Figure 2**). Des mécanismes anti-inflammatoires et des phases de réparation sont activés lors de cette pathogénie de la PR, mais ne parviennent pas à compenser le processus de destruction.



**Figure 2.** Destruction ostéoarticulaire au cours de la PR, exemple de l'articulation du genou. (A) : articulation saine avec un aspect normal de la membrane synoviale, des synoviocytes et des os. (B) : articulation de PR débutante : l'accumulation de cellules de l'immunité conduit à une hyperplasie synoviale. (C) : articulation de PR avancée : l'hyperplasie synoviale associée à des amas lymphoïdes appelés « pannus » est évocatrice de la maladie, on observe aussi une destruction des os et du cartilage

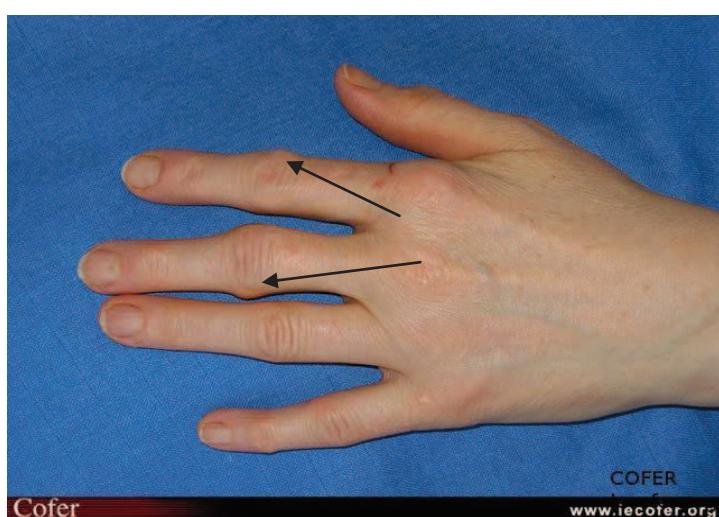
### I.3 Symptomatologie et diagnostic

Le diagnostic et le traitement précoce sont déterminants dans le succès de la prise en charge de la PR, d'où l'importance de réseaux de soins efficaces et rapides. Le médecin généraliste est en première ligne pour détecter une possible PR débutante et adresser très rapidement le patient au spécialiste rhumatologue. À la phase initiale, il est important de confirmer l'existence d'arthrite ou de synovite correspondant à une PR, après avoir éliminé les autres rhumatismes inflammatoires. Il convient ensuite de rechercher des éléments pronostiques d'une évolution chronique et destructive de cette polyarthrite<sup>3</sup>.

#### I.3.1 Manifestations cliniques de la polyarthrite rhumatoïde<sup>5, 11</sup>

##### PR débutante

La PR est une atteinte bilatérale, le plus souvent symétrique et « nue » au début (cela signifie qu'il n'existe aucun signe extra-articulaire ou axial dans la PR débutante). Il s'agit, dans la majorité des cas d'une oligoarthrite distale d'apparition progressive intéressant les poignets, parfois les avant-pieds, une ou plusieurs articulations métacarpo-phalangiennes ou métatarso-phalangiennes et les interphalangiennes proximales. Les interphalangiennes distales ne sont que très rarement atteintes. Les articulations concernées sont douloureuses, partiellement enraïdies et légèrement enflées. Au doigt, on note un aspect caractéristique de « fuseau » (**Figure 3**) et au poignet une tuméfaction avec une ténosynovite cubitale. Le rythme des douleurs est caractéristique d'un rhumatisme inflammatoire : nocturnes réveillant les malades, elles sont maximales le matin au réveil, entraînant un enraissement articulaire qui cède dans la matinée. L'examen clinique peut révéler une douleur à la compression latérale des métacarpo-phalangiennes qui est assez évocatrice du diagnostic de la PR débutante.



**Figure 3.** PR débutante : atteinte inflammatoire précoce de la main avec présence de synovite en « fuseau » sur les 3<sup>èmes</sup> inter-phalangiennes proximales (flèches). *Image issue de la diapothèque de COFER : Collège Français des Enseignants en Rhumatologie.*

Des signes généraux tels une discrète altération de l'état général, une fébricule à 38°C, un amaigrissement et surtout une asthénie, sont fréquents. Dans certains cas l'atteinte articulaire peut commencer par les genoux ou les coudes.

Dans 10 à 15 % des cas, la PR commence par une polyarthrite aigüe fébrile avec altération de l'état général et une fièvre supérieure à 38,5 °C.

Plus rarement (10 % des cas), on peut aussi rencontrer une atteinte rhizomélique de la ceinture scapulaire ou du bassin, une monoarthrite du poignet ou du genou, une ténosynovite isolée, un rhumatisme intermittent avec poussée monoarticulaire.

### **Evolution de la PR**

La PR, une fois installée, tend progressivement vers l'aggravation et l'extension des atteintes qui se fait le plus souvent par poussées évolutives. Ces poussées sont classiquement entrecoupées d'accalmies relatives, voire de vraies rémissions. Le déclenchement des poussées reste cependant mal compris; des facteurs infectieux et psychologiques sont les plus observés en pratique courante.

**L'atteinte des mains** est la plus fréquente et souvent inaugurale (90% des cas). Les déformations classiques les plus caractéristiques à la main sont la déviation cubitale des doigts "en coup de vent", la déformation en "col de cygne" ou en "maillet qui touche plus particulièrement l'index et le médius, la déformation en boutonnière et enfin l'atteinte du pouce prenant soit un aspect en "Z" liée à l'arthrite métacarpo-phalangienne, soit un aspect en adductus secondaire à une arthrite trapézo-métacarpienne. Les poignets sont aussi le siège d'une arthrite dans plus de 70% des cas, avec une atteinte précoce de l'articulation radio-cubitale inférieure, une luxation de la styloïde cubitale limitant les mouvements articulaires (**Figure 4A**).

**L'atteinte des pieds** survient chez 90% des patients. Les arthrites métatarso-phalangiennes entraînent progressivement un aspect plat puis rond de l'avant-pied avec subluxation ou luxation plantaire des métatarsiens (**Figure 4B**). Des arthrites talo-naviculaires et sous-taliennes sont également fréquentes, souvent plus tardives, très douloureuses. Elles occasionnent l'affaissement de l'arche plantaire interne et provoque une difficulté à la marche. L'atteinte tibio-tarsienne est plus rare mais reste douloureuse et source d'instabilité.

Les **genoux** sont touchés dans plus de la moitié des cas, avec une arthrite prédominante dans le compartiment fémoro-tibial externe. Les **épaules** sont également fréquemment touchées, avec initialement une synovite scapulo-humérale et souvent une bursite sous-deltoïdienne. Les **coudes** sont touchés dans 40% des cas environ. La **coxite rhumatoïde** (inflammation de l'articulation de la hanche) est retrouvée dans environ 15% des cas. Il s'agit d'une localisation particulièrement grave du point de vue fonctionnel et souvent peu accessible aux traitements généraux ou locaux. Le **rachis**

**cervical** est quant à lui rapporté dans près de 40% des cas et surtout dans les polyarthrites sévères, érosives et nodulaires. Par contre, le rachis dorsal, lombaire et les sacro-iliaques ne sont que rarement touchés.

L'évolution de la PR non traitée est néanmoins très hétérogène dans la forme et la durée d'installation des atteintes articulaires. Il existe certaines formes d'emblée sévères où cette évolution est très rapide, aboutissant à une polyarthrite généralisée, très inflammatoire, souvent très destructrice et handicapante au bout de deux ans. Elles représenteraient 10 à 20 % des PR. À l'opposé, il existe des polyarthrites bénignes entraînant peu ou pas de gêne fonctionnelle et peu ou pas de lésions radiographiques et de déformations (PR peu étendues ne touchant que quelques articulations, souvent les métacarpo-phalangiennes). La majorité des formes garde une sévérité intermédiaire où les patients développent des dommages radiologiques progressifs durant les 5 premières années et perdraient 10 % de leurs activités initiales. Près de la moitié de ces patients ont besoin d'arrêter leur activité professionnelle après 10 ans d'évolution<sup>12,13</sup>.

Rarement présentes au début, des manifestations extra-articulaires peuvent survenir au cours de l'évolution de la PR témoignant de son caractère systémique. Parmi ces manifestations extra-articulaires, on note principalement l'asthénie, l'anémie, l'amylose, les névrites, les adénopathies, les pneumopathies interstitielles diffuses, les atteintes oculaires et les vascularites rhumatoïdes. Elles peuvent parfois mettre en jeu le pronostic vital et contribuer, avec d'autres facteurs, à augmenter la mortalité de ces patients.

**Figure 4.** Exemples des déformations dans une PR ancienne. (A) Déformations des mains : atrophie des muscles interosseux, subluxation dorsale du carpe responsable d'un poignet dit « en dos de chameau », et déviation des doigts en « coup de vent ». (B) Luxation plantaire des métatarsiens au niveau des pieds. (C) Arthrite destructrice et handicapante des genoux. *Image issue de la diapotheque de COFER.*



### I.3.2 Diagnostics différentiels<sup>5, 11</sup>

Le diagnostic d'une PR débutante repose donc sur un faisceau d'arguments comportant essentiellement des manifestations cliniques évocatrices. Cependant, devant toute suspicion, il importe de rechercher et d'éliminer les autres formes de rhumatismes inflammatoires. Parmi eux on note principalement :

- ❖ **Les polyarthrites d'origines infectieuses bactériennes ou virales** : par l'étude cytologique et bactériologique du liquide synovial voire par biopsie synoviale. A titre d'exemple, évoquer les polyarthrites gonococciques qui sont assez classiques, les septicémies à streptocoque ou staphylocoque, l'endocardite, la polyarthrite de l'hépatite virale A ou B ou encore les infections à parvovirus B19 qui donne un tableau de polyarthralgie proche de la PR.
- ❖ **Les spondylarthropathies** : qui sont les plus fréquents des rhumatismes inflammatoires après la PR et représentent l'un des principaux diagnostic différentiels . De plusieurs formes possibles (arthrite réactionnelle, spondylarthrite ankylosante, rhumatisme psoriasique, rhumatisme des entérocolopathies chroniques, spondylarthropathies indifférenciées), l'arthrite prédomine habituellement sur les grosses articulations, notamment aux membres inférieurs, et est de distribution asymétrique. Dans ces cas, il faut rechercher des signes et des antécédents de spondylarthropathie et proposer des radiographies des articulations sacro-iliaques.
- ❖ **Les connectivites comportant des manifestations articulaires inflammatoires** : telles que la maladie lupique chez la femme jeune, le syndrome de Gougerot-Sjögren primitif, la sclérodermie systémique.
- ❖ **les arthropathies métaboliques** comme la goutte polyarticulaire.
- ❖ **autres rhumatismes inflammatoires** : la polyarthrite œdémateuse du sujet âgé.

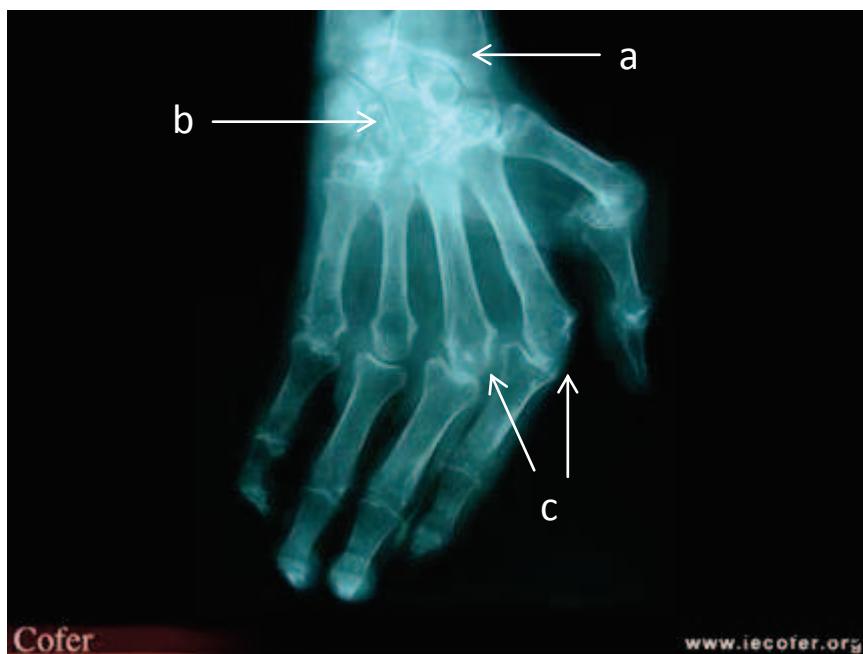
### I.3.3 Examens complémentaires devant une suspicion de PR débutante<sup>5, 11</sup>

Après interrogatoire et examen clinique, le médecin peut dans la plupart des cas évoquer le diagnostic de PR débutante si la polyarthrite est bilatérale, symétrique et nue. Cependant, certaines explorations complémentaires peuvent être utiles pour mieux confirmer la PR, sont importantes pour surveiller l'évolution de la maladie et pour évaluer les effets des traitements.

- ❖ **Imagerie : radiographie et échographie**

La technique la plus utilisée est la radiographie standard des mains, des poignets (de face) et des pieds (trois quarts et face) et du thorax (face et profil). L'objectif est d'éliminer d'autres diagnostics (recherche d'adénopathies sur la radiographie de thorax pouvant faire évoquer une sarcoïdose, liseré

de chondrocalcinose, etc.), de rechercher la présence d'érosions caractéristiques des articulations des mains et des pieds (elles sont exceptionnelles à la phase de début, leur présence serait alors de mauvais pronostic (**Figure 5**). Actuellement l'échographie et l'IRM des mains ou des pieds se développent et permettent de qualifier plus précisément la nature et le siège des érosions articulaires, qui parfois en stade précoce sont infra-radiologiques.



**Figure 5.** Radiographie de la face de la main droite et du poignet, (a) : pincement diffus de l'articulation radio-carpienne, (b) : début de carpite fusionnelle, (c) déminéralisation diffuse (érosion) et subluxation des métacarpo-phalangiennes, aspect en « coup de vent cubital ». *Image issue de la diapotheque de COFER : Collège Français des Enseignants en Rhumatologie.*

#### ❖ 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). Leur normalité n'exclut pas le diagnostic. L'électrophorèse sérique objective une augmentation des gammaglobulines. Une numération-formule sanguine est parfois intéressante puisqu'il peut aussi exister une anémie modérée d'origine inflammatoire.

#### ❖ 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, constitué à majorité de polynucléaires neutrophiles. Le dosage du complément ou des autoanticorps dans le liquide articulaire n'est pas utile en pratique courante. Par contre, la biopsie synoviale est envisageable, pour éliminer une origine infectieuse dans les monoarthrites.

❖ Biologie spécifique :<sup>11</sup>

- **Le facteur rhumatoïde (FR)** est un auto-anticorps anti-gammaglobulinique, le plus souvent de type IgM mais pouvant être aussi de type IgA, IgG, IgD ou IgE. En pratique courante, la détection du FR se fait par la technique ELISA. Au début de la PR, la recherche de FR est positive dans 50 à 60 % des cas environ, et sa présence significative dès le début de la maladie est un élément de mauvais pronostic. Cependant cette présence n'est pas spécifique à la PR, sa prévalence peut être aussi élevée dans d'autres rhumatismes inflammatoires (Syndrome de Goujerot-Sjögren, lupus systémique), dans certaines infections chroniques (Leishmaniose, endocardite bactérienne) ou encore dans certaines hémopathies lymphoïdes. Aussi, le rôle direct du FR dans le développement de la synovite rhumatoïde reste ambigu comme l'atteste les cas de polyarthrites très érosives chez des patients séronégatifs au FR.

- **Les anticorps anti-peptides citrullinés (ou anti-CCP ou en anglais ACPA)**

Connus auparavant sous le terme d'anticorps anti-kératines et anti-périmucléaires, ce sont des anticorps reconnaissant les peptides citrullinés telles la filaggrine présente dans l'articulation rhumatoïde et dont le résidu arginine est transformé en citrulline. Sa présence permet de conforter le diagnostic de la PR et est prédictive d'une maladie persistante et érosive. Les ACPA peuvent cependant être retrouvés dans d'autres maladies inflammatoires. Au même titre que le FR, la recherche d'ACPA doit actuellement faire partie du bilan biologique initial de la PR. Il est important de noter que l'ACPA et le FR ne sont pas interdépendants mais que leur détermination associée permet d'augmenter la valeur prédictive positive de la PR par rapport à la détermination unique de l'un ou de l'autre.

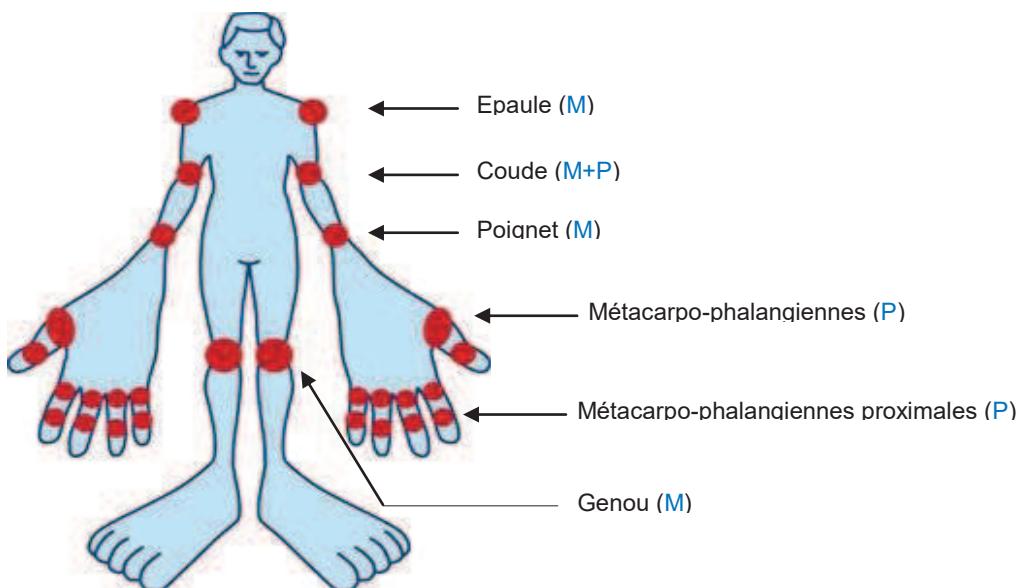
Une étude récente montre que les taux circulants des ACPA et FR peuvent être déjà augmentés 10 années avant le début de l'arthrite<sup>14</sup>.

## I.4 Evaluation de l'activité de la PR

Une fois le diagnostic de PR posé, le médecin dispose de plusieurs outils validés pour apprécier l'activité de la maladie et son évolution après traitement. Parmi eux, seuls le DAS28, le SDAI et le HAQ, qui sont les plus utilisés, sont représentés dans ce travail. D'un point de vue pragmatique, ils définissent le seuil de rémission clinique.

### I.4.1 Disease Activity Score 28 (DAS28)

Le DAS28 est un indice composite d'activité de la PR élaboré par la ligue européenne contre les rhumatismes (EULAR). Il tient compte de l'évaluation de la douleur et du nombre d'arthrites sur 28 sites articulaires (**Figure 6**), de la vitesse de sédimentation globulaire (VS) et l'appréciation globale du patient sur une échelle visuelle analogique de 100 millimètres<sup>15, 16</sup>. Il est le score le moins restrictif en termes de définition de rémission.



**Figure 6.** Les 28 sites articulaires proposés par l'EULAR pour calculer le DAS28: les sites sont évalués par mobilisation (M) ou par pression (P).

#### ❖ Calcul de DAS28:

$$\text{DAS28} = 0,55 \times (\text{nombre d'articulations douloureuses}) + 0,284 \times (\text{nombre d'articulations gonflées}) + 0,33 \times \log \text{VS} + 0,0142 \times \text{appréciation globale du patient}$$

Nombre d'articulations douloureuses : 0 à 28

Nombre d'articulations gonflées : 0 à 28

VS : en mm et Appréciation globale du patient : 0 à 100 mm

❖ **Interprétation de DAS28:**

Le DAS28 évalue l'activité de la PR au moment du diagnostic, et il permet de suivre son évolution et d'évaluer l'efficacité des traitements suivant l'échelle suivante :

DAS28 ≤ 2,6 : PR en rémission

2,6 < DAS28 ≤ 3,2 : PR faiblement active

3,2 < DAS28 ≤ 5,1 : PR modérément active

DAS28 > 5,1 : PR très active

**I.4.2 Simplified Disease Activity Index (SDAI)**

Ce score composite correspond à la somme du nombre d'articulations douloureuses et d'articulations gonflées (en reprenant les mêmes articulations étudiées dans le DAS28), du taux plasmatique de la CRP, de l'appréciation globale par le patient et d'appréciation générale par le médecin.

❖ **Calcul de SDAI :**

Paramètres	Echelle
Nombre d'articulations douloureuses	[1-28]
Nombre d'articulations gonflées	[1-28]
CRP plasmatique (mg/dl)	[0-10]
Appréciation par le patient	[0-10]
Appréciation par le médecin	[0-10]
Score total	[0-86]

❖ **Interprétation du SDAI :**

SDAI ≤ 3,3 : PR en rémission

3,3 ≤ SDAI ≤ 11 : PR à faible niveau d'activité

11,1 ≤ SDAI ≤ 26 : PR à activité modérée

PR > 26 PR : très active

**I.4.3 Health Assessment Questionnaire (HAQ)**

Le HAQ est un questionnaire d'évaluation de l'incapacité fonctionnelle utilisé dans la PR. Il s'agit d'une cotation générique prenant en compte 8 domaines de l'activité physique. A chaque domaine est allouée la note suivante : 0 = sans aucune difficulté, 1 = avec quelques difficultés, 2 = avec beaucoup de difficultés, 3 = incapable de le faire.

L'indice fonctionnel est la somme des cotations des divers domaines divisée par le nombre de domaines évalués (normalement 8, mais moins en cas de données totalement manquantes pour un domaine particulier). Le score ainsi obtenu est compris entre 0 et 3. Ici, il n'y a pas de seuil discriminant d'une bonne ou mauvaise capacité fonctionnelle. Il s'agit d'un suivi de la situation du patient et d'avoir un indice prédictif de l'évolution future (clinique, structurale, professionnelle).

<b>Habillement, soins corporels</b>	Etes-vous capable de : - Vous habiller, y compris nouer vos lacets et boutonner vos vêtements ? - Vous laver les cheveux ?
<b>Se lever</b>	Etes-vous capable de : - vous lever d'une chaise - vous mettre au lit et vous lever du lit
<b>Les repas</b>	Etes-vous capable de : - couper votre viande - porter à votre bouche 1 tasse ou 1 verre bien plein ? - ouvrir une brique de lait ou de jus de fruit ?
<b>La marche</b>	Etes-vous capable de : - marcher en terrain plat à l'extérieur ? - monter 5 marches ?
<b>Hygiène</b>	Etes-vous capable de : - vous laver et vous sécher entièrement ? - prendre un bain ? - vous asseoir et vous relever des toilettes ?
<b>Attraper</b>	Etes-vous capable de : - prendre un objet pesant 2.5 kg situé au-dessus de votre tête ? - vous baisser pour ramasser un vêtement par terre ?
<b>Préhension</b>	Etes-vous capable de : - ouvrir une porte de voiture ? - dévisser le couvercle d'un pot déjà ouvert une fois ? - ouvrir et fermer un robinet ?
<b>Autres activités</b>	Etes-vous capable de : - faire vos courses ? - monter et descendre de voiture ? - faire des travaux ménagers tels que passer l'aspirateur ou faire du petit jardinage.

#### I.4.4 Facteurs pronostiques de la PR

La PR étant une maladie très hétérogène, il convient d'identifier dès le début de la maladie, les formes ayant un risque d'évoluer vers une maladie sévère afin d'adapter au mieux les stratégies thérapeutiques. Les paramètres les plus cités et connus sont:

- ❖ Un syndrome inflammatoire très important
- ❖ Un taux de FR retrouvé précocement, et de façon élevée
- ❖ Une séropositivité aux ACPA
- ❖ Le degré de handicap fonctionnel
- ❖ Une importance des érosions osseuses initiales
- ❖ La présence de manifestations extra-articulaires
- ❖ Les marqueurs génétiques : la PR est associée à certains allèles DRB1\*04 et DRB1\*01, cependant le typage HLA de classe II n'est pas utilisé en pratique clinique mais uniquement dans certains cas particuliers.

## I.5 Prise en charge de la PR

La PR nécessite une prise en charge précoce et pluridisciplinaire engageant l'information et l'éducation du patient, d'où l'importance de réseaux de soins efficaces et rapides. Aujourd'hui, l'objectif du traitement est d'obtenir à court terme une rémission ou au moins une faible activité de la maladie, dans le but de prévenir et limiter les lésions ostéo-articulaires pouvant être irréversibles. L'identification des acteurs de la pathogénie de la PR a permis le développement de thérapeutiques immuno-modulantes ciblées, en plus des traitements symptomatiques déjà disponibles. Le plus récent schéma thérapeutique de la PR, recommandé par la Société Française de Rhumatologie (SFR) en 2010, sur les bases des recommandations européennes, est résumé dans le paragraphe 1.5.2 ci-dessous.

### I.5.1 Les différents traitements de la PR

#### ❖ Traitements symptomatiques :

Ils sont utilisés lors des poussées inflammatoires afin de soulager rapidement la douleur. Parmi eux, on retrouve :

- **les antalgiques de niveau I et II :** le recours aux antalgiques de niveau III est exceptionnel au cours de la PR.
- **les anti-inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS) :** leur toxicité digestive, cardiovasculaire et rénale justifie une surveillance étroite sur le plan clinique et biologique (mesure de la tension artérielle, contrôle de la fonction rénale).
- **les anti-inflammatoires stéroïdiens et les glucocorticoïdes :** compte tenu de son effet indésirable au long cours, la corticothérapie ne doit être utilisée qu'en alternative (par exemple en cas de PR active invalidante insuffisamment soulagée par les AINS) ou en complément des traitements de fond. A titre d'exemple, il est recommandé de respecter une dose cumulée faible de prednisone (0,15mg/kg/j) pour une durée maximale de 6 mois et de diminuer la dose aussi rapidement que possible. Cependant, des fortes doses de corticostéroïdes peuvent être utilisées de façon transitoire en cas de poussées sévères. Dans tous les cas, une surveillance des comorbidités (hypertension artérielle, diabète, ulcère digestif) doit être réalisée.
- **les traitements locaux :** des ponctions articulaires évacuatrices, des infiltrations péri ou intra-articulaires de glucocorticoïdes peuvent être nécessaires dans certains cas de synovite persistante. Et si la synovite récidive, on peut aussi avoir recours à une synoviorthèse consistant en une injection intra-articulaire de produit isotopique capable de dégrader le pannus synovial.

#### ❖ Traitements de fond :

Regroupés sous le terme anglo-saxon « DMARDs » (disease-modifying anti-rheumatic drugs), ces médicaments visent à bloquer plus spécifiquement l'évolution de la maladie et la progression radiologique. Leur but essentiel est de réduire l'activité de la maladie au mieux jusqu'à l'obtention

d'une rémission clinique. Le choix et l'adaptation des traitements de fond se basent sur l'estimation de la sévérité de la maladie, leur rapport bénéfice/risque, l'existence éventuelle de comorbidités associées, la rapidité d'action et le coût. Ils seront prescrits pendant toute la période où ils sont efficaces et bien tolérés. Dans cette classe thérapeutique, on distingue les DMARDs « conventionnels » et les DMARDs « biologiques ». Les DMARDs « conventionnels » sont prescrits en première intention, et le recours à la biothérapie se fait en deuxième intention dans les polyarthrites sévères réfractaires (échec des autres traitements de fond) mais également en présence de facteurs de mauvais pronostic. Leurs principaux effets indésirables sont rapportés dans le **tableau 1**.

*Les DMARDs conventionnels :*

- **Le Méthotrexate (MTX)** est le traitement de fond de 1<sup>ère</sup> intention dans la PR, du fait de son efficacité, de sa relative bonne tolérance et de son coût modéré.
- **Le léflunomide et la sulfasalazine** apportent aussi une efficacité clinique et radiologique significative, ils sont administrés en alternative ou en association en cas de non-réponse, d'intolérance ou de contre-indication au MTX.
- d'autres médicaments à effets anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs tels que **les antipaludéens de synthèse** (chloroquine, hydroxychloroquine) et **la ciclosporine** sont de moins en moins prescrits en raison de leur rapport bénéfice/risque peu intéressant.

*Les DMARDs biologiques :*

**Les biomédicaments** ayant l'autorisation de mise sur le marché sont les anti-TNF-α (quatre en sous-cutané : adalimumab, certolizumab-pégol, étanercept, golimumab et un en perfusion intra-veineuse : infliximab), un antagoniste du récepteur à l'IL-6 (tocilizumab), un antagoniste du récepteur à l'IL-1 (anakinra), un anticorps dirigé contre la molécule de surface CD20 des lymphocytes B (rituximab) et un modulateur de la co-stimulation des lymphocytes T (abatacept). Un inhibiteur des janus kinase JAK1 et JAK3 (tofacitinib) a obtenu une autorisation de mise sur le marché aux États-Unis et en Suisse. D'autres DMARDs « biologiques » sont en cours de développement dans la PR: des inhibiteurs de Syk (spleen tyrosine kinase), des anti-synoviocytes (inhibiteurs des métalloprotéases), des anti-ostéoclastes (anticorps dirigés contre le RANKL), des immunomodulateurs dirigés contre l'IL-12, l'IL-15 et enfin des inhibiteurs de l'interaction leucocytes-endothélium (antagonistes des récepteurs des Sélectines et Intégrines, ou encore des inhibiteurs de facteur de croissance granulocytaire).

❖ **Traitements non-médicamenteux :**

- une approche médico-psychologique doit être proposée à chaque patient.
- une réadaptation fonctionnelle personnalisée permet de limiter la survenue des déformations, d'assurer le maintien de la qualité des muscles, et de lutter contre l'enraissement.

- éventuellement, des interventions chirurgicales telles que la synovectomie peuvent être envisagées en cas d'échec médicamenteux.

**Tableau 1.** Principaux traitements de fond de la PR, effets secondaires, surveillance<sup>5</sup>.

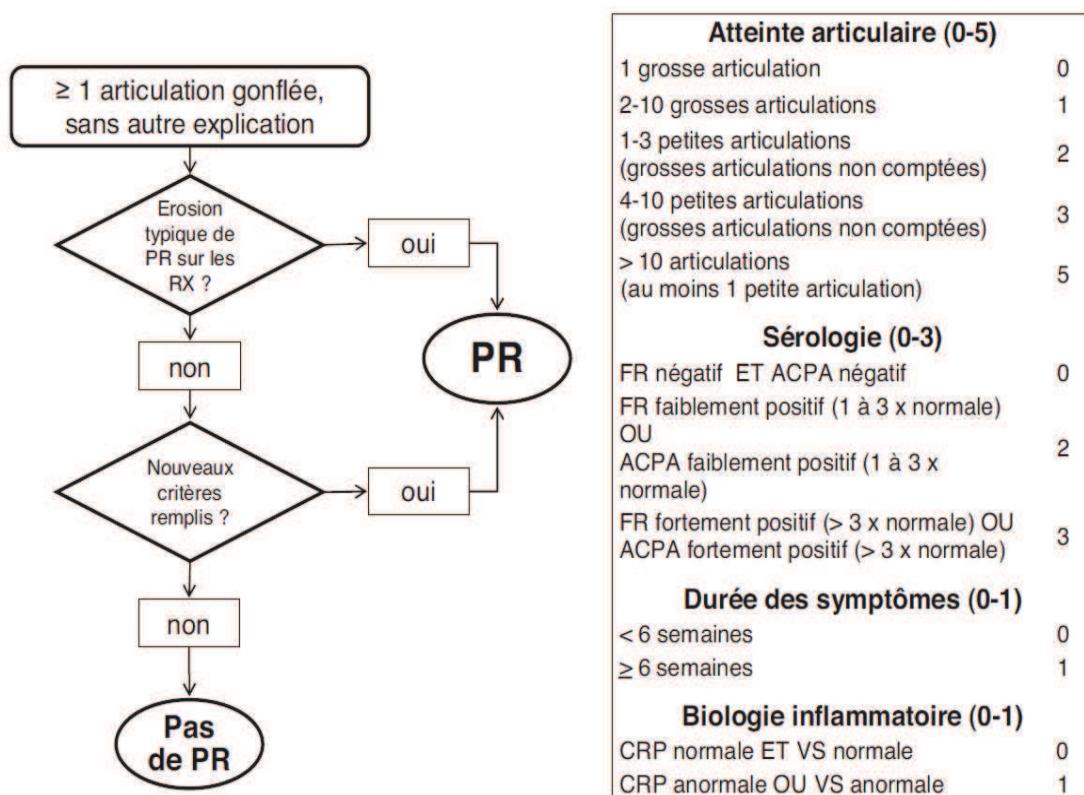
Médicament	Mécanismes d'action	Administration	Principaux effets indésirables	surveillance
Abatacept	protéine de fusion soluble formée du CTLA4 et IgG1 humaine	IV, mensuelle	infections céphalées nausées	hémogramme
Adalimumab	anticorps monoclonal anti-TNF recombinant humain	SC, hebdomadaire	infections ++ éruptions aux points d'injection	hémogramme
Anakinra	antagoniste du récepteur de l'IL-1, recombinant	SC, quotidienne	neutropénie	Surveillance rénale
Certolizumab-pégol	fragment d'Ac humanisé recombinant anti-TNF	SC, toutes les 2 semaines	-	hémogramme
Ciclosporine	immunosuppresseur	-	Hypertension artérielle Toxicité rénale hypertrichose	créatininémie
Etanercept	récepteur soluble du TNF	SC, hebdomadaire	infections ++ éruptions aux points d'injection cytopénie induction d'autoanticorps	hémogramme
Golimumab	Ac monoclonal humain anti-TNF	SC, mensuelle	-	-
Hydroxychloroquine	antipaludéen, anti-inflammatoire	-	troubles oculaires prurit vertiges troubles digestifs	contrôle ophtalmologique
Infliximab	Ac monoclonal chimérique anti-TNF	IV, hebdomadaire	infections ++ hypersensibilité ++ induction d'autoanticorps	hémogramme transaminases
Léflunomide	Antiprolifératif, immunosuppresseur	-	Diarrhée Anomalies hépatiques Hypertension artérielle	Pression artérielle hémogramme transaminases
Méthotrexate	Anti-métabolite, immunosuppresseur	Orale ou IM ou SC, hebdomadaire	nausées, vomissements, toux, dyspnée, fièvre, anomalies hépatiques, anomalies hématologiques infections	hémogramme transaminase créatininémie albuminémie
Rituximab	Ac monoclonal chimérique anti-lymphocyte B CD20+	IV, toutes les 2 semaines	réactions à la perfusion infections	hémogramme dosage pondéral des Ig
Sulfasalazine	anti-inflammatoire	-	digestifs éruptions cutanées leucopénies céphalées++ hépatite	hémogramme créatininé bilan hépatique
Tocilizumab	Ac monoclonal humanisé anti-récepteur IL-6	IV, mensuelle	hépatite réactions à la perfusion infections hyperlipidémie	hémogramme

SC : sous-cutané, IV : intraveineuse, IM : intramusculaire, Ig : immunoglobuline, CTLA4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4.

## I.5.2 Recommandations pour la prise en charge de la PR<sup>17,17</sup>

Ces recommandations ont été élaborées par des experts rhumatologues hospitaliers et libéraux et un représentant des associations de patients. Elles s'appuient sur une analyse systématique de la littérature et sur les recommandations des collèges américains et européens de rhumatologie. Elles mettent en avant l'importance d'une prise de décision partagée entre le rhumatologue et le patient ayant acquis des compétences sur sa maladie, l'objectif d'atteindre la rémission ou au minimum la faible activité, la nécessité d'introduire le traitement de fond le plus précocement possible, ainsi que l'intérêt d'une évaluation régulière de l'activité de la PR menant à des adaptations thérapeutiques rapides si besoin.

➤ Le diagnostic de PR doit être évoqué devant certains signes cliniques tels qu'un gonflement articulaire, une raideur matinale de plus de 30 min, une douleur à la pression transverse des mains ou des avant-pieds, confirmé par des examens biologiques (VS, CRP, ACPA, FR) et d'imagerie (radiographies ± échographie), après avoir éliminé les diagnostics différentiels. Des critères de classification ont été définis par les sociétés savantes de rhumatologie. Le diagnostic de PR est retenu si le score obtenu à partir de ces critères est supérieur à 6/10 (**Figure 7**).



**Figure 7.** Critères de classification de la PR selon les collèges américains et européens de rhumatologie (ACR : American College of Rheumatology, EULAR : European League against Rheumatism).<sup>18</sup>

- Dès que le diagnostic de PR est posé, un traitement de fond doit être débuté suivant le schéma ci-après (**Figure 8**).

L'objectif du traitement est la rémission clinique ou au minimum une faible activité de la maladie. La rémission clinique est définie par l'absence significative de signes et symptômes d'activité inflammatoire. L'activité de la maladie doit être mesurée sur des critères composites validés (DAS28  $\leq 2,6$ ) et incluant les indices articulaires. Le patient est suivi tous les mois tant que la maladie est active. S'il n'y a pas d'amélioration dans les 3 mois suivant le début du traitement ou si l'objectif thérapeutique n'a pas été atteint à 6 mois, le traitement doit être ajusté<sup>18</sup>.

#### Traitements de 1<sup>ère</sup> ligne :

- Le méthotrexate est le traitement de fond de première ligne chez les patients ayant une PR active ; la dose optimale doit être atteinte au maximum en 4 à 8 semaines.
- Chez les patients naïfs de ce traitement de fond, et en cas de contre-indication ou d'intolérance précoce au méthotrexate, le léflunomide ou la sulfasalazine sont une alternative thérapeutique.
- Dans l'attente de l'efficacité du traitement de fond, une corticothérapie peut être proposée en respectant une dose cumulée faible, si possible sur une période maximale de 6 mois. La corticothérapie sera diminuée aussi rapidement que possible.

#### Traitements de 2<sup>ème</sup> ligne et plus :

- Chez les patients insuffisamment répondeurs ou intolérants au méthotrexate, et en présence de facteurs de mauvais pronostic, l'addition d'un biomédicament peut être proposée.
- En l'absence de facteurs de mauvais pronostic, une combinaison de traitements de fond synthétiques (méthotrexate/sulfasalazine/hydroxychloroquine) ou bien une rotation pour un autre traitement de fond de synthèse (léflunomide, sulfasalazine) peuvent être proposées.
- En cas d'échec (ou de contre-indication), un biomédicament doit être envisagé.
- Tous les biomédicaments doivent être utilisés préférentiellement en association avec le méthotrexate.
- Les patients en échec d'un premier biomédicament doivent être traités par un autre biomédicament ; les patients en échec à un premier anti-TNF peuvent recevoir un 2<sup>ème</sup> anti-TNF ou un biomédicament reposant sur un autre mode d'action.

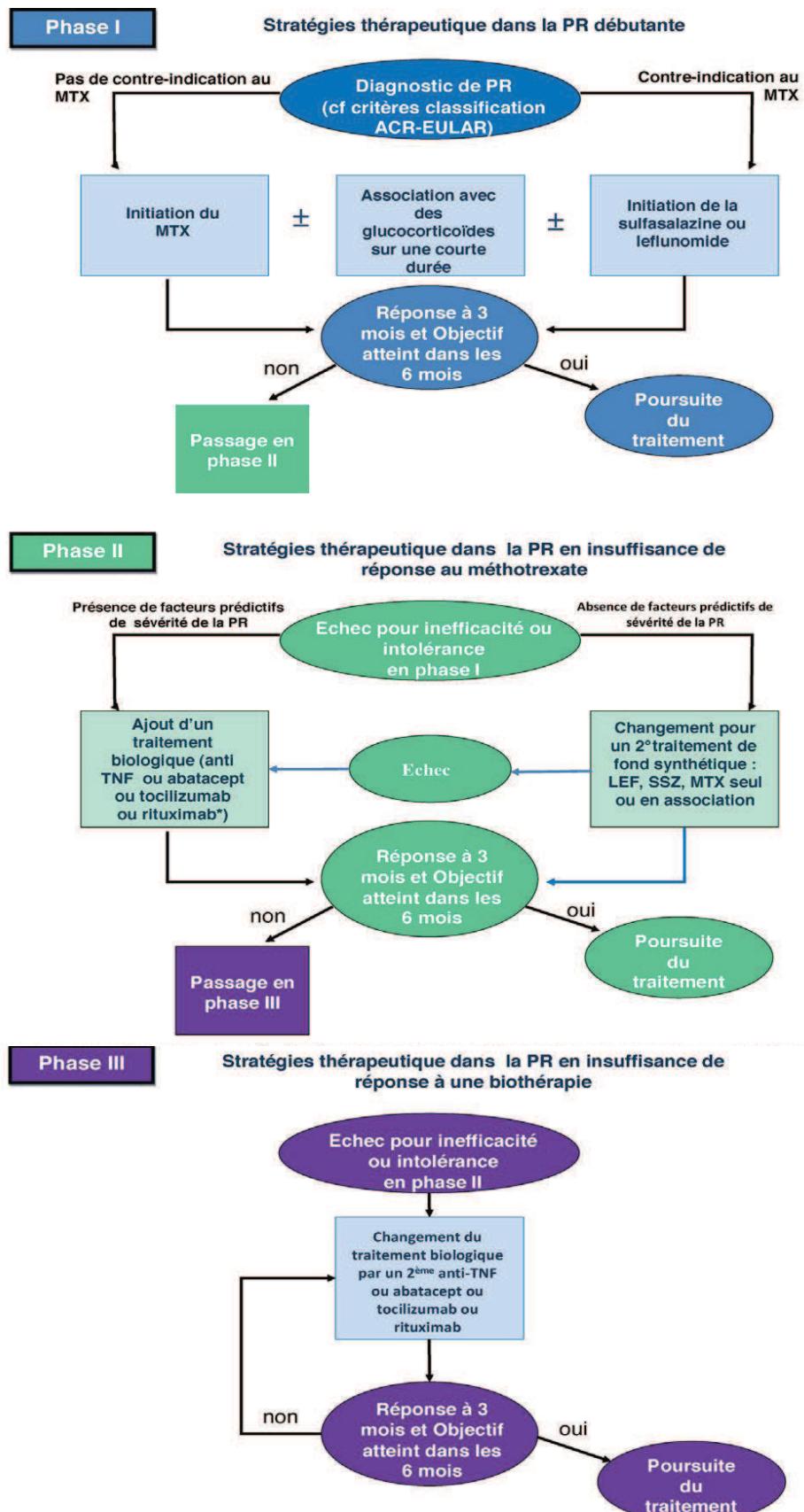
#### Gestion de la rémission et prise en charge globale

- En cas de rémission persistante, et après arrêt des corticoïdes (ou décroissance à une dose  $\leq 5$  mg/jour), on peut envisager une décroissance du biomédicament.
- En cas de rémission persistante prolongée, une réduction progressive des traitements de fond conventionnels synthétiques peut être considérée dans le cadre d'une décision médicale partagée entre le patient et le médecin.

- Le choix et l'adaptation thérapeutiques doivent intégrer d'autres facteurs tels que la mesure de l'activité de la maladie, la progression structurale, les maladies associées, la tolérance des traitements et l'avis du patient.

Outre les traitements médicamenteux, des mesures d'éducation thérapeutique, une prise en charge des comorbidités et selon les cas un accompagnement socioprofessionnel, une rééducation fonctionnelle ou un recours à la chirurgie peuvent être proposés.

En résumé, la prise en charge globale de la PR suit une approche pluridisciplinaire de plus en plus personnalisée et impliquant le patient lui-même<sup>17</sup>. L'objectif étant de maîtriser l'évolution de la maladie et de contrôler les comorbidités<sup>8</sup>. Cette prise en charge rencontre plusieurs difficultés car on observe une variabilité des réponses cliniques des patients aux différents agents thérapeutiques, ce qui constraint le clinicien à réadapter régulièrement le traitement. Une étude montre qu'au moins 30 % des patients restent résistants à la combinaison biomédicaments-méthotrexate<sup>19, 20</sup>, ce qui rend complexes les décisions thérapeutiques, d'autant plus que les biomédicaments à forte dose ou à dose standard (en présence ou pas de DMARDs classiques) sont associés à une augmentation des cas d'infections graves<sup>21, 22</sup>. Des intéressantes études et revues montrent toutefois que les recommandations de 2010 basées sur le principe du traitement de type « treat-to-target », ont apporté un réel bénéfice en terme de rémission dans la PR<sup>23, 24</sup>. Une prise de conscience générale a été faite concernant le suivi des manifestations extra-articulaires, notamment cardiovasculaires, car si les patients PR ont un risque de handicap lié à leur maladie rhumatologique, ils sont également à plus haut risque de complications cardiovasculaires.



**Figure 8.** Algorithme de prise en charge de la PR en 2014 selon les recommandations de la Société française de rhumatologie, \* surveillance majeure, Gaujoux-Viala et al. 2014<sup>18</sup>.  
MTX : méthotrexate, LEF : léflunomide, SSZ : sulfasalazine

### II.1 Prévalence

Pendant longtemps, la PR a été considérée comme une maladie handicapante de bon pronostic. On sait aujourd’hui qu’en dépit de son atteinte ostéo-articulaire prédominante, la PR est aussi une maladie systémique associée à des manifestations extra-articulaires. Elle occasionne des complications cardiovasculaires (CV) pouvant mettre en jeu la vie des patients. Il est admis que la surmortalité CV dans la PR entraîne une réduction de l’espérance de vie d’environ 5 à 10 ans par rapport à la population générale<sup>25, 26</sup>. Une étude récente parue en 2014 a confirmé ces chiffres en rapportant une réduction de 7 ans de l’espérance de vie de leur cohorte de patients PR<sup>27</sup>. Les causes de cette surmortalité CV suscitent beaucoup d’intérêt mais sont encore très incertaines, et leur détermination se heurte à un manque d’uniformité de réalisation des études cliniques, concernant : les critères de diagnostic, les notions de sévérité de la maladie, la durée de suivi de la PR, les paramètres CV évalués et leur interprétation, la présence de facteurs de comorbidité, les traitements utilisés<sup>4, 28-30</sup>. La présence d’un score HAQ élevé et la séropositivité aux auto-anticorps FR/ACPA seraient des facteurs prédictifs de cette mortalité CV, et ce indépendamment des facteurs de risque CV traditionnels<sup>27, 31-33</sup>. La sévérité de la maladie serait également prédictive, comme rapporté par une étude récente montrant que les patients avec une PR active et persistante (DAS28>5.1) avaient un risque de mortalité CV élevé comparé à ceux qui ont une PR de faible activité (DAS28<3.2)<sup>34</sup>. Bien que certaines études aient rapporté une relation positive entre le risque CV et la durée de la maladie, d’autres ne confirment pas cette association<sup>29, 35, 36</sup>. Les données issues de récentes méta-analyses montrent significativement que le taux de mortalité et de morbidité d’origine CV est augmenté de 50 à 60% chez les patients arthritiques comparativement à la population générale<sup>37, 38</sup>. Le risque CV est multiplié par 2 à 3 fois dans la PR par rapport à la population générale<sup>39</sup>. Des études de cohortes danoises et néerlandaises ont clairement montré que le risque CV du patient PR est identique à celui du diabète de type-2, pathologie largement reconnue pour son impact CV délétère<sup>39-42</sup>. De façon intéressante, une étude récente a montré que le risque CV dans la PR est resté élevé au cours des 20 dernières années en dépit des avancées thérapeutiques majeures survenues dans le traitement de cette maladie, avec en particulier l’arrivée sur le marché des biothérapies<sup>27</sup>. La question du moment de l’apparition d’un sur-risque CV dans la PR fait l’objet de nombreuses controverses. Alors que la littérature est riche de publications faisant état d’un risque CV élevé dans les formes anciennes de PR, certaines études ont montré la présence d’anomalies CV dans des PR de faible durée d’évolution (durée de la maladie < 5 ans)<sup>43-47</sup>, suggérant un développement très précoce des atteintes CV. Plus surprenant, une étude a montré que 2 ans avant que le diagnostic de PR ne soit posé, les futurs patients PR présentaient déjà un risque CV augmenté (plus d’hospitalisations pour un infarctus du myocarde)<sup>45</sup>. Depuis 2010, la PR est reconnue par l’EULAR comme un facteur indépendant de risque CV<sup>48</sup>. Ces données soulignent l’intérêt majeur de l’amélioration de la prise en charge CV des patients arthritiques et incitent la

communauté scientifique à comprendre les mécanismes impliqués afin de développer des stratégies thérapeutiques adaptées<sup>49-52</sup>.

## **II.2 Pathologies cardiovasculaires du patient PR**

L'augmentation du risque CV dans la PR se traduit essentiellement par une incidence élevée de maladies ischémiques dont l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux fatals, avec un risque d'incidence (*odds ratio*) estimé respectivement à 2,1 et 1,91<sup>53, 54</sup>. Une autre méta-analyse montre que les rapports standardisés de mortalité liée à ces 2 types de pathologies sont respectivement à 1,59 et 1,52 témoignant de leurs fortes contributions à la surmortalité observée au cours de la PR<sup>37</sup>. Il est intéressant de noter que ces complications cardiaques sont souvent secondaires à la combinaison de l'athérosclérose avec d'autres processus comprenant l'inflammation chronique, la fibrose myocardique, une myocardite granulomateuse diffuse non spécifique focale nécrosante, ainsi qu'une dysfonction endothéliale microvasculaire au niveau des coronaires<sup>55, 56</sup>. Parmi les autres maladies artérielles périphériques associées à la PR, on note les maladies thromboemboliques veineuses dont l'embolie pulmonaire et la thrombose veineuse profonde qui sont également augmentées de 2 à 3 fois dans la PR comparé à la population générale<sup>57</sup>. Quelques cas d'anévrisme de l'aorte abdominale et de sténose de l'artère rénale ont également été rapportés<sup>58, 59</sup>. Ces atteintes sont associées à un pronostic défavorable.

## **II.3 Origines de l'augmentation du risque cardiovasculaire dans la PR**

Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer l'augmentation du risque CV dans la PR, mais aucune ne fait pour l'instant l'objet d'un consensus étayé par des données scientifiques solides. Il est fortement probable que ces différents facteurs peuvent s'influencer entre eux et engendrer des processus physiopathologiques communs. En plus des facteurs de risque CV traditionnels, les rôles de l'athérosclérose accélérée et de l'inflammation systémique sont fortement suspectés<sup>60</sup>.

### **II.3.1 Rôle des facteurs de risque « traditionnels »**

Les données concernant la prévalence des facteurs traditionnels de risque CV (FDRCV) tels que le sexe, l'âge, le taux de cholestérol total, le taux de lipoprotéines de forte densité (high density lipoprotein : HDL), le tabagisme, le diabète et l'hypertension artérielle (HTA) sont très hétérogènes dans la PR. Une récente méta-analyse montre que le tabagisme et le diabète s'avèrent plus fréquents que l'HTA et l'hypercholestérolémie<sup>61</sup>. En revanche, Pieringer *et al*<sup>62</sup> a montré que les patients PR peuvent présenter un trouble vasculaire asymptomatique indépendamment de ces facteurs précités. A l'heure actuelle, il est connu que ces FDRCV contribuent mais ne sont responsables que pour une faible partie de l'excès de risque CV dans la PR. En effet, même lorsque les tests statistiques sont ajustés en fonction de la présence de ces facteurs de risque, le risque CV reste significativement élevé dans la PR démontrant ainsi le rôle de facteurs spécifiques à la PR dans le sur-risque CV<sup>63, 64, 31, 65, 66</sup>. La conséquence de cette modeste contribution des FDRCV est que les algorithmes classiquement

utilisés pour « calculer » le risque CV des patients à partir de ces FDRCV (score de Framingham ou l'alternative européenne SCORE « Systemic Coronary Risk Estimation ») sous-estiment le risque CV chez les patients PR<sup>59, 63, 64</sup>.

### *HTA et PR*

L'HTA est définie comme une hausse de la pression artérielle systolique (PAS  $\geq$  140 mmHg) et/ou une hausse de la pression artérielle diastolique (PAS  $\geq$  90 mmHg). Sa prévalence chez les patients arthritiques est variable selon les études. Une méta-analyse menée chez des patients ayant une PR débutante (durée moyenne de la maladie < 1 an) révèle qu'il n'y pas d'excès d'HTA à ce stade comparé à un groupe de contrôles sains<sup>46</sup>. Cependant, une revue systématique de la littérature rapporte que 50 à 60% des patients PR présentent une HTA au cours de leur maladie mais que seule la moitié des patients reçoivent un traitement anti-hypertenseur<sup>67</sup>. L'HTA s'avère donc sous-diagnostiquée et sous traitée en cas de PR. Il est évident que l'accumulation des comorbidités au cours de la maladie participe à l'augmentation de la pression artérielle. La sédentarité liée à la synovite handicapante est un élément important puisqu'il est bien connu que l'inactivité physique est associée à une incidence augmentée d'HTA dans la population générale mais aussi dans la PR<sup>68</sup>. De plus, il est suggéré que l'inflammation chronique au cours de la PR contribuerait elle aussi au maintien de l'HTA via l'activation endothéliale aboutissant à une augmentation des résistances vasculaires périphériques<sup>69</sup>. Une contribution des traitements est également suspectée car certains traitements comme les AINS, les glucocorticoïdes et le léflunomide peuvent augmenter la pression artérielle. Certaines études ont suggéré un impact propre de l'HTA sur le processus d'athérogenèse observée au cours de la PR<sup>70-72</sup>, mais la contribution de l'HTA dans l'augmentation du risque CV en cas de PR nécessite des investigations ultérieures.

### *Dyslipidémie dans la PR*

Dans la population générale, la dyslipidémie est connue pour être au cœur du développement des maladies cardiovasculaires, en jouant un rôle important dans toutes les étapes de la formation de la plaque d'athérome. En cas de PR, sa contribution soulève encore de multiples questions. En effet à l'inverse des pathologies CV « classiques » dans lesquelles les taux de cholestérol total, de triglycérides et de lipoprotéines de faible densité (low density lipoprotein : LDL) sont élevés (on parle ici d'hyperlipidémie), les patients PR développent quant à eux un profil lipidique très particulier, commun à la plupart des pathologies inflammatoires chroniques<sup>71</sup>. Alors que les taux de cholestérol total et de LDL sont normaux voire abaissés<sup>71</sup>, un faible taux de HDL peut apparaître plus ou moins tôt au cours de la PR<sup>73</sup>, qui expliquerait le profil lipidique pro-athérogène des patients<sup>46, 74-76</sup>. Cette réduction de HDL serait la conséquence de leur oxydation excessive sous l'influence de l'inflammation<sup>77, 78</sup>. Les HDL oxydées perdent leur effet cardioprotecteur et participent au processus athéromateux. Ainsi, la dyslipidémie présente dans la PR semble être étroitement liée à l'inflammation. Même si des données rapportent que c'est l'augmentation du *ratio* cholestérol total /

HDL qui est corrélée aux événements CV, en dépit de taux faibles de LDL ou de la prise d'un traitement hypcholestérolémiant<sup>79</sup>, la contribution spécifique de la dyslipidémie dans l'augmentation du risque CV reste difficile à estimer. Une étude récente menée chez 16085 patients PR et 48499 sujets sains, révèle que la corrélation entre les taux de LDL et de HDL et les évènements CV est identique dans ces deux populations<sup>80</sup>. De manière intéressante, chez les patients PR, la réduction de l'inflammation par une biothérapie anti-IL6 fait augmenter significativement le taux de cholestérol total, de LDL et de HDL<sup>81, 82</sup>. Des résultats similaires sont observés sous MTX, anti-TNF-α et d'autres DMARDs<sup>22, 83-85</sup>. Une récente étude démontre que le MTX et l'adalimumab n'améliorent pas seulement le profil lipidique systémique mais stabilisent aussi le métabolisme lipidique des macrophages évalué par leur capacité d'efflux en cholestérol<sup>86</sup>. Aussi, l'administration d'hypcholestérolémiant tel que les statines, recommandée aujourd'hui chez un patient PR présentant un haut risque CV, stabilise le profil lipidique. Cependant, on ne sait pas pour l'instant si l'amélioration du profil lipidique s'accompagne d'une réduction du risque CV dans la PR.

#### *Insulino-résistance et syndrome métabolique dans la PR*

Le rôle du diabète de type 2 dans le sur-risque CV dans la PR n'est pas spécifiquement démontré pour l'instant. La prévalence du diabète de type-2 dans la PR est mal connue et des études s'intéressant à cet aspect doivent être réalisées. Les cytokines pro-inflammatoires et notamment le TNF-α pourraient faciliter le développement de l'insulino-résistance<sup>74, 87, 88</sup> et certains traitements de la PR comme les corticoïdes interagissent avec le métabolisme glucidique<sup>89</sup>. Quelques études ont montré que l'insulino-résistance est positivement corrélée à l'athérosclérose des patients PR<sup>90, 91</sup>. Des études spécifiques doivent cependant être menées pour mieux comprendre sa contribution dans l'excès de risque CV des patients PR.

### **II.3.2 Athérosclérose et PR**

Le processus d'athérosclérose est initié lorsque les cellules endothéliales activées par différents facteurs surexpriment les molécules d'adhérence telles que les ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), les VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) et les selectines, et favorisent la perméabilité vasculaire aux monocytes, aux lipides et aux cellules lymphocytaires T. À ce stade, les monocytes se transforment en macrophages et récupèrent les LDL oxydées conduisant à la formation de cellules spumeuses au niveau de la paroi vasculaire. Beaucoup d'études et de revues intéressantes montrent une prévalence accrue d'athérosclérose chez les patients PR comparé à la population générale<sup>92-96</sup>. La présence de plaques d'athérome est rapportée dès les phases précoces de la maladie, c'est-à-dire dès la première année qui suit le diagnostic de PR<sup>92, 97-99</sup>. Leur présence a été remarquée même chez des patients PR avec une faible activité de leur maladie<sup>100</sup>. Les lésions de plaques progressent avec la maladie<sup>101, 102</sup>. Elles se développent préférentiellement au niveau carotidien, en particulier au niveau proximal de la carotide interne<sup>103</sup>, même si une autre étude montre aussi une

augmentation de l'épaisseur intima-média au niveau de l'artère fémorale des patients PR<sup>104</sup>. Il est intéressant de noter que l'athérosclérose peut se manifester de manière silencieuse, c'est-à-dire sans manifestations CV visibles. Le lien entre l'athérosclérose et la sévérité de la maladie reste mal compris, même si il apparaît évident que l'inflammation chronique au cours de la PR contribue à des lésions vasculaires distinctes conduisant à une plus grande vulnérabilité et rupture de plaques<sup>71, 87, 105-107</sup>. Aujourd'hui, la détection précoce de plaques d'athérome est souhaitée chez les patients PR et apporte une valeur pronostique additionnelle aux méthodes classiques d'évaluation du risque CV<sup>46, 108-110</sup>.

### II.3.3 Inflammation systémique dans la PR

En plus de la synovite localisée, la PR se caractérise par une inflammation chronique et systémique. Dans les pathologies CV « conventionnelles », il est bien établi qu'une inflammation de « bas grade » est prédictive des événements CV<sup>111-113</sup>. Les données issues de la recherche fondamentale ont démontré le rôle crucial de l'inflammation dans le développement de l'athérosclérose, de son initiation à la progression et aux complications thrombotiques<sup>114</sup>. En effet, les cytokines libérées par les cellules inflammatoires tissulaires (macrophages, lymphocytes) dans la circulation systémique activent divers tissus, tels que le tissu adipeux, le foie et l'endothélium vasculaire, et vont contribuer au processus athéromateux dans les pathologies inflammatoires chroniques<sup>115</sup>. Ainsi, l'inflammation synoviale puis systémique et enfin vasculaire accentuent l'accumulation des lipides oxydés pro-inflammatoires et pro-thrombotiques, la prolifération des fibroblastes et des cellules musculaires. Cela aboutit à une dysfonction endothéliale (DE) où les fonctions anti-thrombotique et anti-inflammatoire sont rompues<sup>116, 117</sup>. Par analogie avec le processus d'athérogenèse, et parce que la PR est associée à une inflammation de « haut grade » avec des taux de cytokines pro-inflammatoires circulants multipliés par sept<sup>112, 118</sup>, la contribution de l'inflammation systémique au sur-risque CV est largement suspectée<sup>119-121</sup>. Le stade auquel l'inflammation de la PR devient systémique reste encore à élucider. Néanmoins, on sait que les auto-anticorps ACPA et FR, témoins d'un processus inflammatoire, peuvent apparaître au niveau plasmatique plusieurs années avant même l'apparition des synovites<sup>14</sup>. Quelques études ont montré que les paramètres inflammatoires systémiques (le taux de CRP, la valeur de VS) pourraient être prédictifs de la mortalité CV dans la PR<sup>122-125</sup>, puisqu'ils sont associés à la survenue de manifestations myocardiques délétères<sup>124, 126</sup>. De la même manière, des taux élevés de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-17 sont associés avec des événements CV (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux : AVC) et sont corrélés à des paramètres de dysfonctions vasculaires tels que le degré de calcification coronaire<sup>88, 127</sup> ou la rigidité artérielle<sup>119</sup>. Cependant ce lien entre le risque CV et l'inflammation de la PR est loin d'être totalement compris car il est encore difficile de connaître si ces cytokines circulantes accroissent directement le risque CV ou si leurs effets passent par d'autres interactions. En effet malgré les nombreuses associations retrouvées entre les taux circulants de ces cytokines et les manifestations CV, il n'existe pas encore de données statistiques prouvant leurs

valeurs prédictives dans la surmortalité CV de la PR. De plus, selon les études, ce risque CV est relié<sup>128, 129</sup> ou non<sup>130</sup> à la sévérité et/ou à la durée de la maladie ; ce qui n'argumente pas non plus le lien avec l'inflammation articulaire synoviale. Enfin, paradoxalement les traitements anti-inflammatoires ne réduisent pas systématiquement le risque CV des patients PR. Certaines études rapportent une réduction de la mortalité CV des patients PR traités par MTX et anti-TNF- $\alpha$ <sup>131-135</sup> alors que d'autres ne le montrent pas<sup>136-138</sup>. Toutes ces informations indiquent que la seule réduction de l'inflammation pourrait ne pas suffire pour diminuer le risque CV des patients atteints de PR et que d'autres facteurs sont probablement à prendre en compte<sup>139</sup>.

#### **II.3.4 Effets cardiovasculaires des traitements utilisés dans la PR**

Certains traitements utilisés dans la PR peuvent avoir un effet à double tranchant sur le risque CV<sup>74, 76, 140</sup>.

##### *Les glucocorticoïdes*

Si l'on considère que l'inflammation systémique contribue au sur-risque CV de la PR, il est concevable que les traitements symptomatiques à base de corticoïdes puissent diminuer les complications CV de par leur action anti-inflammatoire<sup>141</sup>. Cependant, il est aussi bien établi que les glucocorticoïdes possèdent eux-mêmes des effets CV indésirables tels que l'HTA, la résistance à l'insuline, la rétention hydro-sodée, la prise de poids, la dyslipidémie qui peuvent aggraver le risque CV du patient PR<sup>89, 140, 142, 143</sup>. Les patients PR traités avec une forte dose de corticoïdes (prednisolone > 7.5 mg/jour) ont deux fois plus de risque de développer une maladie cardiaque, comparés aux patients n'en recevant pas<sup>144</sup>. L'EULAR recommande une administration de corticoïdes à la plus faible dose possible, et pendant une durée courte<sup>145</sup>. Mais la question de sécurité d'emploi des glucocorticoïdes n'est pas encore réellement résolue à ce jour puisque même administrés à faible dose, ces médicaments engendrent quand même un mauvais pronostic CV à long terme<sup>146</sup>. Une étude plus récente précise qu'une faible dose de prednisolone administrée durant les deux premières années de la PR engendre un haut risque d'accidents vasculaires à prédominance cérébrale<sup>147</sup>. Il est pour l'instant souhaité de ne pas dénier totalement les bénéfices d'utilisation des glucocorticoïdes tout en prenant en compte les risques CV associés.

##### *Les AINS*

Ces traitements sont connus pour augmenter le risque d'HTA et d'infarctus du myocarde<sup>148, 149</sup>. Une étude récente suggère que leur toxicité CV proviendrait de leur effet athéro-thrombotique chez les patients PR<sup>150</sup>. Toutefois, chaque AINS aurait un effet différent sur le risque CV : d'une manière générale, le naproxène apparaît avoir moins d'effets indésirables CV comparés aux Coxibs<sup>151</sup>. Il existe encore peu de données concernant le risque spécifique de chaque AINS chez les patients PR. Par conséquent, l'utilisation des AINS doit être évitée ou prise en considération chez les patients PR ayant des FDRCV élevés. Si l'utilisation d'AINS est inévitable, la pression artérielle et la fonction rénale doivent être vérifiées régulièrement et le naproxène est probablement le premier choix.

### *Les DMARDs classiques*

L'ensemble des données de la littérature montre une capacité protectrice du méthotrexate sur le risque CV en cas de PR<sup>133, 152-154</sup>. Néanmoins, par son effet inhibiteur de folates, il induit une hyperhomocystéinémie qui constitue aussi un facteur indépendant de risque CV<sup>155</sup>. Par conséquent, une supplémentation en folates pourrait être envisagée dans des cas extrêmes pour normaliser le niveau d'homocystéine. Les autres DMARDs classiques comme le leflunomide et l'hydroxychloroquine sont connus pour induire une HTA, un syndrome métabolique et une dyslipidémie<sup>156-158</sup>. Néanmoins, leur effet sur la mortalité CV des patients PR n'est pour l'instant pas déterminé.

### *Les DMARDs biologiques*

Les anti-TNFα induisent globalement un effet bénéfique en réduisant le risque CV des patients PR<sup>140, 159</sup> même si les données cliniques disponibles tendent à dire que cet effet est moindre comparé à celui du méthotrexate<sup>138, 160</sup>. Les mécanismes par lesquels les agents anti-TNFα pourraient réduire les complications CV semblent être multifactoriels et n'ont pas été complètement déterminés. On note parmi les explications possibles : une réduction de l'inflammation systémique, un effet positif sur le profil lipidique, un impact bénéfique sur la fonction endothéliale. Ce dernier point suscite encore beaucoup de questions puisque les données concernant l'effet des anti-TNFα sur la fonction endothéliale sont contradictoires.

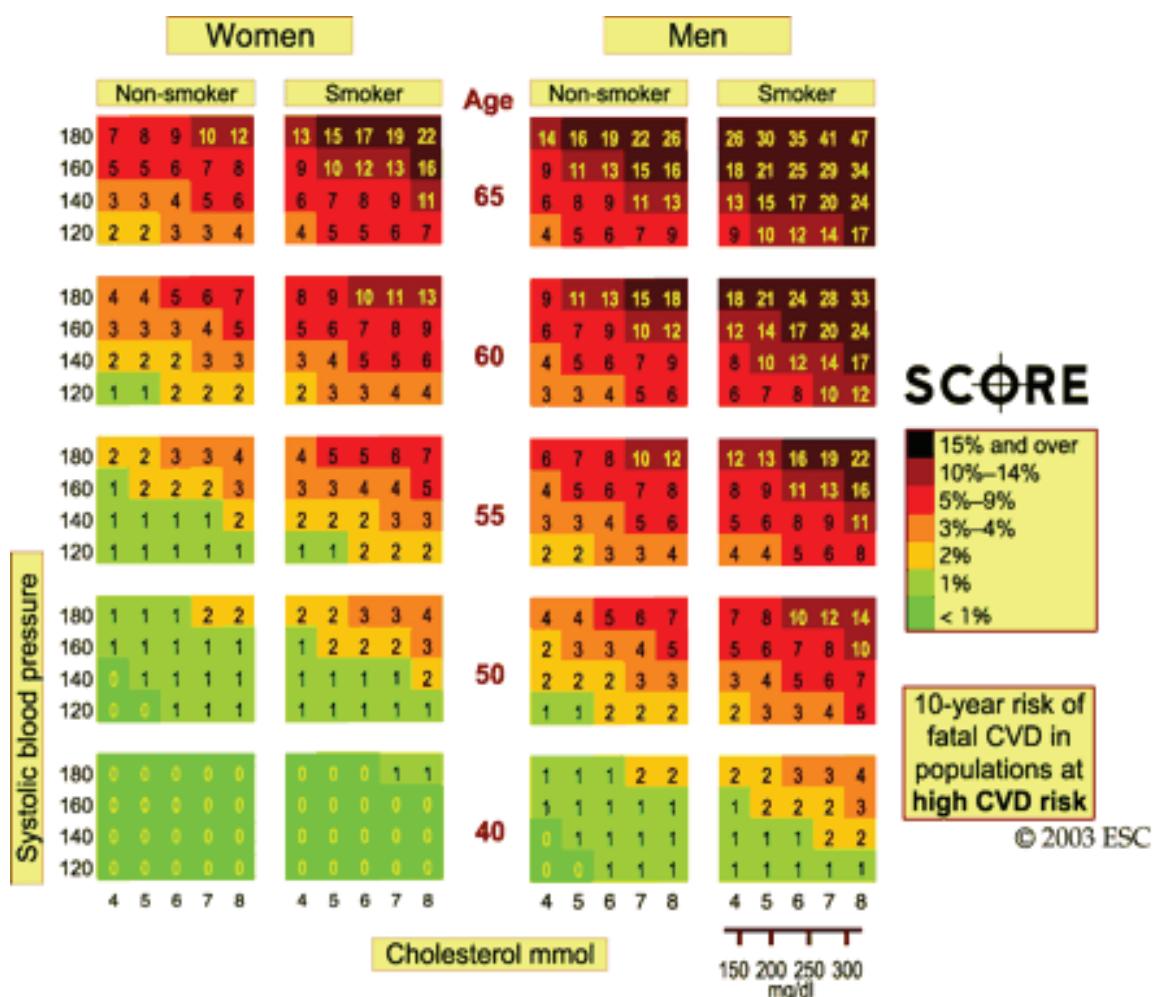
Les autres biomédicaments comme le Tocilizumab (antagoniste des récepteurs à IL-6), ou encore le Rituximab (anti-CD20 lymphocytaire) semblent également avoir des effets bénéfiques sur la fonction endothéliale, en dépit d'une augmentation du taux de cholestérol total et de LDL. Des études plus élargies doivent être conduites pour évaluer l'impact des DMARDs biologiques sur le risque CV en cas de PR.

### *Les statines*

En cas de PR avec un taux de cholestérol élevé, l'utilisation des statines a pour objectif de prévenir les manifestations CV délétères. De par leurs actions pleiotropes, elles sont capables de réduire l'inflammation, d'améliorer la rigidité vasculaire et de corriger la DE<sup>161, 162</sup>. Une intéressante méta-analyse publiée en 2014 montre clairement que les statines sont associées à une réduction d'événements et de mortalité CV chez le patient PR lorsqu'elles sont utilisées en prévention primaire, et non en prévention secondaire<sup>163</sup>. Toutefois, l'administration de statines en discontinu peut occasionner un effet indésirable puisque associée à une augmentation du risque d'infarctus du myocarde de 2% à chaque mois d'interruption<sup>164</sup>. De plus une interaction médicamenteuse avec le rituximab a été observée<sup>165, 166</sup>. Malgré une relative sécurité des statines, son utilisation doit respecter les recommandations en vigueur.

## II.4 Evaluation clinique et prise en charge du risque cardiovasculaire des patients PR

Depuis 2010, l'EULAR a reconnu la PR comme un facteur de risque CV indépendant et a encouragé pour chaque patient, un suivi régulier de ce risque suivant les recommandations nationales de chaque pays<sup>48</sup>. Il existe plusieurs modèles d'évaluation du risque CV dont les plus utilisés sont le score de Framingham et le modèle SCORE. Le score de Framingham évalue le risque coronarien (événements mortels ou non) à 10 ans. Il tient compte du sexe, âge, cholestérol total, HDL, tabagisme, présence de diabète, présence de pression artérielle systolique (traitée ou non). A sa différence, le modèle SCORE estime le risque de décès d'origine CV à 10 ans et il prend en compte les mêmes facteurs que Framingham à l'exception de HDL, du diabète, des âges inférieurs à 45 ans et supérieurs à 65 ans (**Figure 9**).



**Figure 9.** Evaluation du risque cardiovasculaire par le modèle SCORE<sup>167</sup>.

> 15% : très haut risque cardiovasculaire.

5-15% : haut risque cardiovasculaire.

1-5% : risque modéré

<1% : bas risque.

Ainsi le modèle SCORE est considéré plus adapté aux patients PR comparé au modèle Framingham<sup>63, 64</sup>. Toutefois, dans la PR, la valeur du SCORE obtenue doit être multipliée par 1.5 en présence de 2 des 3 critères suivants : durée de la maladie de plus de 10 ans, FR ou ACPA positif, présence de manifestations extra-articulaires<sup>48</sup>. En cas de risque CV élevé (score > 5%) et devant un terrain favorable à la dyslipidémie et à l'HTA, le clinicien doit initier un traitement hypocholestérolémiant (statines) et/ou antihypertenseur (inhibiteurs de l'enzyme de conversion : IEC ou antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II). Les corticoïdes et les AINS peuvent être administrés, avec précaution. L'arrêt du tabac doit-être préconisé<sup>168</sup>.

Il apparaît que ces recommandations utilisent des outils, qui ont certes le mérite de s'intéresser au risque CV du patient PR, mais qui sont encore incomplets pour un diagnostic précoce, pour une stratification précise du risque et donc pour une meilleure prise en charge<sup>74</sup>.

D'une part, les données récentes de la littérature montrent qu'en dépit de cette correction prenant compte des facteurs de risque CV spécifiques de la PR, l'indice SCORE modifié (SCOREm) reste insuffisant pour évaluer correctement le risque CV des patients<sup>169</sup>. En effet, une étude prospective réalisée chez 775 patients PR montre qu'avec cette méthode, un grand nombre de patients PR ayant un risque CV élevé échappent au screening, et donc échappent à la thérapeutique à visée cardiovasculaire<sup>170</sup>. Ainsi, la recherche de plaques d'athérome par ultrasonographie carotidienne se rajoute aux nouvelles recommandations et doit être réalisée au moins annuellement<sup>168</sup>. Cette nouvelle considération permet une meilleure reclassification du risque CV puisque elle récupère 63 % des patients qui étaient classés en risque « modérés » avec le SCOREm<sup>108</sup>.

Néanmoins, l'objectif de maîtriser le plus rapidement l'évolution et la sévérité de la maladie est maintenu, car il constitue l'un des moyens permettant partiellement de prévenir les complications CV ultérieures<sup>171-174</sup>. Cependant, la question du choix du traitement de 1<sup>ère</sup> intention qui viserait à la fois la rémission clinique et la diminution de la comorbidité CV, se pose toujours. Une récente étude rétrospective<sup>175</sup> sur 20 811 patients atteints de PR, a comparé différents traitements de fond entre eux (anti-TNF-α versus autres DMARDs) et n'a pas montré de différence statistiquement significative sur le plan cardiovasculaire, toutes causes confondues (comme l'apparition de l'athérosclérose, d'insuffisance cardiaque congestive, de maladie artérielle périphérique, ou d'une maladie cérébro-vasculaire, et le risque de décès). De plus, en dépit des récentes méta-analyses sur les statines, les bénéfices réels des interventions pharmacologiques choisies en cas de comorbidité CV dans la PR, ont été peu étudiés. L'observance des stratégies non-pharmacologiques de prévention CV (activité physique, mode de vie) reste également à améliorer chez les patients PR<sup>176</sup>.

De toute évidence, de grandes études prospectives sont nécessaires pour clarifier les stratégies visant à prévenir ou réduire la mortalité CV chez les patients atteints de PR<sup>172, 177, 178</sup>. Il est encore difficile de savoir quelle classe pharmacologique et quelle stratégie thérapeutique est la mieux adaptée pour

réduire le risque CV dans la PR. L'utilisation de marqueurs circulants pourrait renforcer l'évaluation clinique du risque CV des patients PR. Des paramètres reflétant le métabolisme lipidique, l'inflammation, le stress oxydatif, et la dysfonction endothéiale, constituent des pistes intéressantes à approfondir<sup>179</sup>.

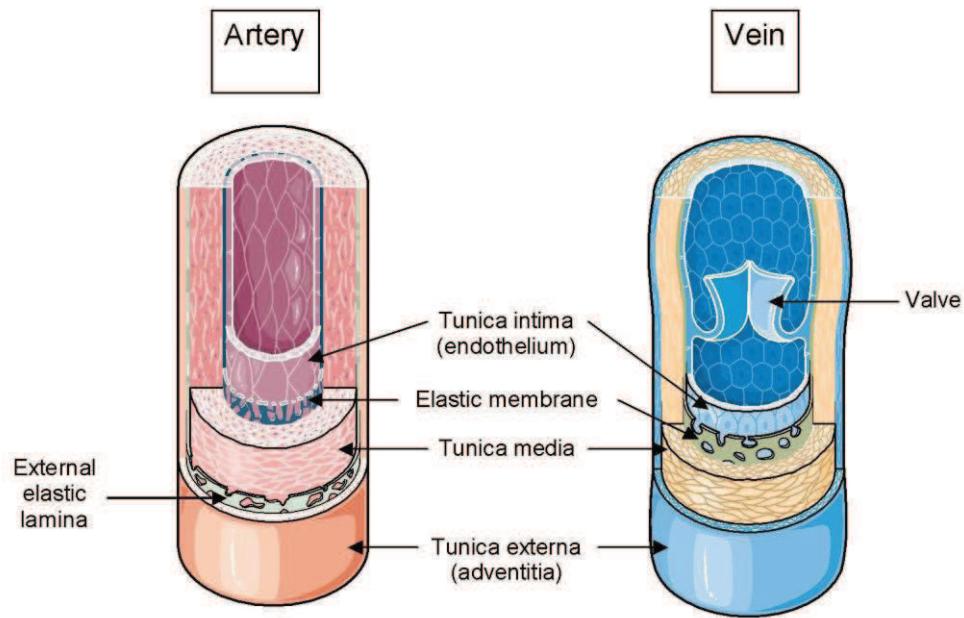
## Chapitre III. La dysfonction endothéiale dans la PR

Il est bien établi que l'activation endothéiale et la dysfonction endothéiale (DE) sont deux paramètres qui précèdent et qui initient l'athérosclérose<sup>116</sup>. La DE se présente donc comme un élément crucial sur le plan diagnostique et pronostique du risque CV. Le point important à considérer est aussi que la DE est une altération phénotypique *réversible* de l'endothélium, et de ce fait, elle se présente comme une cible thérapeutique potentielle pour réduire le risque CV dans la PR. Ce chapitre traite la physiologie de l'endothélium, la définition de la DE et des mécanismes physiopathologiques qui la sous-tendent ; décrit les méthodes de mesure ; et enfin résume les données actuelles concernant la DE chez les patients PR.

### III.1 Physiologie de l'endothélium

#### III.1.1 Les différents lits vasculaires : structure et fonction

Le réseau vasculaire s'organise en artères, en artéries, en capillaires et en système veineux. Leurs spécificités sont résumées dans le tableau n°2 suivant. La paroi des vaisseaux est constituée de 3 tuniques qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur: l'intima formée de l'endothélium et d'un tissu conjonctif sous-jacent; la média riche en cellules musculaires lisses (CML), en fibres de collagène et d'élastine assurant la vasomotricité vasculaire ; et enfin l'avventice composé majoritairement de tissu conjonctif, jouant un rôle de soutien. Entre ces 3 tuniques, on distingue la limitante élastique interne et la limitante élastique externe (**Figure 10**). Toutefois, la structure et la composition de cette paroi vasculaire varient selon le lit vasculaire considéré<sup>180</sup> (**Tableau 2**). Ainsi, par définition, la notion de lit « macrovasculaire » représente toutes les grosses et moyennes artères qui assurent une fonction de conductance (aorte, artère pulmonaire, carotide, artère brachiale, artère fémorale, artère radiale). Par consensus, la « microcirculation » regroupe globalement tous les vaisseaux dont le diamètre est inférieur à 100-200 µm (petites artères, artéries, capillaires, veinules) et dont la caractéristique commune est leur capacité à moduler la résistance vasculaire périphérique, assurant pour 70-90% la régulation de la pression artérielle systémique<sup>181</sup>.



**Figure 10:** Les différentes tuniques de la paroi vasculaire<sup>182</sup>.

**Tableau 2 :** Les différents types de vaisseaux sanguins : fonctions et structure.

Lit vasculaire	fonction	structure	exemples
Artères (macro)	artères de conductance : distribution, transport du sang jusqu'aux lits capillaires	large calibre, paroi épaisse, endothélium continu, CML +, élastine +++,	aorte, artère pulmonaire, carotide
	artères musculaires	calibre moyen, CML +++, élastine ++.	artère brachiale, radial, fémorale, grosses coronaires
Artéries (micro)	artères de résistance	CML++, endothélium	Artères mésentérique, rénale, coronaire
Capillaires (micro)	rôle d'échange	Endothélium fenêtré et discontinu	Capillaires de la peau
Veinules (micro) et veines (macro)	Fonction de capacitance : assure le retour veineux	paroi fine et souple, endothélium, valvules +++	-

Macro : macrocirculation, micro : microcirculation, CML : cellules musculaires lisses.

### **III.1.2 Rôle de l'endothélium vasculaire**

L'endothélium représente donc la fine monocouche cellulaire bordant la paroi interne des vaisseaux sanguins. Longtemps considéré comme une simple barrière anatomique, on sait aujourd'hui qu'il peut être assimilé à un « organe endocrine » à part entière, jouant un rôle essentiel dans de multiples régulations physiologiques<sup>183</sup>. Sa surface totale s'étale sur 4000-7000 m<sup>2</sup> (soit équivalente de 6 terrains de tennis) et se repartit majoritairement dans la microcirculation<sup>184</sup>. Sa masse cumulée est évaluée à 1% de la masse corporelle.

Il assure les échanges de gaz et de métabolites entre le sang et les CML et contribue à travers la synthèse et la libération de facteurs endothéliaux à la régulation de la vasomotricité, de la croissance cellulaire, de l'hémostase. Il exerce des effets anti-inflammatoires par inhibition d'adhérence et de migration des leucocytes ; et possède des propriétés anti-thrombotiques et anticoagulantes<sup>185</sup>.

L'endothélium présente des hétérogénéités selon les lits vasculaires, ou même selon différentes sections d'un même lit vasculaire. D'abord morphologiquement, l'endothélium peut-être de type continu, fenestré ou discontinu ; les 2 dernières formes sont rencontrées essentiellement au niveau des capillaires. Ensuite on note des différences de taille, de forme, de l'orientation des cellules par rapport au flux sanguin, de quantité de vésicules plasmiques, de complexité des jonctions inter-endothéliales et de composition biochimique des surfaces membranaires. Les revues de la littérature rapportent également des différences phénotypiques concernant les flux calciques, l'expression protéique, la migration/prolifération, la perméabilité, l'adhésion/migration leucocytaires, la production de médiateurs inflammatoires. Ces variations vont conditionner les différences de fonction assurées par les différents lits vasculaires<sup>180, 186-188</sup>. Il est important de préciser que les caractéristiques précitées diffèrent également selon les espèces (l'homme, le rat, la souris).

L'endothélium est constamment exposé à un stress mécanique et chimique. Il est renouvelé et réparé à partir des cellules souches de la moëlle osseuse, dont les plus connues sont les cellules progénitrices de l'endothélium (CEP) et les cellules endothéliales matures circulantes (CECs)<sup>189</sup>.

### **III.1.3 Les facteurs vasomoteurs endothéliaux<sup>190, 191</sup>**

L'endothélium est capable de synthétiser et de libérer différents médiateurs, classiquement définis en fonction de leur impact sur la vasomotricité. Parmi les substances vasodilatrices dérivées de l'endothélium (endothelium-derived relaxing factor), on trouve le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF : endothelium-derived hyperpolarizing factor). L'effet de ces substances est contrebalancé par des substances vasoconstrictrices (endothelium-derived constricting factor) telles que l'endothéline-1 (ET-1), le thromboxane A2 (TXA<sub>2</sub>), et l'angiotensine II (ANG-II)<sup>192</sup>. Seuls les facteurs vasodilatateurs sont présentés dans les paragraphes suivants.

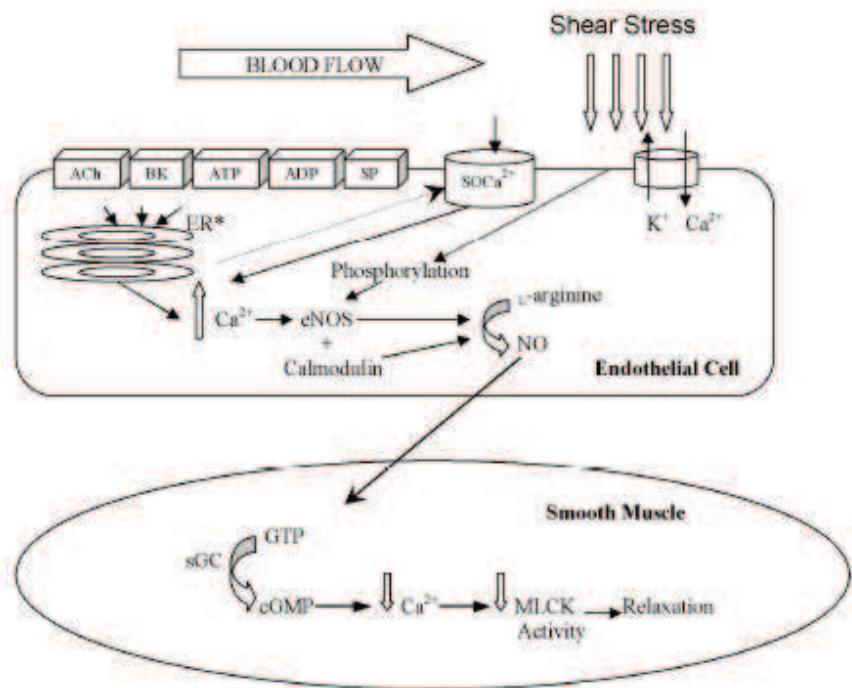
### *Le monoxyde d'azote (NO)*

Le NO est la substance vasodilatatrice la mieux étudiée chez l'homme<sup>192</sup>. C'est un gaz radicalaire dont la demi-vie est de l'ordre de la milliseconde mais qui est suffisante pour permettre son interaction avec différentes cibles cellulaires.

La biosynthèse du NO est assurée par les NO-synthases (NOS), en présence d'oxygène et de cofacteurs tels que le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), le tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), la flavine adénine dinucléotide et la flavine mononucléotide. La réaction d'oxydation transforme le substrat L-arginine en L-citrulline et NO<sup>193</sup>. Le NO hydrophobe diffuse dans les CML où il stimule la guanylate cyclase provoquant une relaxation via la conversion de guanosine triphosphate (GTP) en guanosine-monophosphate cyclique (GMPc). Une partie du NO est relarguée dans la lumière vasculaire où il inhibe d'autres processus majeurs présidant la survenue de l'athérosclérose, dont l'adhésion, l'agrégation plaquettaires, la migration des leucocytes et la prolifération des CML<sup>194</sup>. La libération de NO est modulée par des stimuli physiques tels que les contraintes de cisaillement (shear stress) exercées sur la paroi artérielle, ou encore des stimuli hormonaux (médiateurs) tels que la bradykinine, l'acétylcholine, l'adénosine diphosphate (ADP), la substance P (**Figure 11**).

La production de NO est également sous la dépendance des modifications post-traductionnelles de NOS et de la disponibilité en substrat (L-arginine) et en coenzyme (BH<sub>4</sub>). Il existe 3 isoformes de NOS :

- 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 épithéliales ou les CML de la couche média.
- 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 ou des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 ou le TNF-α. Il s'agit de l'isoforme la plus susceptible de produire d'importantes quantités de NO.
- L'isoenzyme de type III : (NOS3 ou NOS-III, NOS endothéliale ou eNOS) est présente de façon constitutive dans les cellules endothéliales et les cardiomyocytes.



**Figure 11.** Production endothélique de NO et son action sur la cellule musculaire lisse. Ach : acétylcholine, BK : bradykinine, ATP : adénosine triphosphate, ADP : adénosine diphosphat, SP : substance P,  $\text{SOCa}^{2+}$  : canaux calciques, ER : réticulum endoplasmique, GTP : guanosine-triphosphate, GMPC : 3',5' guanosine-monophosphate cyclique, GCs : guanylate cyclase, MLCK : myosine kinase<sup>194</sup>.

#### Prostacycline ( $\text{PGI}_2$ )

Il s'agit d'un dérivé de l'acide arachidonique produite par l'action successive la cyclo-oxygénase-1 (COX-1) endothélique et de la PGI2 synthétase. Elle induit la relaxation des CML en activant l'adénylate cyclase via un récepteur spécifique. En condition physiologique, la prostacycline ne joue qu'un rôle mineur dans la relaxation endothélium-dépendante artérielle, et est activée principalement par les forces de cisaillement.

#### Facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF)

L'EDHF regroupe l'ensemble des facteurs capables d'induire une hyperpolarisation de la membrane des CML via des canaux potassiques dépendants du calcium. Sa nature exacte reste incertaine et multiple (par exemple : ions  $\text{K}^+$ , dérivés des cytochromes P450, le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), dérivés des lipoxygénases, peptide natriurétique). Son rôle est important dans la vasodilatation endothéiale-dépendante de la microcirculation<sup>188, 195</sup> et constitue un moyen de compensation quand les voies de NOS et COX sont altérées.

### **III.2 Définition de la dysfonction endothéliale**

Le terme « dysfonction endothéliale » (DE) est largement utilisé pour décrire toute forme d'altération fonctionnelle réversible des cellules endothéliales, conduisant à une vasodilatation réduite, un état pro-inflammatoire, pro-prolifératif et pro-thrombotique. Elle est communément assimilée à une réduction de la disponibilité vasculaire en NO. Ce déficit en NO contribue aussi à la progression de la plaque d'athérome, à l'épaississement de la paroi vasculaire, à la dégénérescence des fibres d'élastine et au dépôt accru de collagène dans la paroi vasculaire<sup>196</sup>. La DE constitue un élément précoce de l'athérogenèse et précède la survenue des remaniements morphologiques vasculaires<sup>190, 192</sup>. Alors que l'athérosclérose touche préférentiellement les artères de gros calibre (aorte, artère carotide, artère coronaire), il apparaît de plus en plus évident que la DE au niveau des lits microvasculaires joue un rôle important dans la détérioration de différents organes tels que le cœur, le cerveau et les reins<sup>181</sup>. Ainsi, la DE microvasculaire est largement mise en cause dans la physiopathologie des maladies cardio-métaboliques<sup>197, 198</sup>. De plus, elle semble être sous-tendue par des mécanismes différents de ceux de la DE macrovasculaire. Les méthodes d'exploration de la fonction endothéliale diffèrent elles-aussi selon le lit vasculaire considéré<sup>188</sup>.

#### **III.2.1 Evaluation de la fonction endothéliale chez l'homme<sup>199-205</sup>**

La preuve initiale de l'existence d'une DE touchant les artères coronaires atteintes d'athérosclérose a été apportée en 1986 par *Ludmer et al.*<sup>206</sup> qui ont réalisé une coronarographie quantitative après perfusion intracoronarienne d'acétylcholine. Depuis, des techniques moins invasives ont vu le jour, qui diffèrent selon le lit vasculaire étudié mais dont le principe de base reste le même (**Figure 12**). Une artère saine se dilate soit par hyperémie réactionnelle post-ischémique (vasodilatation flux-dépendante) soit en réponse à l'effet vasodilatateur d'un agent pharmacologique dépendant de l'endothélium comme l'acétylcholine, la bradykinine ou la sérotonine (réactivité vasculaire). Cette vasodilatation est mesurée soit par technique d'imagerie (Laser Doppler imaging par exemple), soit par mesure du flux (pléthysmographie ou Laser doppler fluxmétrie par exemple). En cas de DE, cette vasodilatation dépendante de l'endothélium est atténuée ou absente. Etant donné que dans la majeure partie des publications, l'évaluation de la fonction endothéliale est réalisée au niveau d'artères de conductance dans lesquelles la vasorelaxation est majoritairement NO-dépendante, la DE chez l'Homme est principalement assimilée à une réduction de la disponibilité vasculaire en NO. Chacune des techniques citées ci-dessous ont leurs avantages et inconvénients.

##### *Mesure de la fonction endothéliale macrovasculaire (artères de conductance)*

- **Vasodilatation dépendante du flux (FMD : flow-mediated dilation):** il s'agit de la méthode la plus couramment utilisée chez l'homme car non-invasive. La FMD évalue la capacité d'une artère à se dilater après occlusion puis levée de l'occlusion d'une artère de conductance (hyperémie réactionnelle

post-occlusive), le plus souvent au niveau de l'artère brachiale proximale, le brassard de compression étant posé au niveau de la fosse antécubitale (zone près du coude). Elle est exprimée en pourcentage de variation du diamètre maximal post-occlusif par rapport à la valeur pré-ischémique. Son avantage est qu'au cours de l'expérimentation, l'exploration de la vasodilatation endothélium-indépendante est possible grâce à une administration sublinguale de nitroglycérine (donneur de NO). La FMD est une méthode non-invasive, peu coûteuse, et relativement facile à utiliser. Par contre, elle nécessite une grande expérience de l'expérimentateur pour obtenir une mesure reproductible.

- **La réactivité des artères coronaires épicardiques :** elle consiste à mesurer les changements de diamètre de ces artères coronaires de conductance en réponse à un stimulus endothélium-dépendant (acétylcholine), à l'aide d'une angiographie coronaire quantitative ou d'une échographie intravasculaire. Cette méthode est coûteuse, invasive et n'est pas adaptée à des mesures répétées ni à des grandes cohortes de sujets<sup>207</sup>.

#### *Mesure de la DE microvasculaire (artères de résistance)*

- **Pléthysmographie de l'artère brachiale :** la « **Forearm perfusion technique** » constitue l'une des premières méthodes développée pour mesurer la fonction endothéliale microvasculaire. Elle consiste à cathéteriser l'artère brachiale afin d'y injecter directement une substance vasodilatatrice (acétylcholine par exemple) puis à mesurer la variation du flux sanguin au niveau de tout le lit périphérique de l'avant-bras par pléthysmographie, reflétant ainsi la vasodilatation de la microcirculation.

L'avantage de ces techniques réside dans le fait que le bras controlatéral est utilisé comme « contrôle » interne. De plus, elle permet d'étudier les mécanismes physiologiques impliqués dans la relaxation par injection d'agents pharmacologiques adaptés. Cependant, son caractère invasif constitue une limite à son utilisation en pratique courante.

**La « venous occlusion plethysmography ou forearm blood flow (FBF) »** est une variante de la Forearm perfusion technique, la réponse de l'endothélium est dans ce cas évaluée après obstruction de l'écoulement veineux réalisé en gonflant un brassard autour de la partie supérieure du bras à une pression proche de la pression diastolique. Lors de cette occlusion veineuse (blocage du retour veineux), si le flux artériel n'est pas entravé, l'avant-bras augmente de volume à une vitesse proportionnelle à la vitesse du flux artériel, lui-même dépendant de la réponse de l'endothélium au flux.

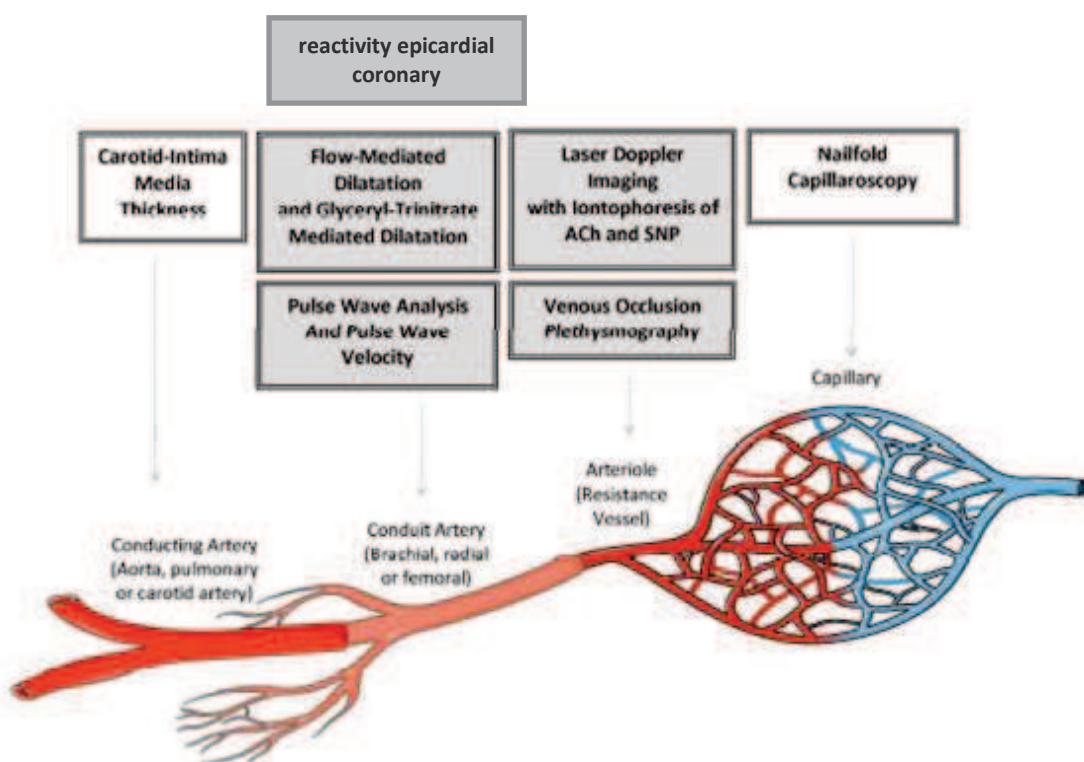
- **Iontophorèse couplée au Laser Doppler :** elle consiste à mesurer la vasodilatation au niveau des microvaisseaux cutanés suite à une injection locale d'acétylcholine ou de nitroprussiate de sodium (donneur de NO) par iontophorèse. La perfusion est évaluée par Laser Doppler de type imaging (LDI) qui permet d'avoir un calcul sur une surface donnée ou par Laser Doppler associé au flux (LDF) qui évalue la vasodilatation sur un seul point<sup>208, 209</sup>. C'est une méthode récente, facile à utiliser. Cependant

les protocoles utilisés doivent être mieux standardisés puisque la reproductibilité des mesures est loin d'être satisfaisante.

- **Tonométrie artérielle périphérique ou pléthysmographie digitale :**

La société Itamar Medical a conçu un appareil totalement automatisé (endoPAT) permettant la mesure de la fonction endothéliale par tonométrie artérielle. Cette technique mesure les modifications du volume artériel pulsatile au niveau d'un doigt par plethysmographie, lors d'une hyperémie consécutive à l'occlusion de l'artère humérale. Son grand avantage réside dans le fait que le bras contralatéral constitue un témoin interne, et que sa réalisation prend peu de temps et est totalement opérateur-indépendante. Cette technique étant récente, sa valeur diagnostique et prédictive doit être validée sur de grandes cohortes de patients.

- Une autre technique comme la **capillaroscopie périunguiale** explore par microscopie optique, de manière non invasive les anomalies morphologiques et fonctionnelles des anses capillaires du derme superficiel. Cette dernière est plus utilisée dans les pathologies dermatologiques (exemples sclérodermie, syndrome de Raynaud) où l'on rencontre des signes non spécifiques de souffrance capillaire telles que des hémorragies, des œdèmes très localisés et des ramifications de néogenèse capillaire.
- D'autres techniques comme l'échocardiographie trans-thoracique ou encore le PET (positron emission tomography) sont en cours de développement pour évaluer les flux et les réserves de flux coronaire<sup>210</sup>.



**Figure 12.** Méthodes de mesure clinique de la fonction endothéliale selon les lits vasculaires<sup>182</sup>:

- Evaluation morphologique
- Evaluation fonctionnelle

#### *Autres méthodes d'évaluation de la fonction endothéliale*

- **L'épaisseur Intima-Média (EIM, IMT en anglais) et la rigidité artérielle :** ce sont des paramètres fréquemment utilisés comme marqueurs de fonction endothéliale macrovasculaire, en raison de leur caractère non invasif, de leur bonne reproductibilité et de leur facilité d'utilisation. L'IMT évalue par échographie l'épaisseur de l'intima et de la media de l'artère carotide commune ou interne ; elle reflète les modifications structurales des parois vasculaires. La rigidité artérielle est mesurée par la vitesse de l'onde de pouls, le plus souvent évaluée entre la carotide et les doigts. Sa mesure est couplée à un tonomètre d'aplanation et à un oxymètre distal (capteur infrarouge de flux). La vitesse de l'onde pulsatile (VOP) (pulse wave velocity) obtenue représente la vitesse avec laquelle le pouls traverse le système artériel ; vitesse directement liée à la rigidité artérielle. Cependant, à la différence de la DE qui représente une fonction, ces paramètres reflètent plus des altérations morphologiques et mécaniques. En effet, il existe des discordances de relation entre IMT, rigidité artérielle et fonction endothéliale qui selon les études et les pathologies, peuvent être présentes simultanément chez un même patient, ou peuvent se manifester l'une indépendamment de l'autre<sup>211, 212</sup>. Leur utilisation comme marqueurs de DE est donc discutable.
- Plusieurs « biomarqueurs » circulants de la DE tels que les molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1, E- et P-selectines), la CRP, l'IL-6, le facteur von Willebrand (vWF), les cellules endothéliales circulantes, les microparticules, l'endothéline, l'adiponectine, l'inhibiteur endogène de la NO synthase (ADMA : Asymmetric dimethylarginine) ont été proposés, mais aucun n'a pu être validé pour l'instant dans la PR<sup>179, 213</sup>.

### **III.2.2 Dysfonction endothéliale et risque cardiovasculaire dans la population générale**

Comme nous l'avons décrit précédemment, la dysfonction endothéliale (DE) est un élément précoce favorisant l'installation de l'athérosclérose et la vulnérabilité des plaques d'athérome ; elle participe ainsi à l'augmentation du risque CV<sup>189, 192</sup>. La DE traduit l'impact des facteurs de risque CV sur la santé vasculaire. La plupart des pathologies CV sont associées à une DE, même s'il est souvent difficile de déterminer si la DE observée est une cause ou une conséquence de la pathologie.

Il est reconnu que la DE macrovasculaire est un marqueur prédictif d'athérosclérose<sup>192, 214</sup> et est associée à un certain nombre de facteurs de risque CV traditionnels comme le vieillissement, le tabagisme, l'hypertension et la dyslipidémie<sup>215</sup>. De nombreuses études ont établi un lien entre DE, micro- ou macrovasculaire et le risque CV. La valeur prédictive de la DE sur les événements et la mortalité CV a été démontrée dans plusieurs populations ayant des maladies CV établies ou déclarées. La mesure de la fonction endothéliale permet une meilleure stratification du risque CV, complémentaire aux informations données par le score de Framingham. Plus intéressant encore, la mesure de la fonction endothéliale présente une valeur prédictive d'événements CV futurs lorsqu'elle est mesurée chez des individus ne présentant aucun signe CV apparent<sup>216, 217</sup>. Dans ces populations

asymptomatiques seule la mesure de la DE microvasculaire présente une valeur prédictive, et non la FMD<sup>218</sup>.

Malgré l'évolution considérable des techniques de mesure de la DE chez l'Homme, la mesure de la fonction endothéliale n'est pas encore utilisée en routine comme élément de diagnostic et de suivi des pathologies CV, chez lesquels les algorithmes de calcul de risque CV sont bien adaptés. Il pourrait en être autrement chez les patients PR<sup>192</sup>.

### **III.3 DE au cours de la PR : données cliniques**

#### **III.3.1 Généralités**

La présence d'une DE dans la PR a été mise en évidence pour la première fois en 2002 par l'étude de *Bergholm et al.*<sup>219</sup>, dans laquelle les auteurs rapportaient une diminution de la vasodilatation acétylcholine-dépendante au niveau de l'avant-bras (forearm blood flow) chez les patients arthritiques comparés à un groupe témoin (DE microvasculaire).

Depuis, des revues systématiques de la littérature ont confirmé l'existence de cette DE dans la PR comparativement à des sujets sains. La majorité des études ont étudié la DE du lit macrovasculaire qui est le site préférentiel de l'athérosclérose. Elles rapportent soit une réduction significative de la FMD brachiale<sup>220-223</sup>, soit une augmentation de l'épaisseur intima-média carotidienne, et/ou encore une augmentation de la rigidité artérielle<sup>93, 224-226</sup>.

Compte tenu de l'incidence élevée des manifestations ischémiques dans la PR (myocardiques, cérébrales, rénales)<sup>53, 227</sup> et étant donné le rôle que joue le lit microvasculaire dans le métabolisme de ces tissus périphériques, il s'est avéré important d'étudier la DE microvasculaire des patients PR et de déterminer le lien entre ces 2 lits vasculaires.

Un autre élément important concernant la DE dans la PR est son moment de survenue au décours de la maladie et son lien avec la sévérité de la maladie. La réponse à cette question se heurte à la difficulté de définir la phase précoce de la PR en lien avec la sévérité de la maladie de la PR. Par exemple, certains auteurs définissent comme PR récente, toute PR dont les symptômes cliniques datent de 1 à 3 mois<sup>228</sup>. D'autres incluent des patients allant jusqu'à 12 mois de symptômes (moyenne=6 mois) mais obtiennent au final des DAS28 très différents<sup>99, 229</sup> ou encore 18 mois avec une activité de la maladie non renseignée<sup>219</sup>. Ainsi une activité élevée de la maladie à un stade précoce de la maladie et une activité faible à un temps tardif de la PR<sup>221, 230</sup> ou *vice-versa*, sont des tableaux cliniques possibles en cas de PR. De la même manière, les critères de classification de la sévérité de la maladie change d'une étude à l'autre. Si d'une manière générale, les auteurs utilisent le DAS28 comme critère de sévérité<sup>221, 230</sup>, certains considèrent uniquement le statut inflammatoire global (le taux circulants de CRP ou la VS)<sup>231</sup>. Ces deux paramètres de durée et d'activité de la maladie doivent donc être considérés séparément et doivent apparaître de manière plus précise dans chaque étude.

### **III.3.2 La DE selon les lits vasculaires**

*La DE macrovasculaire :*

La FMD des artères brachiales est la méthode la plus utilisée pour caractériser la DE macrovasculaire des patients PR<sup>232</sup>. Une revue systématique de la littérature incluant 57 études transversales et 27 longitudinales démontre qu'il y a suffisamment de preuves pour attester de la présence de DE macrovasculaire dans la PR<sup>220</sup>. Plusieurs données soutiennent le fait que la DE macrovasculaire peut apparaître précocement et s'aggraver au fur et à mesure de la chronicité de la maladie. Tout d'abord *Foster et al.*<sup>228</sup> rapporte une fonction endothéliale normale chez des patients nouvellement diagnostiqués depuis moins d'un mois. Ensuite la FMD a été remarquée significativement réduite chez des patients ayant en moyenne 12 mois de maladie<sup>97</sup>. L'étude de *Södergren*<sup>99</sup> en 2010, menée chez des patients PR ayant des symptômes datant de moins d'une année montre que la FMD devient anormale après 18 mois de suivi. Dans cette étude, les auteurs considèrent que ce suivi de 18 mois correspond toujours à un stade précoce de la maladie. Dans le même sens, l'équipe de *González-Juanatey et al.*<sup>233</sup> rapporte une FMD diminuée chez des patients après plus de 14 ans de maladie, alors que ceux ayant une PR depuis moins de 7 ans ont une FMD normale. Néanmoins, d'autres études rapportent la présence de DE macrovasculaire indépendamment de la sévérité de la maladie, même quand l'activité de la PR est considérée comme faible<sup>221</sup>.

*La DE microvasculaire :*

A l'heure actuelle, peu d'études ont comparé la DE microvasculaire des patients PR par rapport à celle de sujets sains. Les résultats sont encore très controversés. Deux études menées respectivement chez 20 et 12 patients PR (versus 33 et 13 individus Contrôles) montrent une réduction significative de la vasodilatation NO-dépendante mesurée par pléthysmographie de l'artère brachiale<sup>219, 234, 235</sup>. Une autre étude menée sur un plus grand nombre de patients montre également la présence de DE microvasculaire chez des patients PR ne présentant pas d'antécédents CV ni de signes CV apparents (65 patientes PR versus 40 sujets témoins)<sup>236</sup>. Une DE au niveau de la microcirculation cutanée (réactivité hyperémique des capillaires cutanés mesurée par laser Doppler) a été également mise en évidence par l'équipe de *Meyer et al.*<sup>237</sup>. Une autre équipe tire la même conclusion en utilisant la technique d'iontophorèse cutanée d'accétylcholine (LDi) chez des patients PR en pleine poussée inflammatoire<sup>238</sup>. Paradoxalement, deux autres études ne montrent pas de différence de cette LDi chez les patients PR comparés à des sujets sains : la première a été menée chez 66 patients avec une durée moyenne de maladie égale à 10 ans<sup>239</sup> et la deuxième chez 15 patients nouvellement diagnostiqués avec une PR d'activité modérée<sup>231</sup>.

De façon surprenante, les DE macrovasculaire et microvasculaire semblent être indépendantes l'une de l'autre<sup>240</sup>. L'évolution temporelle de la DE microvasculaire reste à mieux élucider dans la PR. Ce dernier point est important à résoudre car les lits micro et macrovasculaires pourraient être

différemment affectés par la PR. Des recherches supplémentaires sont également nécessaires pour déterminer si la DE a une valeur pronostique des complications CV dans la PR, et si la DE micro et macrovasculaire ont la même valeur sur ce point.

### **III.3.3 Les mécanismes impliqués dans le développement de la DE en cas de PR** <sup>232, 241, 242</sup>

La DE dans la PR résulte probablement de l'interaction complexe entre plusieurs paramètres incluant les facteurs traditionnels de risque CV, une prédisposition génétique et auto-immune, une inflammation chronique, un statut pro-oxydatif et pro-thrombotique, un déséquilibre métabolique (insulino-résistance ou dyslipidémie). Ces différents paramètres sont connus pour interagir avec l'endothélium, mais leur rôle respectif dans l'installation de la DE dans la PR reste mal connu (**Figure 13**).

#### *Relation entre la DE et la sévérité de la maladie*

Le lien entre la DE macrovasculaire et la sévérité de la maladie (DAS28, CRP, VS) est controversé. Certaines études trouvent une association <sup>221, 236</sup>, d'autres non <sup>99, 136, 225, 243, 244</sup>. Une étude récente a suivi 58 patients PR nouvellement diagnostiqués pendant une année. Les résultats montrent que la réduction du DAS28 est corrélée à la réduction de la rigidité de l'artère radiale, même si cette dernière ne retrouve pas sa valeur initiale normale <sup>245</sup>. Des résultats semblables sont observés par l'étude de Provan *et al.* <sup>174</sup> où des patients à PR active, et non ceux qui sont en rémission, présentent une vitesse d'onde de pouls et une épaisseur intima-média augmentées. Aussi, la DE microvasculaire semble être plus liée à la sévérité de la maladie qu'à la durée de la maladie même si, encore une fois il existe des données contradictoires. Mesurée par iontophorèse d'acétylcholine chez 128 patients PR sans antécédents CV, la DE de la microcirculation cutanée a été associée à un taux circulant élevé de CRP <sup>246</sup>. De manière intéressante, la même équipe montre que cette fonction endothéliale microvasculaire est améliorée uniquement chez les patients répondeurs aux traitements (etanercept ou adalimumab ou methotrexate) <sup>247</sup>. Dans le même sens, une autre équipe a montré la présence d'une DE microvasculaire chez des patients ayant une PR active (en pleine poussée inflammatoire aigüe, CRP  $\geq$  20mg/ml, VS  $\geq$  30mm/h) et précise une réduction de cette DE après traitement (tous traitements confondus) <sup>238</sup>. A l'inverse Hansel *et al.* <sup>230</sup> trouve que le traitement par MTX associé ou « switché » avec Etanercept n'améliore pas la FBF à l'Acétylcholine, malgré l'obtention d'une faible activité de la maladie.

#### *Le rôle probable du composant auto-immun*

Le rôle du facteur rhumatoïde (FR) et des auto-anticorps ACPA dans la DE a été également évoqué <sup>97, 248-250</sup>. La présence de ces anticorps est liée à la présence d'une DE, mais la possibilité que ces facteurs soient responsables de la DE n'est pas établie. Ceci n'est cependant pas exclu puisque récemment,

dans une étude menée *in vitro*, le FR isolé du sérum de patients PR a été capable d'activer les neutrophiles en culture, augmentant ainsi leur adhérence à l'endothélium et provoquant un processus délétère pour la cellule endothéliale (mobilisation du calcium, production d'anions superoxydes, surexpression de ICAM-1 et IL-8) <sup>251</sup>.

#### *Relation entre la DE et les facteurs traditionnels de risque CV (FDRCV)*

Plusieurs études ont montré la contribution des FDRCV dans la survenue de la DE en cas de PR. Des résultats de corrélation témoignent que les FDRCV ont impact négatif sur la sévérité de l'inflammation et sont prédictifs de la survenue de la DE en cas de PR <sup>88, 241, 252, 253</sup>. En revanche, d'autres équipes <sup>223, 224, 254, 255</sup> montrent des résultats contraires en mettant en évidence des signes d'athérosclérose ou d'anomalies vasculaires chez des patients PR en présence ou non des antécédents ou des comorbidités CV et indépendamment des FDRCV comme l'âge, le sexe, le taux élevé de CRP circulante. Ainsi, même si leur rôle n'est peut-être pas prépondérant, les FDRCV pourraient favoriser l'apparition d'une DE. Le type de FDRCV et le type de DE impliquée (micro ou macro) restent mal cernés.

#### *Relation entre la DE et l'inflammation chronique au cours de la PR*

La reconnaissance du caractère inflammatoire de l'athérosclérose <sup>114</sup>, associé au fait que les cytokines pro-inflammatoires sont capables d'activer l'endothélium vasculaire conduisent logiquement à considérer l'inflammation systémique chronique qui caractérise la PR comme un mécanisme physiopathologique potentiel de la DE associée à cette pathologie <sup>112</sup>. Cependant, cette association est probablement plus complexe qu'il n'y paraît <sup>220</sup>.

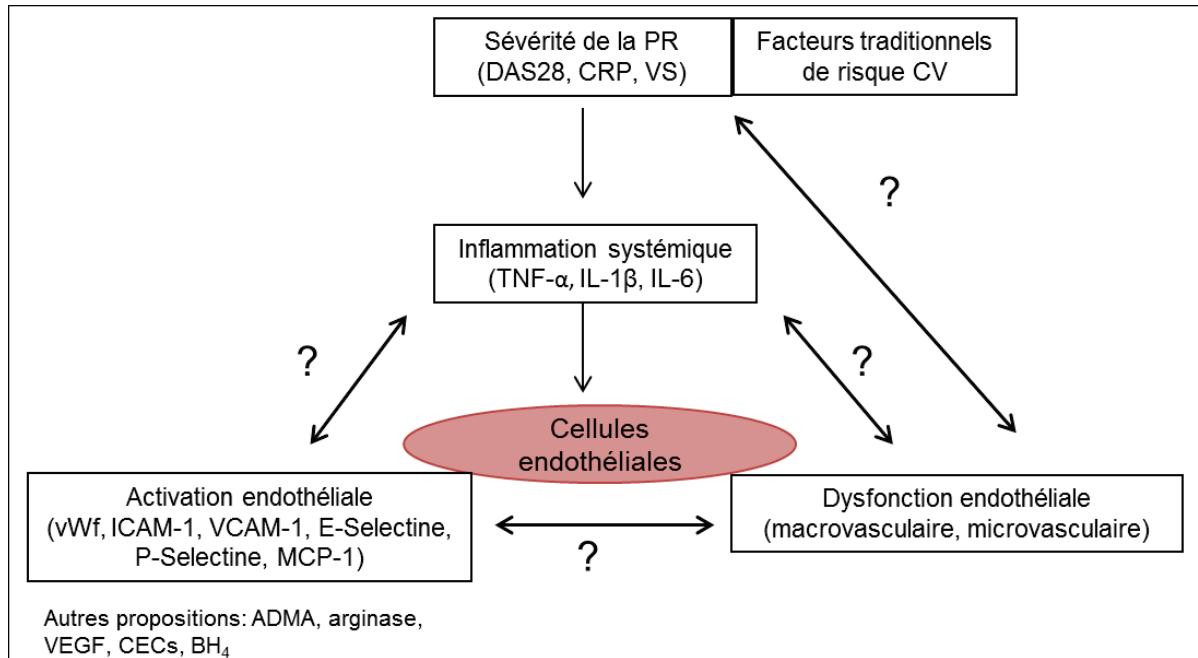
Il est bien établi que les patients PR présentent des taux plasmatiques élevés de marqueurs inflammatoires (CRP, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10) <sup>119, 137, 249, 250, 256</sup>. Le rôle délétère que joue le TNF- $\alpha$  sur la fonction vasculaire, notamment endothéliale a été bien documenté par la revue de Zhang *et al* <sup>257</sup>. De nombreuses données *in vivo* et *in vitro* montrent que comme le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  et l'IL-1 $\beta$  sont capables d'activer les cellules endothéliales et d'induire une perturbation transitoire de la production de NO <sup>258</sup>; ils induisent également une surexpression et une libération de molécules d'adhérence telles que le facteur l'ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 et également E-selectine <sup>259, 260</sup>. Cette réponse de l'endothélium à un stimulus inflammatoire local se traduit par un changement de sa perméabilité aux macromolécules et s'accompagne d'un recrutement de leucocytes sur le site inflammatoire. Les marqueurs d'activation endothéliale précités (vWF, l'ICAM-1, VCAM-1, E-selectines, P-selectine, MCP-1) sont augmentés dans le sang des patients atteints de PR comparés à des sujets sains <sup>99, 137, 224, 228, 245, 250, 261</sup>. Cependant, une étude récente a montré que l'augmentation des marqueurs circulants d'activation endothéliale peut varier en fonction de la sévérité de la maladie. Les patients avec une PR de faible activité (DAS28 compris entre 2,6 et 5,1) ont un taux circulant de VCAM-1 et vWF élevé alors que ceux qui ont un DAS28 supérieur à 5,1 présentent plus d'E-selectine, de MCP-1, d'ostéoprotégérine (OPG) et d'ADMA <sup>256</sup>. Les résultats concernant la corrélation entre les marqueurs

d'inflammation systémique et les marqueurs d'activation endothéliale restent très hétérogènes dans la PR et varient selon le marqueur considéré. Par exemple, parmi 3 cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6), seule l'IL-6 est positivement corrélée avec ICAM-1 et VCAM-1<sup>250</sup>. Une autre étude met en évidence une corrélation positive entre la CRP et l'E-selectine circulante, ce qui n'est pas le cas entre l'IL-6 et l'E-selectine<sup>137</sup>. Il convient de garder à l'esprit que la synovite articulaire caractéristique de la PR s'accompagne d'une activation de l'endothélium au niveau des articulations. Aussi, l'augmentation plasmatique de ces marqueurs ne traduit pas forcément une activation endothéliale des vaisseaux systémiques.

Les études cherchant à corrélérer les marqueurs d'inflammation systémique et la DE ont donné des résultats pour l'instant peu convaincants. Elles se sont principalement intéressées aux marqueurs d'inflammation non spécifiques (CRP et VS). Une corrélation entre le taux plasmatique de CRP et la DE microvasculaire a été montrée dans certaines mais pas dans toutes les études transversales<sup>236, 240, 246</sup>. En dépit d'un effet positif des traitements anti-TNF- $\alpha$  sur la DE macrovasculaire, la baisse de CRP ne corrèle pas avec l'augmentation de FMD<sup>262-264</sup>. La nature épisodique de l'inflammation clinique dans la PR suppose que les taux des marqueurs inflammatoires fluctuent eux aussi au niveau plasmatique. La mesure unique et ponctuelle de ces paramètres pourrait donc constituer un biais. Les recherches se sont alors intéressées à la notion « d'inflammation cumulative » qui tient compte de mesures répétées de taux circulants de CRP sur un temps relativement long. Là encore les résultats sont hétérogènes. Certaines études montrent une association entre CRP-cumulative et la DE macrovasculaire<sup>221</sup> alors que d'autres ne trouvent pas de corrélation ni avec la DE macrovasculaire, ni avec la DE microvasculaire après un dosage de CRP et une mesure de VS tous les 3 mois pendant 6 ans<sup>252</sup>.

Aussi les efforts visant à caractériser la fonction endothéliale des patients par la mesure de marqueurs circulants d'activation endothéliale sont encore non concluants. Par exemple, une étude a montré que seule E-selectine (et non ICAM-1, VCAM-1, P-selectine) corrélait avec la DE microvasculaire cutanée des patients PR, présentant pourtant des vascularites et micro-angiopathies apparentes<sup>237</sup>. Une autre étude conduite chez 74 patients PR et 80 sujets sains révèle que c'est plutôt VCAM-1 qui est corrélée à l'EIM carotidienne<sup>250</sup>. Une autre encore met plus en avant l'importance d'ICAM-1 et E-selectine dans la présence de plaques d'athérome au niveau fémoral<sup>265</sup>. L'équipe de Södergren *et al*<sup>99</sup>, explique ce phénomène par le fait que *l'activation endothéliale* pourrait précéder la DE et le développement de l'athérosclérose, d'où une mauvaise corrélation entre les marqueurs circulants d'activation endothéliale et les paramètres de perturbation fonctionnelle ou morphologique de l'endothélium.

Compte tenu de l'augmentation de leurs taux sanguins chez les patients PR, des marqueurs potentiels de la DE tels que l'arginase circulante<sup>266</sup>, l'ADMA et le BH<sub>4</sub><sup>267-269</sup>, les cellules progénitrices endothéliales circulantes<sup>228, 270-272</sup> ont été proposés pour prédire la DE. Mais aucune donnée valide n'est disponible à ce jour en cas de PR.



**Figure 13.** Les potentiels facteurs impliqués dans l'installation de la DE dans la PR (Figure : P. Totoson, EA 4267, Besançon).

### III.3.4 Effets des traitements de la PR sur la DE<sup>51</sup>

La plupart des études étudiant l'impact des traitements sur la fonction endothéliale utilisent la FMD comme méthode d'évaluation. Tous les traitements de la PR n'ont pas été étudiés, et les résultats sont parfois discordants.

#### *Effets des DMARDs*

A titre d'exemple, une étude menée chez 29 patients PR ne montre pas d'effet positif des DMARDs (type et dose non précisés) sur la DE, malgré une réduction favorable de la CRP et de la VS après 2 et 6 semaines de suivi<sup>239</sup>. Des résultats similaires ont été observés par Murcada *et al.*<sup>273</sup> malgré un effet bénéfique concernant la réduction des cytokines TNF-α et IL-6.

Effets du MTX sur la DE : malgré plusieurs études et méta-analyses témoignant d'un effet bénéfique du MTX dans la réduction des manifestations CV<sup>133, 152-154, 160</sup>, très peu d'études ont évalué son effet sur la fonction endothéliale. Les résultats de l'équipe de Turiel<sup>229</sup> montrent que 18 mois de traitement sous MTX ont permis d'améliorer la fonction microvasculaire coronaire, sans effet sur la fonction macrovasculaire évaluée par l'EIM. Ainsi, l'effet du MTX sur la DE reste à être mieux caractérisé.

### Effets des biothérapies sur la DE :

Les traitements anti-TNF $\alpha$  sont les plus documentés (**Tableau 3**). On ne dispose pas encore assez de données concernant l'effet des autres DMARDs biologiques comme les anti-IL6, anti-CD40, anti-CTLA4 sur la DE.

**Tableau 3.** Effets des biothérapies sur la fonction endothéliale dans la PR.<sup>232</sup>.

Auteurs	Nombre de patients PR	Traitements	Technique d'évaluation	Délai d'évaluation en semaines	Effet
Hurlimann et al., 2002 [44] Hansel et al., 2003 [45]	11 8	IFX ETN vs MTX	FMD FBF	12 Analyse immédiate	+
Irace et al., 2004 [46]	10	IFX	FMD	0, 2 et 6	Effet en post-perfusion mais transitoire
Gonzalez-Juanatey et al., 2004 [47]	7	IFX	FMD	2 jours et 4 semaines	Effet en post-perfusion mais transitoire
Bilsborough et al., 2006 [48]	14	IFX (n= 6) ETN (n= 3) vs DMARD (n= 5)	FMD	36	Amélioration supérieure avec les anti-TNF
Cardillo et al., 2006 [49]	10	IFX	FBF	Analysé immédiatement	+
Maki Petaja et al., 2006 [50]	9	ETN	FMD	4 et 12	+
Bosello et al., 2008 [51]	10	IFX	FMD	2, 6 et 14	Effet en post-perfusion mais transitoire
Ikonomidis et al., 2008 [52]	46	Anakinra vs GC	FMD	4	Amélioration avec anakinra et pas avec GC
Gonzalez-Juanatey et al., 2008 [53]	6	RTX	FMD	2 et 26	+
Sidiropoulos et al., 2009 [54]	12	ADA (n=7) IFX (n=5)	FMD	78	+
Kerekes et al., 2009 [55]	5	RTX	FMD	2, 6 et 16	+
Capria et al., 2010 [56]	28	ETN ADA IFX	FMD	6 et 104	+
Kerekes et al., 2011 [57]	8	ADA	FMD	24	+
Protoplerou et al., 2011 [58]	16	Tocilizumab	FMD	12 et 26	+
Gonzalez-Juanatey et al., 2012 [59]	8	ADA	FMD	12	+
Sandoz et al., 2012 [60]	23	Anti-TNF	FMD	2	-

FMD : Flow-Mediated Dilatation ; FBF : Forearm Blood Flow ; IFX : infliximab ; ADA : adalimumab ; ETN : etanercept ; RTX : rituximab ; TNF : Tumor Necrosis Factor ; MTX : metotrexate ; GC : glucocorticoïdes ; DMARD : Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs

Les résultats concernant l'effet des anti-TNF $\alpha$  sont contradictoires. Une revue de la littérature montre que divers anti-TNF $\alpha$  réduisent significativement la rigidité artérielle des patients PR<sup>274</sup>. Au contraire, une autre méta-analyse menée sur 15 études et incluant au total 302 patients traités par des anti-TNF $\alpha$  (infliximab, adalimumab, et etanercept) ne trouve pas d'amélioration de la FMD<sup>275</sup>. Une autre étude rapporte une amélioration de la fonction endothéliale sous anti-TNF $\alpha$  de manière transitoire puisqu'ils observent une amélioration de la fonction endothéliale après 2 semaines de traitement anti-TNF $\alpha$ , effet qui n'est plus significatif après 3 mois de traitement<sup>276</sup>. De la même manière, *Hsue et al* observe un effet bénéfique de Rituximab sur la FMD, à 12 semaines et non à 24 semaines de traitement<sup>277</sup>. L'équipe de *Galarraga*<sup>247</sup> montre que l'amélioration de la DE microvasculaire cutanée est observée uniquement chez les patients répondant aux traitements. D'autres études montrent que des anti-TNF $\alpha$  (Adalimumab et Infliximab) améliorent la fonction endothéliale mais sans modifier ni l'aspect morphologique (EIM carotidienne) ni l'aspect mécanique (rigidité artérielle) des vaisseaux<sup>222, 262</sup>. Il est également à noter que les marqueurs circulants de la DE tels que l'ADMA et les marqueurs d'activation endothéliale comme ICAM-1 et VCAM-1 ne sont pas systématiquement diminués par ces traitements anti-TNF $\alpha$ <sup>229, 243, 264</sup>. Plusieurs autres études remarquent une différence d'effet des traitements anti-TNF $\alpha$  selon le lit vasculaire considéré. *Sandoo et al.*<sup>136, 276</sup> et *Turiel et al.*<sup>229</sup> rapportent que la DE microvasculaire est plus sensible aux anti-TNF $\alpha$  comparé au lit macrovasculaire, tandis que *Hsue et al.*<sup>277</sup> observe un effet au niveau macrovasculaire et non au niveau microvasculaire.

L'effet vasculaire des DMARDs reste donc à être élucidé, et ce d'autant plus que l'effet respectif de chaque médicament est mal connu, puisque rares sont les études qui évaluent distinctement les effets des DMARDs classiques (MTX) et ceux des DMARDs biologiques, les 2 types de DMARDs étant souvent associés (**Tableau 3**).

#### *Effets des traitements symptomatiques*

Il est bien établi que les glucocorticoïdes et les AINS présentent des effets CV délétères dont l'induction d'une DE<sup>148</sup>. Très peu d'études se sont intéressées à leur impact sur la fonction endothéliale en cas de PR. Certaines de ces études ne montrent ni amélioration ni détérioration de la FMD/rigidité artérielle chez les patients PR, après administration d'AINS et de Coxibs pendant 2 semaines<sup>278, 279</sup>. De manière intéressante, l'utilisation de faible dose de prednisolone ne semble pas influencer la fonction endothéliale<sup>279</sup>. Notons toutefois les résultats de l'étude de *Del Rincón et al*<sup>280</sup>, menée chez 647 patients PR, et montrant le développement de plaque d'athérome suite à une exposition aux glucocorticoïdes qui laisse suspecter un impact délétère sur la fonction endothéliale à long terme. Des études à plus long terme, sur de plus grandes cohortes de patients et étudiant plusieurs doses sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

#### *Effets des traitements à visée cardiométabolique*

Pour réduire la comorbidité CV des patients PR, des traitements hypocholestérolémiant et antihypertenseurs sont associés aux traitements anti-arthritiques, en accord avec les recommandations EULAR. Les études concernant l'effet des statines sur la fonction endothéliale des patients PR vont dans le sens d'un effet positif du traitement. L'amélioration de la fonction endothéliale serait corrélée avec le niveau de l'inflammation systémique et l'amélioration du ratio LDL/HDL<sup>162, 281, 282</sup>. Il convient de remarquer que dans toutes ces études, l'administration de statines était combinée avec les traitements DMARDs. La question qui se pose est de savoir si cet effet bénéfique ne serait pas un effet synergique de l'association des traitements ?

Un effet bénéfique des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC : ramipril *versus* placebo) sur la fonction endothéliale des patients PR a été reporté<sup>283</sup>.

Une autre étude a montré l'effet bénéfique de l'activité physique<sup>284</sup> ou encore de la vitamine D sur la DE<sup>285</sup>. Les quelques études s'intéressant à la pioglitazone (un antidiabétique oral qui n'est plus commercialisé en France) sur la DE des patients PR ne montrent pas d'amélioration de la fonction endothéliale ni macro ni microvasculaire. Seule la rigidité artérielle est réduite par ce traitement<sup>286, 287</sup>.

Ces études interventionnelles présentent plusieurs limites. La première est l'absence de groupe témoin non PR dans de nombreuses études, les faibles effectifs des cohortes, les délais de suivi très hétérogènes. Mais la plus importante limite est que l'effet d'une stratégie thérapeutique donnée est

toujours étudié chez des patients polymédicamentés. L'effet spécifique de chaque médicament serait intéressant à étudier isolément, mais malheureusement ce genre d'étude est éthiquement impossible à mener chez les patients PR eu égard aux recommandations de prise en charge thérapeutique actuelles.

L'ensemble de ces données soulignent la difficulté de tirer des conclusions définitives à partir des études cliniques concernant les mécanismes impliqués dans la DE, les territoires vasculaires affectés et la cinétique des anomalies observées, le lien avec l'inflammation ou l'impact des différents traitements. Aussi, les études sur des modèles animaux de PR s'avèrent nécessaires pour répondre aux nombreuses questions posées.

### **III.4 DE au cours de la PR : données expérimentales**

L'utilisation de modèles animaux permet d'étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués et offrent l'opportunité d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques et de tester des nouvelles stratégies de diagnostic ou de traitement.

#### **III.4.1 Les principaux modèles animaux de PR**<sup>6, 242, 288, 289</sup>

Dans le cas de la PR, les modèles animaux peuvent être de type « induits », génétiquement provoqués ou spontanés. Chacun de ces modèles est caractérisé par des réactions immuno-inflammatoires conduisant à des manifestations cliniques plus ou moins proches de la PR humaine. Ils ont permis une énorme avancée dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie ainsi que dans le développement préclinique des molécules anti-arthritiques. Ces modèles diffèrent entre eux par les critères physiologiques de l'animal utilisé (souche, âge, statut hormonal) et par l'agent arthritogène utilisé (chimique, collagène, adjuvant)<sup>288</sup>. Les modèles murins sont les plus utilisés, même s'il existe quelques études utilisant des animaux non-rongeurs tels que le lapin et les primates<sup>290-295</sup>. Parmi les rongeurs, le rat et la souris sont les plus couramment utilisés. Le cobaye a occasionnellement servi pour explorer les mécanismes de destruction articulaire<sup>296</sup>, mais son utilisation devient de plus en plus rare. Une récente revue de la littérature a conclu que les modèles animaux de polyarthrite les plus prédictifs de l'efficacité des traitements de la PR étaient le modèle d'arthrite à adjuvant chez le rat et le modèle d'arthrite à collagène chez la souris<sup>289</sup>, modèles que nous allons décrire plus en détail dans ce paragraphe, et dont les caractéristiques principales sont résumées dans le **Tableau 4** (voir page 54).

### a) L'arthrite induite à adjuvant (adjuvant-induced arthritis, AIA)

Le modèle AIA a été le premier modèle expérimental de PR développé par Pearson en 1956<sup>297</sup>. Il s'agit d'un modèle « induit », réalisé de préférence chez le rat mâle, à un âge supérieur à 5 semaines. Le rat Lewis représente la souche la plus fréquemment utilisée en raison de sa meilleure réponse à l'agent arthritogène (plus de 90% de taux de développement d'arthrite). Les souches Sprague Dawley et Wistar sont moins sensibles au modèle ; et d'autres souches comme Fisher 334, DRBB (Diabetic Resistant BB) et Brown Norway (BN) ont été abandonnées à cause de leurs réponses trop faibles.

❖ Immunisation : le modèle AIA consiste en une unique injection par voie intradermique à la base de la queue de *Mycobacterium tuberculosis* ou *butyricum* inactivé, en suspension dans l'adjuvant incomplet de Freund. Cette suspension est appelée communément adjuvant complet de Freund (CFA). Une autre modalité consiste à injecter la suspension dans la face plantaire d'une patte qui induira des lésions sur cette patte injectée mais aussi, de manière un peu retardée, des lésions sur la patte controlatérale<sup>298, 299</sup>.

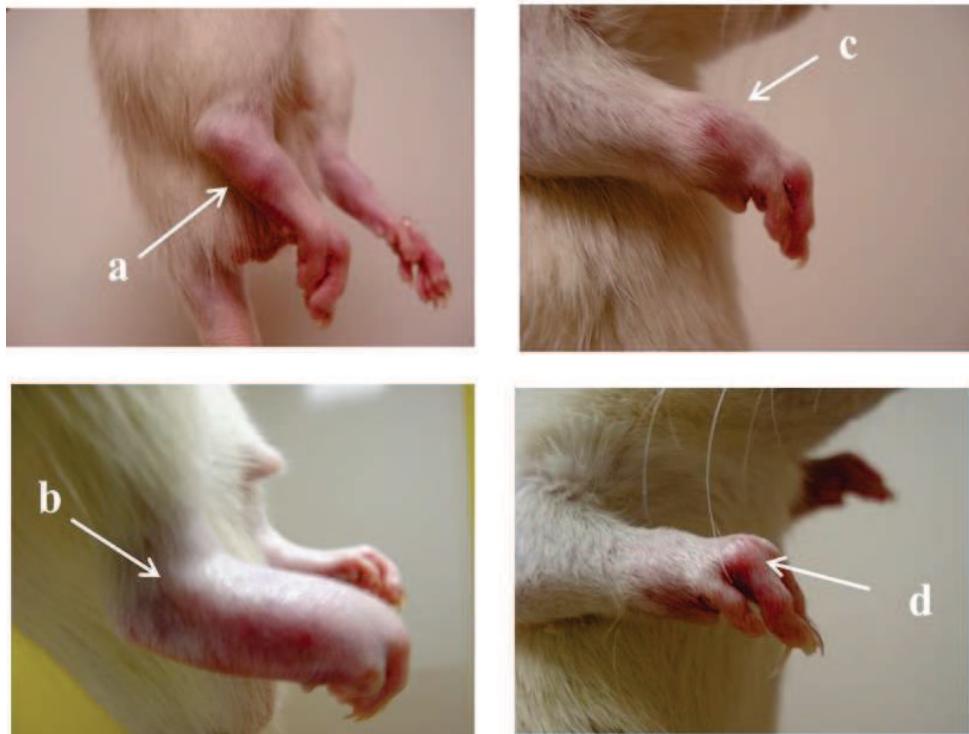
❖ Réactions immuno-inflammatoires :

Les peptidoglycans arthritogènes du bacille inactivé absorbés au niveau du site de l'injection sont drainés par les vaisseaux et les nœuds lymphatiques jusqu'au site synovial. Suite à l'accumulation de ces peptidoglycans, le développement de l'arthrite est initié par l'activation des lymphocytes T et l'inhibition de la synthèse des protéoglycans au sein du cartilage qui, par le biais d'enzymes protéolytiques et/ou de radicaux libres, aboutissent à une rupture progressive du collagène, à l'endommagement de la matrice et à la dégradation de l'os<sup>6, 289</sup>. L'activation des lymphocytes T induit également un recrutement local et massif des neutrophiles, une prolifération des synoviocytes associée à une activation des cellules endothéliales aboutissant à une formation de pannus. La production locale de cytokines IL-17, IFN-γ, TNF-α, IL-1, et IL-6 est impliquée dans la pathogénie du modèle AIA<sup>300</sup>. En revanche, Les lymphocytes B et l'immunité humorale ne semblent pas jouer de rôle dans ce modèle<sup>289</sup>.

❖ Evolution du modèle :

Les signes cliniques d'arthrite apparaissent généralement 10 à 14 jours après l'injection unique de *Mycobacterium* et débutent par une perte de poids et une apparition de rougeurs et gonflements au niveau des doigts et des chevilles des pattes<sup>301</sup>. L'inflammation progresse jusqu'à un maximum entre J20 et J30 post-induction. Le rat présente alors une polyarthrite affectant particulièrement les chevilles, poignets et les petites articulations inter-phalangiennes distales (**Figure 14**). Au-delà de cette phase aiguë, les signes inflammatoires régressent et seules persistent des déformations articulaires. Une des particularités du modèle est la présence de manifestations extra-articulaires ophtalmiques, cutanées, digestives et génito-urinaires. La plupart des animaux développent aussi des nodules au niveau de la queue. Des méthodes d'évaluation de l'inflammation clinique ont été

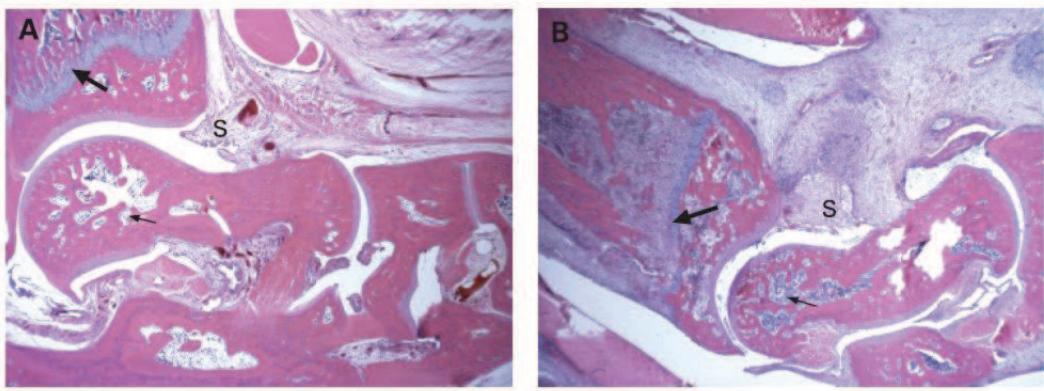
développées, qui consistent en l'établissement d'un «score arthritique» tenant compte des érythèmes et œdèmes. La mesure des diamètres des pattes à l'aide d'un pied à coulisse peut également être utilisée à la place ou en complément de l'évaluation de la clinique.



**Figure 14.** Photographies représentant différentes atteintes et évolutions cliniques de l'arthrite induite à l'adjuvant. (a) : atteinte modérée de la cheville, (b) : atteinte intense du bloc tarso-cheville, (c) : inflammation du poignet, (d) : atteintes isolées des doigts. Photos : P. Totoson, EA 4267, Besançon.

Sur le plan histologique, le modèle AIA est caractérisé par un infiltrat inflammatoire synovial (majoritairement neutrophile) qui devient ensuite périarticulaire et péritendineux (**Figure 15**), un œdème des tissus mous essentiellement au niveau de la cheville et du poignet, un dépôt articulaire de fibrine, des foyers de nécrose accompagnée de prolifération de synoviocytes, de fibroblastes, ainsi qu'une activation des ostéoclastes et ostéoblastes.

Sur le plan radiologique, on note une résorption osseuse marquée, une prolifération périostée, une formation de pannus avec destruction cartilagineuse, osseuse et finalement une ankylose articulaire (**Figure 16**) surtout dans les stades tardifs du modèle.



**Figure 15.** Histologie des articulations de la cheville 14 jours post-immunisation (coloration hématoxyline-eosine-safran). (A) rats témoins : tissu synovial normal (S), plaque de croissance normale de l'os tibia (grande flèche), tarse normal (petite flèche). (B) rats Lewis AIA : synovite sévère et inflammation périarticulaire (S), résorption osseuse marquée au niveau du tibia distal (grande flèche), début de résorption osseuse au niveau du tarse (petite flèche)<sup>289</sup>.



**Figure 16.** Radiographie aux rayons X des pattes de rats à 33 jours post-immunisation. (A) rats témoins, (B) rats Lewis AIA : gonflement de tissu mou, ostéoporose (déminéralisation, diminution de la densité osseuse), érosion osseuse, destruction du cartilage (pincement des espaces articulaires) et néoformation et prolifération périostale. Images : P. Totoson, EA 4267, CHRU, Besançon.

❖ Avantages et inconvénients : le modèle AIA a l'avantage de permettre un développement rapide d'une inflammation polyarticulaire sévère, avec un rendement supérieur à 90% des animaux induits, facile à évaluer à l'aide de scores cliniques adaptés. Ce modèle partage plusieurs caractéristiques avec la PR humaine, y compris les œdèmes des extrémités, la dégradation du cartilage, la perte de la fonction articulaire et l'infiltration des lymphocytes dans les articulations. Toutefois, le modèle est dénué de FR et la résorption osseuse obtenue est plus importante comparée à celle observée

chez l'homme. Le modèle AIA est considéré comme un modèle se limitant à une seule poussée inflammatoire, contrairement à la PR. Cependant, des travaux récents de notre laboratoire ont montré qu'il pouvait exister des poussées si l'on suivait les rats sur plusieurs mois<sup>302</sup>.

**b) Arthrite à collagène (collagen-induced arthritis, CIA)**<sup>6, 289, 303</sup>

Le modèle CIA peut être réalisé chez la souris (DBA/1, B10.RIII et C57BL6), chez le rat (Wistar, Sprague-Dawley, Lewis, Dark Agouti : DA) ou encore chez la brebis.

❖ Immunisation : la CIA est induite par une injection intradermique à la base de la queue de collagène de type II hétérologue (non murin, exemple : collagène bovin ou collagène de poulet) ou homologue (moins fréquent), en suspension dans l'adjuvant incomplet de Freund. L'injection à la base du dos est également possible. Certaines variantes du protocole utilisent de l'adjuvant *complet* de Freund (c'est-à-dire de l'adjuvant incomplet enrichi avec des protéoglycanes de *Mycobacterium*). Dans certains cas, une deuxième injection est réalisée 2 à 3 semaines après la première, pour « booster » la réponse immunitaire et obtenir rapidement une polyarthrite sévère<sup>303</sup>.

❖ Réactions immuno-inflammatoires : le modèle CIA résulte d'un dépôt de complexes immuns sur les surfaces articulaires. La membrane synoviale normalement hypocellulaire devient infiltrée par des cellules immunitaires (lymphocytes T et B, macrophages, neutrophiles). Ceci conduit à la formation de pannus, à une hyperplasie synoviale, à une destruction du cartilage et à une résorption osseuse. Ainsi, la réponse immunitaire dans ce modèle CIA implique les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes B qui produiront des anticorps dirigées contre le collagène de type II. Plusieurs cytokines pro et anti-inflammatoires sont également exprimées au niveau du tissu synovial, notamment le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL6<sup>304</sup>. L'immunité humorale et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II sont particulièrement impliqués dans le modèle CIA chez la souris<sup>305</sup>.

❖ Evolution du modèle :

Sur le plan clinique, le modèle CIA entraîne une polyarthrite avec apparition d'œdèmes et d'érythèmes des pattes. Chez la souris, les premiers signes d'arthrite apparaissent vers 21 jours après induction et restent visibles jusqu'au 50-60<sup>ème</sup> jour après induction. Les signes extra-articulaires de la CIA sont peu fréquents et prédominent essentiellement sur la sphère ORL (polychondrite, dysfonction vestibulaire). Sur le plan histologique et radiologique, comme chez l'AIA, on retrouve une synovite, une formation de pannus, une destruction du cartilage et érosion osseuse.

❖ Avantages et inconvénients : l'arthrite à collagène partage plusieurs caractéristiques avec la PR humaine, notamment concernant la présence d'auto-anticorps et une réaction d'hypersensibilité retardée. Le rendement après immunisation est proche des 90%. Par contre, le temps de

développement de l'arthrite est relativement long et variable dans ce modèle, d'où la nécessité fréquente d'une 2<sup>ème</sup> immunisation pour « booster » la réponse immuno-inflammatoire. Comme dans l'AIA, l'arthrite de la CIA est aussi spontanément résolutive, avec une seule phase d'inflammation aigüe.

**Tableau 4.** Comparaison des caractéristiques des modèles expérimentaux d'arthrite AIA (rat), CIA (souris) et la PR chez l'Homme (d'après <sup>6</sup>, après modification)

	caractéristiques	AIA	en CIA	PR
• Induction	espèce	rat	souris	Homme
	Agent arthritogène	Mycobacterium	Collagène de type II	
	adjuvant	IFA	IFA	
	voie d'induction	intradermique	intradermique	
	mode d'induction	unique	1 ou 2 immunisations	
• Signes cliniques	délai d'apparition	10-14 jours	21 jours	
	durée de la phase inflammatoire aigue	1 mois	1 à 2 mois	
	rythme	rémission spontanée	rémission spontanée	poussées évolutives
	polyarthrite périphérique	+	+	+
	érosion articulaire	+	+	+
	formation de pannus	+	+	+
	ankylose rachidienne	+	-	+/-
	réaction périostée	+	-	-
	atteinte extra-articulaire	+++	+	++
• Pathogénie	lymphocytes T	+	+	+
	lymphocytes B	-	+	+
	complexe histo-compatibilité	-	+	+
	complément	-	+	+
	cytokines	++	++	++
	auto-anticorps	-	anti-collagène	FR, ACPA

IFA : Incomplet Freund Adjuvant

❖ *Remarque 1 :* malgré une méthode d'induction identique, les signes cliniques du modèle CIA chez le rat sont différents de ceux de la souris. Chez le rat, ces signes apparaissent plus rapidement entre 10 et 16 jours après la première injection ; le maximum inflammatoire survient vers le 20<sup>ème</sup> jour environ, puis ensuite les signes décroissent progressivement. Dans ce modèle CIA rat, on retrouve une plus grande sensibilité des femelles par rapport aux mâles.

*Remarque 2 : le modèle CIA chez la brebis est également différent des 2 premiers. L'induction se fait chez la brebis âgée de 2 ans, par une première injection en sous-cutanée de suspension de collagène bovin de type II émulsifiée dans de l'adjuvant complet, suivie d'une 2<sup>ème</sup> injection de sensibilisation à J14 et d'une 3<sup>ème</sup> injection d'immunisation directement au niveau du jarret à J28<sup>306</sup>. La phase inflammatoire aigüe s'étale de J28 à J42. L'arthrite est également spontanément résolutive dans ce modèle.*

**c) Les autres modèles murins induits<sup>307</sup>**

- ❖ Modèles par administration d'autres huiles et hydrocarbures non-immunogéniques : « oil-induced arthritis » (OIA) est l'exemple typique, il consiste en une injection intradermique de l'adjuvant incomplet de Freund dans la cheville de rat Dark Agouti (DA), qui induit une arthrite périphérique discrète chez le rat DA. Ce type de modèle peut également être réalisé par injection de pristane, de squalène et d'avridine<sup>308</sup>.
- ❖ Streptococcal cell wall arthritis (SCW): il est réalisé chez des souches sensibles (rat Lewis, lapin) par une seule injection soit locale (intra-articulaire) soit systémique (intrapéritonéale) d'une suspension de fragments de parois cellulaires (peptidoglycane-polysaccharide) de streptocoques du groupe A ou d'autres bactéries comme *Lactobacillus* ou *Mycoplasma*. Une réaction inflammatoire aigüe se met en place dans les 24h, suivie d'une activation de complément et des cellules T. La recrudescence de l'arthrite se manifeste deux à trois semaines après l'immunisation et persiste pendant plusieurs mois<sup>309</sup>.
- ❖ Modèle par administration de protéines exogènes : on cite l'exemple du cartilage oligoméric matrix protein induced arthritis (COMP) administrés chez le rat DA ou Lewis par voie intradermique à la base de la queue. Il existe également d'autres arthritogènes synthétiques telle que l'horseradish peroxidase, l'ovalbumine, le sulfate de chondroïtine appauvri.
- ❖ Modèles induits par anticorps, auto-antigènes, ou cytokines : il s'agit d'une administration locale ou systémique d'anticorps monoclonaux (souvent un cocktail de plusieurs anticorps) dirigés contre le collagène de type II ou d'autres auto-antigènes qui sont fortement exprimés dans les articulations. Cela induit des lésions articulaires aiguës. Il est également possible d'induire une synovite aigüe par injection de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$ ) directement dans l'articulation tibia-tarsienne. Cette méthode permet surtout d'étudier le rôle de la cytokine en question dans la pathogénie de l'arthrite. Dans le même principe que le modèle CIA, l'administration d'auto-antigène telle que la « glucose-6-phosphatase isomérase » : une enzyme ubiquitaire de glycolyse, induit une arthrite auto-immune.

#### d) Les modèles génétiquement provoqués<sup>310, 311</sup>

Il s'agit des modèles transgéniques qui développent spontanément une arthrite :

- **modulant les cytokines** : des souris surexprimant TNF- $\alpha$  ou surexprimant IL-1 ou encore une souris déficiente en récepteur antagoniste de l'IL-1 $\beta$  (IL-1ra  $^{--}$ ) développent spontanément une polyarthrite. Plus récemment, une souris déficiente en tristetraproline (TTP $^{--}$ ) développe également une inflammation chronique ressemblant à la PR. La tristetraproline est en effet une protéine de liaison régulant le processus pro-inflammatoire par la déstabilisation d'ARNm codant TNF- $\alpha$  et MIP-1. Ces souris permettent d'évaluer le rôle potentiel de certaines cytokines dans la pathogénie de la PR.

- **modulant d'autres protéines** : les souris transgéniques surexprimant la protéine virale oncogène HTLV-1 (Human T-cell leukemia virus type-1) développent aussi une arthrite chronique. D'autres modèles SKG et KRN obtenus par mutation respective du gène codant pour la protéine ZAP-70 et le récepteur des cellules T reconnaissant la G6PI, modulent la fonction des lymphocytes T et provoquent une arthrite chez la souris.

#### II.4.2 Les méthodes d'études de la fonction endothéliale chez l'animal

Contrairement aux techniques utilisées chez l'Homme qui privilégient des moyens non-invasifs *in vivo*, les méthodes d'étude de la fonction endothéliale utilisées chez l'animal sont invasives, réalisées *ex vivo* à partir de vaisseaux isolés, prélevés sur un animal anesthésié. L'intérêt des études sur vaisseaux isolés est de simplifier le modèle expérimental et de limiter les nombreux facteurs présents *in vivo* susceptibles de compliquer l'interprétation des résultats (interactions complexes entre les cellules endothéliales / vasculaires et des facteurs hormonaux, nerveux ou des interactions cellules-cellules). Le vaisseau isolé est découpé en segments cylindriques disposés dans une chambre à organes isolés mimant au mieux les conditions physiologiques (solution physiologique oxygénée (O<sub>2</sub> 95% / CO<sub>2</sub> 5%), à pH 7,4 et à température constante maintenue à 37°C). Le liquide physiologique de Krebs dans lequel baigne le vaisseau contient les ions et solutés nécessaires au fonctionnement cellulaire tels que Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et glucose. Ces techniques peuvent s'appliquer aux artères de conductance, de résistance et aux veines. Elles permettent l'étude directe de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, en réponse, comme chez l'Homme :

- à des agonistes de récepteurs endothéliaux (Ach, adénosine, ADP, histamine, substance P, bradykinine)
- à un stimulus physique activateur de l'endothélium : les forces de cisaillement (shear stress) qui induisent une vasodilatation « flux-dépendante ».

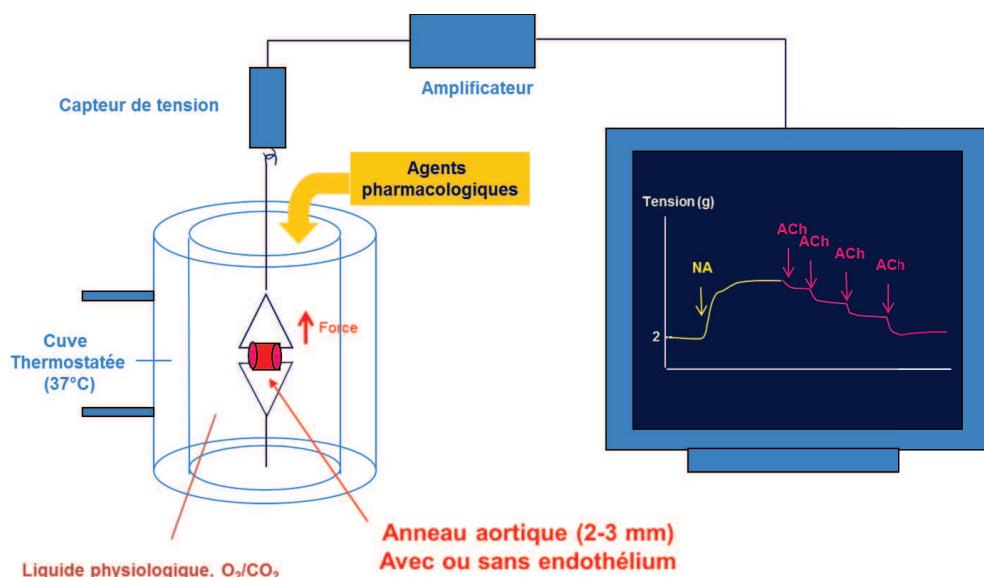
La relaxation vasculaire peut être évaluée soit

- en conditions isométriques : elle consiste en la mesure des variations de tension d'un vaisseau dont le diamètre est imposé et constant.
- en conditions isobariques : elle consiste en la mesure des variations de diamètre d'un vaisseau pressurisé à pression constante.

### a) Technique de vaisseaux isolés en conditions isométriques<sup>312</sup>

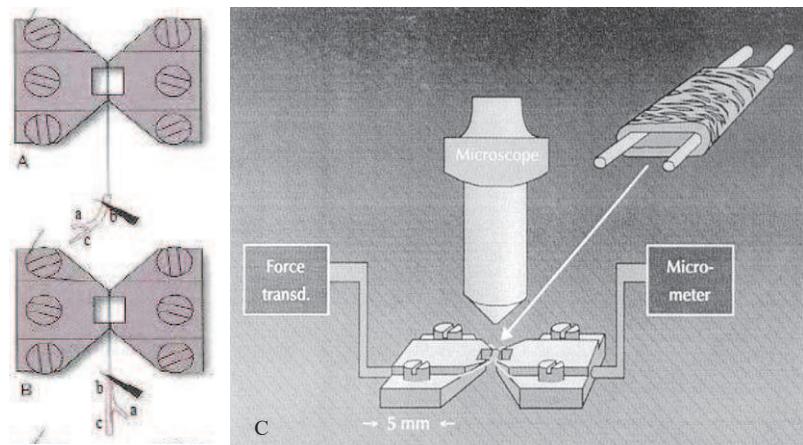
#### *Montage*

Il s'agit d'une technique de **réactivité vasculaire à des agents pharmacologiques**. La technique d'**anneaux vasculaires isolés** constitue la méthode standard d'exploration de la fonction endothéliale chez l'animal. Elle peut être réalisée sur des vaisseaux de rats, de souris. Elle est réalisée sur des segments d'artères de conductance (aorte thoracique le plus souvent ou carotide) ou de veines montées entre deux crochets d'acier inoxydable reliées à un capteur de tension. Le dispositif quantifie la variation de tension de l'anneau vasculaire en réponse à des agents pharmacologiques vasoactifs, qu'ils soient constricteurs ou dilatateurs (**Figure 17**). Les diamètres des crochets doivent être adaptés à la taille des vaisseaux pour éviter d'endommager la couche fragile d'endothélium au moment de l'insertion des crochets.

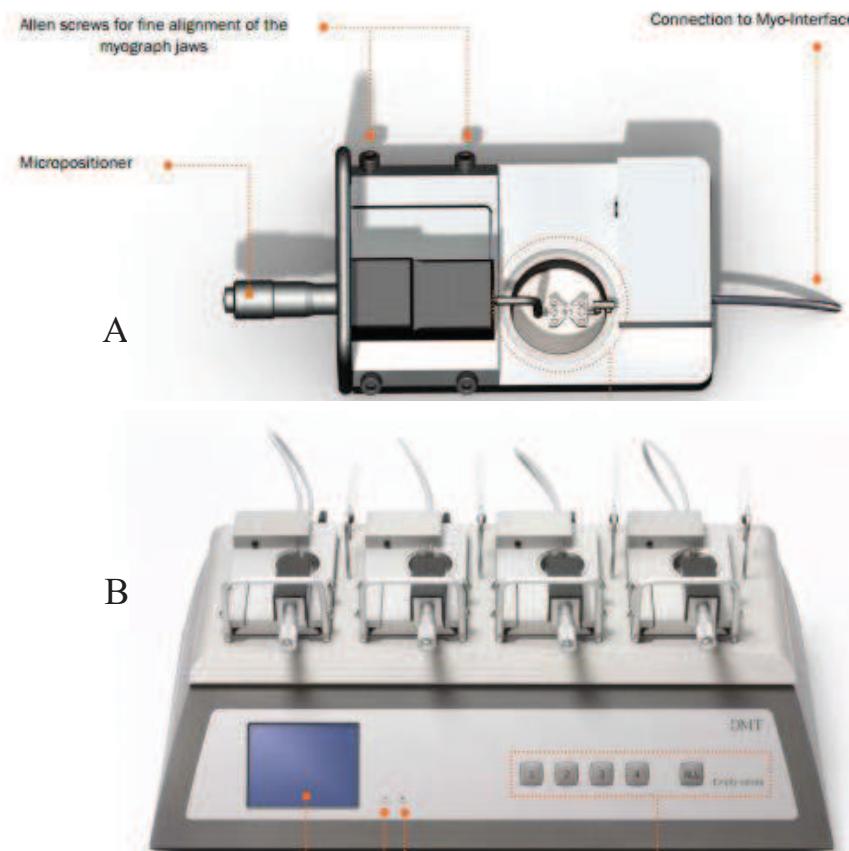


**Figure 17.** Montage technique de la réactivité vasculaire sur anneau aortique isolé. La force transmurale de l'anneau vasculaire est enregistrée par un capteur de tension. On étudie ici la relaxation d'une dose croissante et cumulative d'acétylcholine (Ach), après une pré-contraction à la noradrénaline (NA). (Figure : EA 4267, Besançon).

Un dispositif développé par Mulvany et Halpern<sup>313</sup> utilise des fils fins de tungstène (diamètre inférieur à 40 µm) et permet d'étudier la réactivité vasculaire de segments d'artères de résistance ou de veinules de petite taille (diamètres 100-300 µm) (**Figure 18 et 19**).



**Figure 18.** Les composants du myographe de Mulvany. **A et B :** le segment d'artère de 2 mm environ est monté entre deux fils de tungstène. **C :** double jeu de mâchoires en acier inoxydable, un micromètre permettant d'imposer une tension intra-luminale sur le segment vasculaire, un transducteur et capteur de tension<sup>314</sup>.



**Figure 19.** Photos du système de Mulvany selon la marque Danish Myo Technology ®, **A** : Unité de myographe, **B** : interface de l'appareil.

Quel que soit le dispositif utilisé, une fois le vaisseau prélevé, nettoyé, monté sur l'appareillage, l'étude de la réactivité vasculaire doit suivre plusieurs étapes décrites ci-dessous<sup>312</sup>.

#### *Phase d'équilibration*

Au début de l'expérimentation, une phase d'équilibration ou de normalisation est nécessaire, pendant laquelle les segments vasculaires sont tendus progressivement. Cette tension imposée constitue une sorte de pré-stimulation et de préparation des différentes fibres d'actine et de myosine à répondre aux stimuli pharmacologiques. Il est en effet démontré que les contractions et relaxations vasculaires sont plus fortes, plus stables et plus reproductibles sur un anneau préalablement étiré comparé à un anneau non étiré. La durée de cette phase d'équilibration et la procédure de l'étirement ainsi que la valeur de la tension de base varient selon les protocoles. A titre d'exemple, les anneaux aortiques nécessitent 30 à 90 minutes d'équilibration avec application d'une force passive de 0.5, 1 ou 2g (dans nos conditions expérimentales<sup>315</sup>) par étirements successifs ou étirement unique.

#### *Tests de viabilité cellulaire et d'intégrité de l'endothélium*

Cette étape consiste à vérifier la viabilité des segments vasculaires en induisant une contraction soit par des agonistes de récepteurs du muscle lisse vasculaire (Noradrénaline, Phénylephrine, angiotensine II, sérotonine par exemple), soit le plus souvent par une solution riche en potassium (KCl 100 ou 120 mM). Dans une deuxième étape, dans la mesure où le prélèvement du vaisseau puis son montage sur le système peuvent léser l'endothélium, il est nécessaire de s'assurer de l'intégrité de l'endothélium. La méthode la plus utilisée consiste à évaluer la capacité de relaxation d'un vaisseau, précontracté par une concentration submaximale d'un agent vasoconstricteur (noradrénaline ou phénylephrine par exemple), à un agent relaxant endothélium-dépendant (Ach le plus souvent). Les seuils de relaxation minimale à obtenir dépendent du vaisseau considéré : à titre d'exemple le seuil d'acceptabilité est de 80% de relaxation pour les anneaux d'aorte de rat<sup>315</sup>.

#### *Etude de la fonction endothéliale proprement dite*

La fonction endothéliale est étudiée en mesurant la réponse vasodilatatrice d'un segment vasculaire préalablement contracté à des concentrations croissantes et cumulatives d'un agent relaxant endothélium-dépendant, permettant de tracer des courbes « effet-concentrations ». La présence d'une dysfonction endothéliale (DE) correspond à une réduction de cette relaxation comparativement à un vaisseau « témoin sain ».

#### *Avantages et inconvénients*

L'étude de la réactivité vasculaire en conditions isométriques est une technique d'exploration reproductible, et facile à mettre en œuvre. Le système est généralement doté de plusieurs cuves (chambres d'organes), permettant d'étudier en parallèle la réactivité de segments vasculaires issus du même animal. Il est donc possible d'étudier les mécanismes impliqués dans la DE sur un même

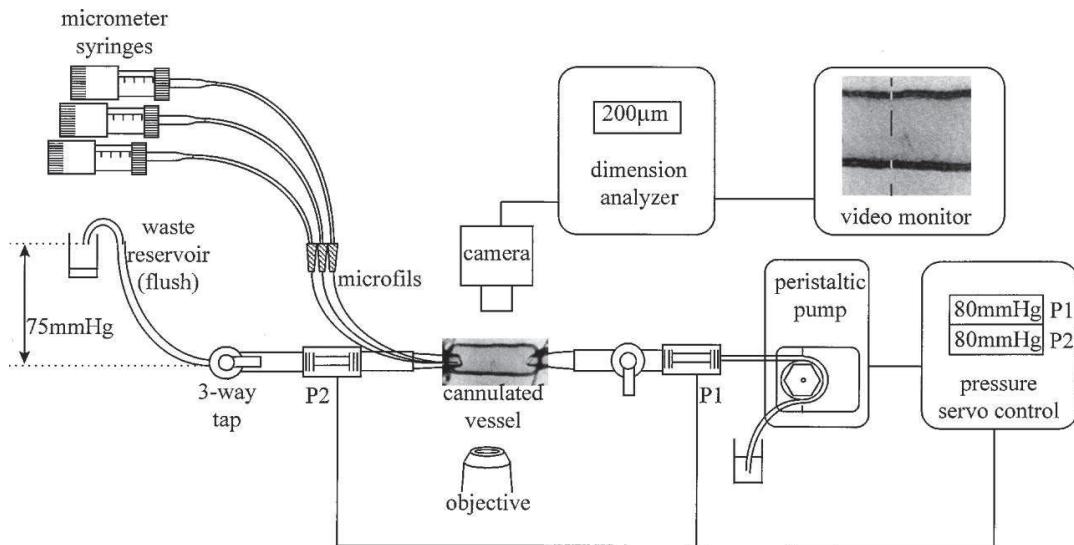
vaisseau. Il est également possible de réaliser dans une même expérience une comparaison « animal pathologique » *versus* « animal sain ». Il est possible de dénuder les segments vasculaires afin d'enlever l'endothélium et d'étudier la relaxation/contraction endothélium-indépendante. Les points critiques de la technique résident dans le choix de la tension basale qui peut influencer la réactivité, et dans la valeur de contraction qui précède l'ajout de l'agent relaxant endothélium-dépendant. En effet, il est possible que la condition pathologique étudiée s'accompagne d'une réponse modifiée à l'agent vasoconstricteur. Dans ce cas, il faudra déterminer la concentration en agent constricteur à utiliser dans la condition pathologique pour que la contraction obtenue soit identique à celle des vaisseaux issus de l'animal non pathologique.

### b) Technique de vaisseaux isolés en conditions isobariques

Il s'agit d'une approche un peu plus sophistiquée permettant de prendre en compte les stress physiques auxquels est soumis un vaisseau en conditions physiologiques, en termes de pression et de forces de cisaillement (Halpern *et al*, 1984). Elle est réalisée sur un artériographe particulier l'*« artériographe de Halpern »*, et permet l'étude des vaisseaux ayant un diamètre compris entre 100 et 500 µm, notamment les vaisseaux de résistance (**Figure 20**). Les deux grandes différences de cette technique par rapport à la myographie isométrique est que d'une part, l'application d'une pression intra-vasculaire permet le développement d'un tonus myogénique par le vaisseau, et que d'autre part, la technique permet l'étude de la morphologie et des propriétés mécaniques du vaisseau en plus de sa fonction endothéliale.<sup>316</sup>

#### *Montage*

Le segment d'artère ( $\approx$  2mm de long) est isolé et fixé entre deux canules en verre par des fils de sutures permettant l'étanchéité du système. Le diamètre externe des canules doit être légèrement inférieur au diamètre interne du vaisseau. Les canules sont reliées à une pompe de perfusion qui elle-même est rattachée à un réservoir de liquide physiologique. Le vaisseau canulé lui-même baigne dans un autre circuit externe de liquide physiologique oxygéné et maintenu à 37°C. Une caméra, reliée à un microscope et à un moniteur sert à mesurer le diamètre vasculaire. (**Figure 20**). Le dispositif permet de pressuriser le vaisseau à la pression souhaitée (la plus proche possible des conditions physiologiques), et permet d'appliquer un flux intravasculaire pour mimer le « shear stress ». Il est également possible d'étudier la réactivité à des agents pharmacologiques, appliqués soit par voie intra-luminale, soit par voie extra-luminale.



**Figure 20.** Schéma de l'artériographe de Halpern<sup>317</sup>.

*Phase d'équilibration* : après montage, le vaisseau est pressurisé à une valeur proche de la valeur physiologique. Cette phase d'équilibration est nécessaire au développement du tonus myogénique spontané. A titre d'exemple, l'équilibration d'une artère mésentérique de 3<sup>ème</sup> ordre d'un rat nécessite l'application d'une pression transmurale de 40 à 100 mmHg, pendant 1 heure<sup>318, 319</sup>.

*Test de viabilité et d'intégrité* : dès la pressurisation du vaisseau, un premier indice de viabilité est le développement d'un tonus myogénique. Il faut ensuite réaliser les mêmes tests que ceux utilisés pour les myographies isométriques : application de KCl, contraction puis relaxation à un agent pharmacologique endothélium-dépendant. La dénudation de l'endothélium est possible en faisant passer soit une bulle soit un détergent dans le vaisseau (par exemple le détergent non-dénaturant CHAPS: 3-[3-Cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propanesulfonate). Les seuils d'acceptabilité de ces tests sont décrits dans la littérature ou à déterminer lors des expériences préliminaires.

#### *Evaluation de la fonction endothéliale:*

Elle peut s'effectuer sur un vaisseau préalablement ou non contracté, puis relaxé soit :

- ❖ par le flux : le flux est augmenté graduellement, et la variation de diamètre est enregistrée. Il a été démontré que la réponse vasculaire est optimale quand la pression transmurale appliquée est proche de la pression artérielle physiologique<sup>320</sup>.
- ❖ par des agents vasodilatateurs rajoutés dans le liquide physiologique.

#### *Avantages et inconvénients*

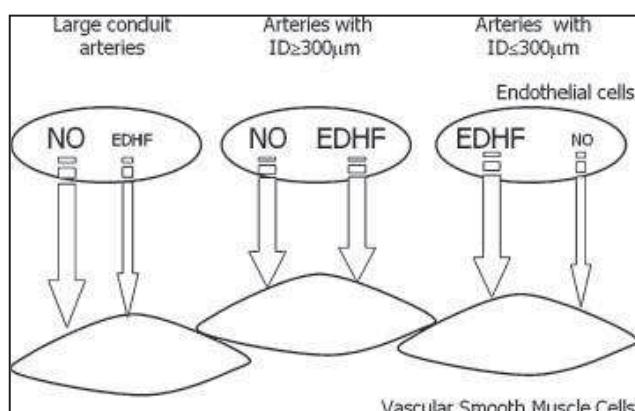
La méthode de vaisseaux canulés pressurisés est considérée comme celle mimant le mieux les conditions physiologiques. Contrairement à la myographie isométrique, dans cette méthode, le diamètre vasculaire est variable, le vaisseau est cylindrique, une pression transmurale existe, l'axe

longitudinal du vaisseau est conservé. Le système d'Halpern permet l'étude du tonus myogénique (contraction en réponse à une augmentation de pression), l'étude des paramètres morphologiques (surface transversale, ratio lumière/paroi) et des paramètres mécaniques (élasticité, courbe de contrainte-déformation). L'inconvénient est qu'on ne peut réaliser une expérience que sur un seul vaisseau à la fois ce qui nécessite un temps très long pour l'étude de mécanismes physiopathologiques ou en cas de lots d'animaux importants. De plus, l'apprentissage de la méthode, qui nécessite une grande dextérité, est plus long que celui des techniques isométriques.

### c) Complémentarité entre le choix des techniques et le type de vaisseaux à étudier

Il est connu que la vasodilatation endothélium-dépendante est gouvernée par différents facteurs vasorelaxants selon le lit vasculaire. Alors que les artères de conductance ont une relaxation endothéliale fortement dépendante du NO<sup>321, 322</sup>, avec une plus modeste contribution de PGI<sub>2</sub> et d'EDHF, la contribution de NO et d'EDHF s'inversent avec la diminution du diamètre des artères (**Figure 21**). Ainsi, la vasodilatation endothélium-dépendante au niveau des artères de résistance est majoritairement assurée par l'EDHF<sup>317, 323</sup> sous l'influence du shear stress.

En conclusion, selon qu'on veut explorer le rôle de NO ou d'EDHF, on peut choisir de travailler respectivement sur un macrovaisseau (aorte, carotide) ou un microvaisseau (artères mésentériques de 3<sup>ème</sup> ordre, artère cérébrale moyenne). L'étude de la réactivité à l'Ach est adaptée à un protocole d'expérimentation incluant beaucoup d'animaux et/ou de nombreux mécanismes physiopathologiques à étudier. La technique de Halpern est plus difficile à utiliser en cas d'exploration des multiples mécanismes.



**Figure 21.** Schéma représentatif de la proportion NO/EDHF selon les lits vasculaires<sup>323</sup>.

### c) Autres techniques

#### *Forearm perfusion et FMD chez le rat*

Des méthodes d'exploration *in vivo* de la fonction endothéliale ont été mises en place chez un animal anesthésié à l'isoflurane<sup>324</sup>. Dans le même principe que chez l'Homme, il est possible de mesurer le

diamètre vasculaire et le flux sanguin par ultrasonographie couplé à un laser-doppler adapté aux petits vaisseaux de l'animal. La vasodilatation au niveau de l'artère fémorale est mesurée en réponse à des injections de substances vasoactives (Ach, adénosine, nitroglycérine) administrées soit par l'artère iliaque commune soit par la veine caudale. Il est également possible d'apprécier la fonction endothéliale par la réponse hyperémique post-occlusive, après une occlusion rapide de l'artère iliaque commune. Cette nouvelle méthodologie présente l'avantage de ressembler à celle utilisée chez l'homme. Elle étudie la fonction endothéliale dans son environnement d'origine, sans prélèvement préalable. Les résultats expérimentaux pourraient donc être mieux transposables à l'humain. De plus, malgré les quelques manipulations délicates comme la pose de cathéter et l'utilisation d'anesthésiques, cette méthode peut être réalisée plusieurs fois sur le même animal, donc pourrait être intéressante lorsque qu'on veut suivre l'évolution de la fonction endothéliale dans le temps, chose impossible avec les vaisseaux isolés ou canulés. Cependant, pour l'instant, cette technique n'a été réalisée que chez le rat, et non chez la souris. L'anesthésie peut aussi interférer avec les paramètres hémodynamiques, donc son utilisation est à prendre en compte dans l'interprétation des résultats. De plus, cette technique, comme chez l'Homme, rend difficile l'étude des mécanismes physiopathologiques.

#### *Technique du lit mésentérique isolé et perfusé, in vivo*

L'étude est menée sur tout le lit mésentérique ligaturé, isolé et perfusé par voie rétrograde à l'aide d'une pompe péristaltique<sup>325, 326</sup>. Un capteur de pression est relié au lit mésentérique grâce à une canule connectée à la veine portale. La réactivité vasculaire est mesurée en réponse à une perfusion de molécules vasoactives. Cette technique est de moins en moins utilisée.

### **III.4.3 DE dans les modèles animaux de la PR : état de l'art des mécanismes étudiés**

Plusieurs études se sont intéressées à la fonction endothéliale sur les modèles animaux de PR. Afin d'avoir une vision exhaustive des données existantes, nous avons réalisé une revue systématique de la littérature pour répertorier les données disponibles concernant la DE dans les modèles animaux de PR.

\*\*\*\*\*

Cette revue est publiée dans *Arthritis Research and Therapy*, 2014;16: R22 (FI : 4.12, Q1)<sup>327</sup>

Totoson P, Maguin-Gaté K, Prati C, Wendling D, Demougeot C.

#### **Mechanisms of endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies.**

\*\*\*\*\*

En résumé, notre recherche sur Pubmed a permis de sélectionner 12 publications concernant l'étude de la fonction vasculaire sur un modèle animal de PR. Sur ces 12 publications, 10 ont été conduites sur le modèle AIA chez le rat et 2 sur le modèle CIA chez la souris.

Les principales informations révélées par cette revue sont les suivantes :

- ❖ Toutes les études ont exploré la fonction endothéliale macrovasculaire, sur le modèle d'anneaux aortiques isolés, en condition isométrique.
- ❖ Toutes les études sauf une, ont été conduites au stade d'inflammation maximale du modèle d'arthrite.
- ❖ Toutes les études sauf une, ont montré une réduction de la relaxation à l'Ach chez les animaux arthritiques par rapport aux animaux contrôles, témoignant ainsi d'une DE dans le modèle utilisé.
- ❖ Les études des mécanismes impliqués dans la DE ont identifié un rôle du stress oxydatif, du découplage de la NOS, du déficit en BH<sub>4</sub>, de l'augmentation de l'activité arginase, d'une suractivité du système rénine-angiotensine-aldostérone, de la surproduction de monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), de l'hyperactivation de la cyclo-oxygénase 2 et du déficit en EDHF.
- ❖ Les traitements curatifs des rats par la BH<sub>4</sub>, des statines (fluvastatine et simvastatine), des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (type AT1 : losartan, irbesartan), un inhibiteur d'arginase (Nor-NOHA) corrigent la DE, et cela indépendamment de leurs effets sur la sévérité de l'arthrite.

En conclusion, cette revue de la littérature a montré différents mécanismes physiopathologiques qui représentent des cibles thérapeutiques intéressantes pour la conception d'essais cliniques en vue de développer des traitements de la DE dans la PR. Depuis la publication de notre revue, 3 autres études ont été menées chez la brebis CIA<sup>328</sup> (des segments d'artère coronaire considérée comme artère de conductance), dans le modèle transgénique déficient en tristétraproline TTP-/-<sup>329</sup> (aorte) et dans le modèle de rat monoarthritique<sup>330</sup> (artère saphène) et ont confirmé la présence de DE à un stage aigu de l'arthrite.

## REVIEW

# Mechanisms of endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies

Perle Totoson<sup>1</sup>, Katy Maguin-Gaté<sup>1</sup>, Clément Prati<sup>1,2</sup>, Daniel Wendling<sup>2</sup> and Céline Demougeot<sup>1\*</sup>

## Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic inflammatory disease characterized by articular and extra-articular manifestations involving cardiovascular diseases (CVDs), which account for 30% to 50% of all deaths. In patients with RA, atherosclerosis lesions occur earlier and have a more rapid evolution than in the general population. Beyond mortality, the impact of CVD on quality of life, combined with the associated increase in health-care costs, renders CVD in RA a major public health problem. Recent studies showed that patients with RA are characterized by the presence of endothelial dysfunction (ED), which is recognized as a key event in the development of atherosclerosis. By definition, ED is a functional and reversible alteration of endothelial cells, leading to a shift of the actions of the endothelium toward reduced vasodilation, proinflammatory state and proliferative and prothrombotic properties. Although the improvement of endothelial function is becoming an important element of the global management of patients with RA, the mechanistic determinants of ED in RA are still poorly understood. Animal models of RA provide the unique opportunity to unravel the pathophysiological features of ED in RA. The present review summarizes the available data on mechanisms underlying ED in animal models of RA and proposes attractive prospects in order to discover novel therapeutic strategies of RA-associated ED.

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic inflammatory disease characterized by articular and extra-articular manifestations, including cardiovascular diseases (CVDs), which account for 30% to 50% of all deaths [1]. Recent studies showed that atherosclerosis lesions occur earlier and have a more rapid evolution in patients with RA than in the general population [1]. Of interest, it is now established that RA is equivalent to type 2 diabetes as an independent risk factor for CVD [2,3]. Although widely investigated, the underlying causes of the increased prevalence of CVD among patients with RA remain to be elucidated. Nonetheless, despite changes in the course of the disease in recent years and new therapeutic options, there is still no evidence that any particular intervention can reduce CVD risk in RA [4]. Endothelial dysfunction (ED) is thought to be a key event in the development of atherosclerosis [5]. ED was first identified in patients with RA by Bergholm and colleagues in 2002 [6] and is now

recognized as an important element of the cardiovascular (CV) risk in RA [7]. However, the precise pathophysiological mechanisms of ED in RA are still ill defined while their identification is a prerequisite for the discovery of drugs aiming to reduce CV risk in patients with RA. Because it is difficult to investigate these mechanisms in humans, studies on animal models of RA are useful for surrogate studies. The present review aimed to synthesize available data on ED and its potential mechanisms in animal models of RA.

## Animal models of arthritis used to study endothelial dysfunction

Most of the studies were performed in the rat model of adjuvant-induced arthritis (AIA) initially described by Pearson [8]. This model is induced by a single injection of a suspension containing heat-killed *Mycobacterium* emulsified in oil into the tail base or the hind-paw footpad. It is characterized by reliable, rapid onset and progression and easily measurable polyarticular inflammation, marked bone resorption, and periosteal bone proliferation [9]. Clinical signs of polyarthritis usually appear about 10 to 12 days after injection. The AIA model is T cell- and neutrophil-dependent and

\* Correspondence: cdemouge@univ-fcomte.fr

<sup>1</sup>EA 4267 « Fonctions et Dysfonctions Epithéliales », UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 19 rue Ambroise Paré, bâtiment S, 25030, BESANCON cedex, FRANCE

Full list of author information is available at the end of the article

complement-independent [9]. Few experiments were conducted in the mouse model of collagen-induced arthritis (mCIA). In this model, genetically susceptible strains of mice are immunized with injection in the tail of heterologous type II collagen in complete Freund adjuvant, followed by a boost of collagen 3 weeks later [9]. Animals develop an autoimmune polyarthritis characterized by cartilage destruction, bone resorption, synovitis, and periosteal proliferation. Clinical signs of polyarthritis appear about 10 to 12 days after boosting [9]. The mCIA model involves T and B cells and is complement-dependent [9]. In the two models, the severity of arthritis is routinely assessed by determining the thickness of each limb and/or a clinical score or both, taking into account swelling and erythema of the four limbs. The clinical scores can be further divided in four grades from 0 (least severe) to 3 (most severe) [10].

### Endothelial dysfunction in animal models of arthritis

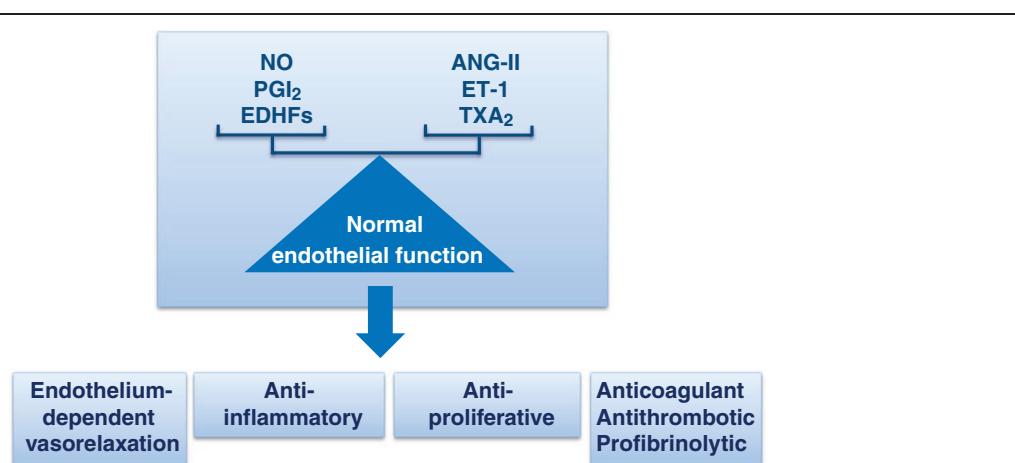
#### Definition of endothelial dysfunction

The endothelium, once considered a mere selectively permeable barrier between bloodstream and vascular wall, is now recognized as a crucial homeostatic organ, fundamental for the regulation of the vascular tone and structure [11]. It senses mechanical stimuli, such as pressure and shear stress, and chemical stimuli, such as hormones and locally secreted vasoactive substances. In response to these stimuli, the endothelium releases factors that regulate vasomotor function, inflammatory processes, cell growth, and hemostasis (Figure 1). Among the vasodilator substances produced by the endothelium are nitric oxide (NO), prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ ), and endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHFs). Vasoconstrictors include endothelin-1, angiotensin II

(ANG-II), and thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) [11]. 'Endothelial dysfunction' is a widely used term to describe any form of abnormal functional and reversible alteration of endothelial cells, leading to a shift of the actions of the endothelium toward reduced vasodilation, proinflammatory state, and proliferative and prothrombotic properties [12]. ED is an important early event in the pathogenesis of atherosclerosis, contributing to plaque initiation and progression [5]. In 'traditional' CVD, ED severity has a prognostic value for CV events and the correction of ED may be associated with reduced CV risk [13].

#### Evidence of endothelial dysfunction in animal models of arthritis

Endothelial function was studied in the widely used model of isolated aortic rings that investigated the effects of constrictive or relaxant drugs in isometric conditions. The studies were conducted mainly on the AIA model, and the assessment of ED was made at a time at which inflammatory symptoms are maximal (that is, between day 24 and 35 after the injection of *Mycobacterium* suspension, approximately 14 to 21 days after the onset of arthritis). All studies unequivocally demonstrated a reduced acetylcholine (ACh)-induced endothelium-dependent vasorelaxation compared with control rats and therefore attested to the presence of ED at this stage of the disease (Table 1) [14-23]. It is noteworthy that the ED severity mirrors the arthritis severity. Indeed, at day 24 post-injection in AIA, no alteration of ACh-induced relaxation was found in grade 1 arthritic rats whereas rats with grade 2 or 3 arthritis exhibited a reduced relaxation to ACh [16]. Likewise, at day 35 post-injection, we identified an inverse correlation between the maximal effect of ACh and the arthritis grade [22]. Only two studies investigated ED in the model of mCIA. In one study



**Figure 1** Endothelium-derived factors and normal endothelial function. ANG-II, angiotensin II; EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor; ET-1, endothelin 1; NO, nitric oxide; PGI<sub>2</sub>, prostacyclin; TXA<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub>.

**Table 1 Studies on vascular reactivity in animal models of arthritis**

Authors (year)	Animal strain	Arthritis model Arthritogenic agent (injection zone)	Time after induction of arthritis	Response to ACh	Response to SNP	Response to vasoconstrictors
Fang et al. [14] (1991)	Male Wistar rat	AIA <i>M. butyricum</i> (tail)	Day 26	↓	=	PE = KCl =
Cinar et al. [15] (1998)	Male rat (strain NR)	AIA <i>M. tuberculosis</i> (pad)	Day 26	↓	=	PE ↑ KCl =
Ulker et al. [16] (2000)	Male Wistar rat	AIA <i>M. tuberculosis</i> (pad)	Day 29	↓ in grade 2 and 3 = in grade 1	↓ in grade 2 and 3 = in grade 1	PE ↑ in grade 2, PE ↓ in grade 3, KCl ↑ in grade 2, KCl = in grade 1 and 3
Can et al. [17] (2002)	Male Wistar rat	AIA <i>M. tuberculosis</i> (pad)	Day 26	↓	=	NR
Haruna et al. [18] (2006)	Male Lewis rat	AIA <i>M. butyricum</i> (tail)	Day 35	↓	=	NR
Haruna et al. [19] (2007)	Male Lewis rat	AIA <i>M. butyricum</i> (tail)	Day 35	↓	=	NR
Nozaki et al. [20] (2007)	Male Lewis rat	AIA <i>M. butyricum</i> (tail)	Day 24	↓	=	NR
Sakuta et al. [21] (2010)	Male Lewis rat	AIA <i>M. butyricum</i> (tail)	Day 35	↓	=	NR
Prati et al. [22] (2011)	Male Lewis rat	AIA <i>M. butyricum</i> (tail)	Day 35	↓	=	KCl =
Prati et al. [23] (2012)	Male Lewis rat	AIA <i>M. butyricum</i> (tail)	Day 35	↓	=	NE, ANG-II, ET-1 =
Reynolds et al. [24] (2012)	Male DBA/1 mice	CIA Chick collagen (NR)	Day 24-27	=	=	Serotonin ↓, KCl ↓
He et al. [25] (2013)	Male DBA/1 mice	CIA Bovine collagen (tail)	Day 56	↓	=	NR

Vascular reactivity was studied in the model of isolated aortic rings. ↑, increased; ↓, decreased; =, unchanged; ACh, acetylcholine; AIA, adjuvant-induced arthritis; ANG-II, angiotensin II; CIA, collagen-induced arthritis; ET-1, endothelin-1; KCl, high potassium chloride; NE, norepinephrine; NR, not reported; PE, phenylephrine; SNP, sodium nitroprusside.

conducted at a time corresponding to mild early-onset disease, ED was not observed [24] whereas in another study, aortic ED was identified 8 weeks after collagen injection [25].

## Mechanisms of arthritis-induced endothelial dysfunction

### Decreased nitric oxide availability

In large vessels such as the aorta, NO released by endothelial cells is a major contributor of vasorelaxation. The presence of ED in AIA rats suggests that the vascular bioavailability of NO is blunted (Figure 2). Production of NO by vessels can involve both endothelial NO synthase (eNOS) and inducible NOS (iNOS). The lack of effect of the selective iNOS inhibitor 1400 W on the ACh-induced vasodilation in AIA rats argues against a role of iNOS in AIA-associated ED [23]. Thus, decreased NO availability may result from different mechanisms, including decreased eNOS protein expression, decreased eNOS activity, decreased NO synthesis secondary to decreased availability of the NOS co-factor tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ), deficiency in intracellular L-arginine (the substrate of NOS), accumulation of the endogenous eNOS inhibitor asymmetric dimethylarginine, or inactivation of NO through excessive generation of superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) [26].

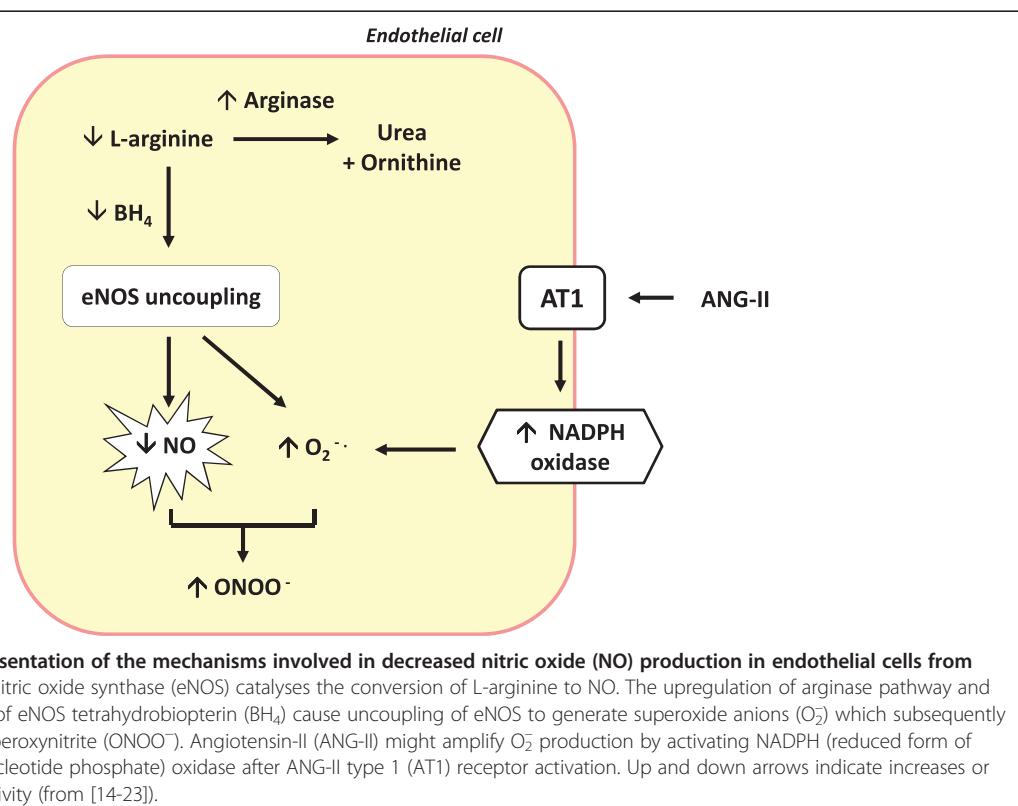
### Endothelial nitric oxide synthase expression/activity

In aortas from AIA rats, eNOS expression was found to be unchanged [22] or increased [18,19] on day 35 post-

injection. However, because eNOS is highly regulated at the post-transcriptional level, eNOS expression is not a good predictor of its activity [27,28]. It is therefore more interesting to measure the ratio between the serine 1177-phosphorylated form of eNOS (P-eNOS), a marker of the activated form of eNOS, and eNOS expression. With this method, He and colleagues [25] demonstrated that despite unchanged eNOS expression, the P-eNOS/eNOS ratio was decreased in aortas from mCIA. Somewhat surprisingly, studies that performed the direct measurement of NOS activity or NO production in aortas from AIA rats are lacking. Recently, by using the non-selective competitive NOS inhibitor, L-N<sub>G</sub>-nitroarginine methyl ester (L-NAME), one study provided an indirect argument for a blunted NOS activity in aortas from AIA rats [23]. Alternatively, plasma levels of oxidative degradation products of NO, including nitrite and nitrate (NOx), have been proposed as surrogate markers of vascular NOS activity [29]. However, plasma (nitrite + nitrate) levels were found to be increased (approximately two- to three-fold) at day 22 [30] and day 24 post-injection in AIA rats [20] despite a reduced response to ACh, thus questioning the measurement of plasma NOx levels as a reliable tool to assess ED in arthritis.

### Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase protein and oxidative stress

Under certain conditions, NOS loses its ability to convert L-arginine to L-citrulline but removes an electron from NADPH (reduced form of nicotinamide adenine



**Figure 2 Schematic representation of the mechanisms involved in decreased nitric oxide (NO) production in endothelial cells from arthritic rats.** Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) catalyses the conversion of L-arginine to NO. The upregulation of arginase pathway and the deficit in the co-factor of eNOS tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) cause uncoupling of eNOS to generate superoxide anions (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) which subsequently scavenge NO to generate peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>). Angiotensin-II (ANG-II) might amplify O<sub>2</sub><sup>-</sup> production by activating NADPH (reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase after ANG-II type 1 (AT1) receptor activation. Up and down arrows indicate increases or decreases in amount or activity (from [14-23]).

dinucleotide phosphate) and donates it to molecular oxygen to yield O<sub>2</sub><sup>-</sup> instead of NO [31]. This phenomenon is called 'NOS uncoupling' and results both in increased O<sub>2</sub><sup>-</sup> production and in decreased NO availability. Under these conditions, NO can react with O<sub>2</sub><sup>-</sup> to form peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), which itself is detrimental to the cell and contributes to nitritative stress [32]. As uncoupling of eNOS has been linked to its monomerization after disruption of eNOS dimers, the measurement by Western blotting of the ratio eNOS dimers/eNOS monomers is used as an index of uncoupling [33]. Consistent with eNOS uncoupling in AIA, the aortic ratio of eNOS dimers/monomers was found to be decreased on day 35 post-injection [18]. The most prominent cause of NOS uncoupling is the loss of the critical NOS cofactor BH<sub>4</sub> [34]. In the AIA model, on day 35 post-injection, O<sub>2</sub><sup>-</sup> production was measured in homogenates of aortas incubated with or without NOS substrate and various inhibitors [18]. The spontaneous aortic production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> was enhanced in AIA rats compared with controls. Consistent with a role of NOS uncoupling, incubation with the NOS inhibitor L-NAME reduced O<sub>2</sub><sup>-</sup> production. The incubation with BH<sub>4</sub> also reduced O<sub>2</sub><sup>-</sup> production, suggesting a contribution of BH<sub>4</sub> deficiency to NOS uncoupling. This hypothesis was confirmed by the twofold decrease in serum BH<sub>4</sub> levels in AIA rats compared with controls [18]. Moreover, treatment of AIA with BH<sub>4</sub> led to the recovery of normal

endothelial function, albeit not modifying the severity of arthritis [18]. The uncoupling of eNOS is not the only possible source of vascular O<sub>2</sub><sup>-</sup>. NADP (H) oxidase has been reported as one of the most important sources of excess O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in the vasculature [35]. In AIA, mRNA expression of the aortic NADP (H) oxidase subunits p22phox, gp21phox, and p47phox was increased [19,21], as was the activity of the enzyme [21]. Taken together, these results suggest that both eNOS uncoupling and NADP (H) oxidase overexpression are the predominant sources of O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in aortas from AIA rats. The role of excessive O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in ED was confirmed by our demonstration that incubation of aortic rings of AIA rats with Tempol, a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic, or with apocynin, an NADP (H) oxidase inhibitor, significantly improved ACh-induced vaso-relaxation [23]. Of note, ONOO<sup>-</sup> can also directly lead to uncoupling of NOS. The vascular levels of nitrotyrosine, a marker of ONOO<sup>-</sup> formation, are enhanced in aortas of AIA rats [18]. However, whether ONOO<sup>-</sup> contributes to ED was not evaluated.

#### **Increased arginase pathway**

Besides BH<sub>4</sub> depletion and oxidative stress as causes for eNOS uncoupling, depletion of the NOS substrate L-arginine secondary to arginase upregulation is a cause for NOS uncoupling and ED. Arginase (EC 3.5.3.1) is a

hydrolytic enzyme responsible for converting L-arginine to L-ornithine and urea [36]. Mammalian arginases exist in two distinct isoforms (type I and type II) which have specific subcellular localizations and tissue distributions. Notably, both arginase isoforms are expressed by endothelial and vascular smooth muscle cells (VSMCs) [37]. During the last decade, evidence emerged that increased arginase expression/activity contributes to ED associated with various CVDs [37]. Increased aortic arginase activity and increased expression of type II arginase were reported at day 35 post-injection in AIA rats [22]. It is noteworthy that both activity and expression were positively correlated with the intensity of arthritis but not with plasma interleukin-6 levels, suggesting that mechanisms other than systemic inflammation are involved in the upregulation of vascular arginase pathway in AIA. Incubation of aortic rings with N<sub>ω</sub>-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA), a selective competitive arginase inhibitor, improved ACh-induced vasorelaxation [23]. These data were confirmed in a study in which the treatment of AIA rats with nor-NOHA for 21 days after the onset of arthritis normalized the endothelial function despite the lack of impact of arthritis severity. Consistent with the contributing role of arginase overexpression in NOS uncoupling, increased NOS activity and decreased O<sub>2</sub><sup>-</sup> production were identified as mechanisms contributing to the beneficial effect of arginase inhibitor on endothelial function [23].

#### The role of endothelium-derived hyperpolarizing factor

Despite the ongoing debate of the molecular identity and signaling pathways, the contribution of EDHFs to the endothelium-dependent relaxation is considered an important feature of normal endothelium function [38]. EDHF has been demonstrated unequivocally in various blood vessels from different species, including humans [39]. The acronym 'EDHF' is applied to a factor which induces vascular relaxation in the presence of cyclooxygenase (COX) plus NOS inhibitors and which is inhibited by charybdotoxin (an inhibitor of high/intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels) + apamin (an inhibitor of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels). EDHF induces a potassium-mediated event associated with a reduction in intracellular K<sup>+</sup> in VSMCs [40]. The role of EDHF in endothelial maintenance has been introduced as a back-up mechanism during NO deficiency [38]. Recent data reported the impairment of aortic EDHF production after ACh challenge in AIA rats, suggesting that the EDHF-mediated compensatory dilator system is lacking in RA [23]. Interestingly, the treatment with an arginase inhibitor restored the EDHF contribution to that of control rats, suggesting a cross-talk between NO and EDHF pathways in arthritis [23].

#### The role of prostanoids

In addition to NO and EDHFs, endothelium-derived prostanoids and TXA<sub>2</sub> are critical regulators of vascular tone in both physiological and pathological conditions [41]. Physiologically, vasorelaxant prostanoids such as PGI<sub>2</sub> and vasoconstrictive prostanoids such as TXA<sub>2</sub> are synthesized by COXs. 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 [41]. In a model of rabbits with both chronic AIA and atherosclerosis, increased COX-2 expression was reported in the femoral artery [42]. In AIA rats, incubation of aortic rings with the preferential COX-2 inhibitor NS-398 improved ACh-induced vasodilation, thereby indicating that COX-2 overactivation contributes to ED [23]. Likewise, treatment of AIA rats with the COX-2 inhibitor nabumetone from day 15 to 29 post-immunization normalized the vascular response to ACh [16]. By using the TX synthase inhibitor furegrelate, we demonstrated a deleterious role of TX synthase overactivation in endothelial function in AIA [23]. Somewhat surprisingly, overactivation of PGI<sub>2</sub> synthase is also involved in AIA-associated ED. Indeed, the PGI<sub>2</sub> synthase inhibitor tranylcypromine improved ACh-induced vasodilation in aortic rings from AIA rats [23]. These results confirmed the janus face of PGI<sub>2</sub> and suggest that, as already described in animal models of hypertension [43], PGI<sub>2</sub> can induce vasoconstriction in AIA rats.

#### The role of the renin-angiotensin-aldosterone system

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) plays an important role in the physiology and pathology of the CV system. ANG-II regulates blood pressure and electrolyte homeostasis and contributes to the inflammatory response in the vascular wall [44]. ANG-II enhances O<sub>2</sub><sup>-</sup> production by stimulation of NADP (H) oxidase, thereby causing ED. In 'traditional' CVD, treatment with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors or angiotensin receptor blockers (ARBs) led to a reduction of CV events [44]. In AIA rats, vascular mRNA expression of ANG-II type 1 receptors and mRNA expression/activity of ACE were increased as compared with controls [21]. In addition, the perfusion of AIA rats with ANG-II for 21 days from the onset of arthritis exacerbated these dysregulations of RAAS while arthritis symptoms were not affected. Moreover, treatment of AIA rats with ARBs led to the improvement of aortic endothelial function along with a decrease in aortic O<sub>2</sub><sup>-</sup> production. Collectively, these data suggest a contributing role of ANG-II in AIA-induced ED [21].

#### Pharmacological approaches to treat endothelial dysfunction in animal models of arthritis

As shown in Table 2, only a few studies investigated the effects of drugs on AIA-associated ED. Treatment of

**Table 2 Effects of treatments on vascular reactivity in animal model of arthritis**

Authors (year)	Animal strain	Arthritis model <i>Arthritogenetic agent</i> (injection zone)	Treatment	Vascular reactivity	Arthritis severity
Cinar et al. [15] (1998)	Male rat (strain NR)	AIA <i>M. tuberculosis</i> (pad)	Vitamin E 100 mg/kg per day (im) from day 0 to day 26 post-injection	↓ ACh, ↑ PE	↓
Ulker et al. [16] (2000)	Male Wistar rat	AIA <i>M. tuberculosis</i> (pad)	Nabumetone 120 and 240 mg/kg per day (po) from day 14 to day 28 post-injection	Normalization of responses to Ach and SNP	= (120 mg/kg per day) ↓ (240 mg/kg per day)
Can et al. [17] (2002)	Male Wistar rat	AIA <i>M. tuberculosis</i> (pad)	Vitamin E 100 mg/kg per day (im) from day 0 to day 26 post-injection	↑ ACh	↓
Nozaki et al. [20] (2007)	Male Lewis rat	AIA <i>M. butyricum</i> (tail)	Keishibukuryogan 1–1.2 g/kg per day (po) from day 0 to day 25 post-injection	↑ ACh	=
Haruna et al. [18] (2006)	Male Lewis rat	AIA <i>M. butyricum</i> (tail)	BH <sub>4</sub> 20 mg/kg (ip) from day 21 to day 35 post-injection	↑ ACh = SNP	=
Haruna et al. [19] (2007)	Male Lewis rat	AIA <i>M. butyricum</i> (tail)	Fluvastatin 5 mg/kg per day (po) from day 21 to day 35 post-injection	↑ ACh	=
Sakuta et al. [21] (2010)	Male Lewis rat	AIA <i>M. butyricum</i> (tail)	Losartan 3 mg/kg per day (po) and Irbesartan 5 mg/kg per day (po) from day 14 to day 35 post-injection	↑ ACh = SNP	=
Prati et al. [23] (2012)	Male Lewis rat	AIA <i>M. butyricum</i> (tail)	Nor-NOHA 40 mg/kg per day (ip) from day 14 to day 35 post-injection	↑ ACh = SNP = NE, ANG-II, ET-1	=
He et al. [25] (2013)	Male DBA/1 mice	CIA <i>Bovine collagen</i> (tail)	Simvastatin 50 mg/kg per day (po) from day 7 before injection to day 56 post-injection	↑ ACh = SNP	=

Vascular reactivity was studied in the model of isolated aortic rings. ↑, increased; ↓, decreased; =, unchanged; ACh, acetylcholine; AIA, adjuvant-induced arthritis; ANG-II, angiotensin II; BH<sub>4</sub>, tetrahydrobiopterin; CIA, collagen-induced arthritis; ET-1, endothelin-1; im, intramuscular; ip, intraperitoneal; KCl, high potassium chloride; NE, norepinephrine; nor-NOHA, N-nitro-L-arginine; NR, not reported; PE, phenylephrine; po, per os; SNP, sodium nitroprusside.

AIA rats with BH<sub>4</sub> [18], fluvastatin [19], losartan [21], irbesartan [21], or arginase inhibitor [23] administered after the onset of arthritis fully restored the endothelial response to ACh without any influence on the course of arthritis. Recently, the same finding was found after a preventive treatment with simvastatin in mCIA [25]. Such dissociation between vascular and clinical effects of these drugs is very interesting since it suggests that patients with RA, even resistant to anti-rheumatic medications with regard to articular symptoms, could benefit from therapies specifically developed to target ED. Two studies investigated the effects of vitamin E on AIA-associated ED but led to controversial results [15,17]. Given the paramount importance of reducing CV risk in RA, there is a need to determine the effect of anti-rheumatic medications on ED. In patients with RA, studies investigating the impact of disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) or biologic agents on ED are scarce and led to conflicting results [7,45–47]. It is somewhat surprising that studies evaluating the effect of anti-rheumatic drugs on the ED in animal models of arthritis are lacking. Such studies need to be performed.

## Conclusions

The studies presented in the present review provide compelling evidence that aortic ED is impaired during

the severe inflammatory phase of the AIA model, in agreement with the presence of a macrovascular ED in patients with established RA [7]. The available data obtained in animal models identified several mechanisms of ED: decreased endothelial NO production, excessive endothelial O<sub>2</sub><sup>-</sup> production, deficiency in the NOS cofactor BH<sub>4</sub>, upregulation of arginase, upregulation of NADP (H) oxidase, and overactivation of COX-2, TX synthase, and PGI<sub>2</sub> synthase, thereby identifying future potential targets for new therapeutic options to treat ED in patients with arthritis. However, many points are still unresolved and would benefit from further studies on animal models of RA. A first point concerns the time course of ED with respect to the arthritis symptoms and diagnosis. Is ED occurring early or even before the onset of the disease? Is it long-lasting and persistent even though the inflammatory phase is resolved? A second point concerns the presence or not of ED in the microvasculature. Microvascular dysfunction plays an important role in the development of target organ damage in the heart and kidney as well as in the development of CV risk factors [48,49]. Whether microvascular dysfunction occurs early in the course of RA is not known and whether microvascular ED mirrors macrovascular ED, and as such occurs at the same time in the disease process, remain to be determined. A third point concerns the link

between inflammatory process and the occurrence of ED. Animal studies revealed that the improvement of endothelial function occurs even though the severity of arthritis is unchanged, suggesting that the reduction of inflammation is not a prerequisite for the improvement of endothelial function. Moreover, the role of the different actors of atherogenesis such as cellular adhesion molecules, cytokines, chemokines, vascular endothelial growth factor, autoantibodies, and different cells of the immune response such as macrophages or dendritic cells [46] in ED has to be studied in animals. Finally, animal models may help to define the effect of immunosuppressive drugs such as DMARDs, anti-tumor necrosis factor-alpha, or glucocorticoids on ED and the mechanisms behind their effects.

#### Abbreviations

ACE: Angiotensin-converting enzyme; ACh: Acetylcholine; AIA: Adjuvant-induced arthritis; ANG-II: Angiotensin II; ARB: Angiotensin receptor blocker; BH<sub>4</sub>: Tetrahydrobiopterin; COX: Cyclo-oxygenase; CV: Cardiovascular; CVD: Cardiovascular disease; DMARD: Disease-modifying anti-rheumatic drug; ED: Endothelial dysfunction; EDHF: Endothelium-derived hyperpolarizing factor; eNOS: Endothelial nitric oxide synthase; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; L-NAME: L-N<sub>G</sub>-nitroarginine methyl ester; mCIA: Collagen-induced arthritis in mice; NO: Nitric oxide; nN-NOHA: N<sub>ω</sub>-hydroxy-nor-L-arginine; NOS: Nitric oxide synthase; NOx: Nitrite plus nitrate; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Superoxide anion; ONOO<sup>-</sup>: Peroxynitrite; P-eNOS: Serine 1177-phosphorylated form of endothelial nitric oxide synthase; PGl<sub>2</sub>: Prostacyclin; RA: Rheumatoid arthritis; RAAS: Renin-angiotensin-aldosterone system; TXA<sub>2</sub>: Thromboxane A<sub>2</sub>; VSMC: Vascular smooth muscle cell.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

PT and CD designed the review and drafted the manuscript. KM-G, CP, and DW participated in designing the review and helped with drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Author details

<sup>1</sup>EA 4267 « Fonctions et Dysfonctions Epithéliales », UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 19 rue Ambroise Paré, bâtiment S, 25030, BESANCON cedex, FRANCE. <sup>2</sup>Service de Rhumatologie, CHU Minjoz, 3 Boulevard Alexandre Fleming, 25030, BESANCON, France.

Published: 24 Jan 2014

#### References

- Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Spitz PW, Haga M, Kleinheksel SM, Cathey MA: **The mortality of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1994, **37**:481–494.
- van Halm VP, Peters MJ, Voskuyl AE, Boers M, Lems WF, Visser M, Stehouwer CD, Spijkerman AM, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Smulders YM, Dijkmans BA, Nurmohtamed MT: **Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease: a cross-sectional study, the CARRE Investigation.** *Ann Rheum Dis* 2009, **68**:1395–1400.
- Peters MJ, van Halm VP, Voskuyl AE, Smulders YM, Boers M, Lems WF, Visser M, Stehouwer CD, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Dijkmans BA, Nurmohtamed MT: **Does rheumatoid arthritis equal diabetes mellitus as an independent risk factor for cardiovascular disease? A prospective study.** *Arthritis Rheum* 2009, **61**:1571–1579.
- Kramer HR, Giles JT: **Cardiovascular disease risk in rheumatoid arthritis: progress, debate, and opportunity.** *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011, **63**:484–499.
- Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H: **Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis.** *Cardiovasc J Afr* 2012, **23**:222–231.
- Bergholm R, Leirisalo-Repo M, Vehkavaara S, Mäkimattila S, Taskinen MR, Yki-Järvinen H: **Impaired responsiveness to NO in newly diagnosed patients with rheumatoid arthritis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, **22**:1637–1641.
- Sando A, van Zanten JJ V, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD: **Vascular function and morphology in rheumatoid arthritis: a systematic review.** *Rheumatology (Oxford)* 2011, **50**:2125–2139.
- Pearson CM: **Development of arthritis, periarthritis and periartitis in rats given adjuvant.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1956, **91**:95–101.
- 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**:1505–1515.
- 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.
- Mensah GA: **Healthy endothelium: the scientific basis for cardiovascular health promotion and chronic disease prevention.** *Vascul Pharmacol* 2007, **46**:310–314.
- Versari D, Daghini E, Virdis A, Ghidoni L, Taddei S: **Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease.** *Diabetes Care* 2009, **32**:S314–S321.
- Martin BJ, Anderson TJ: **Risk prediction in cardiovascular disease: the prognostic significance of endothelial dysfunction.** *Can J Cardiol* 2009, **25**:15A–20A.
- 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**:122–130.
- Cinar MG, Can C, Ulker S, Gök S, Coker C, Soykan N, Koşay S, Evinç A: **Effect of vitamin E on vascular responses of thoracic aorta in rat experimental arthritis.** *Gen Pharmacol* 1998, **31**:149–153.
- Ulker S, Onal A, Hatip FB, Sürütçü A, Alkanat M, Koşay S, Evinç A: **Effect of nabumetone treatment on vascular responses of the thoracic aorta in rat experimental arthritis.** *Pharmacology* 2000, **60**:136–142.
- Can C, Cinar MG, Koşay S, Evinç A: **Vascular endothelial dysfunction associated with elevated serum homocysteine levels in rat adjuvant arthritis: effect of vitamin E administration.** *Life Sci* 2002, **71**:401–410.
- Haruna Y, Morita Y, Komai N, Yada T, Sakuta T, Tomita N, Fox DA, Kashihara 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.
- Haruna Y, Morita Y, Yada T, Satoh M, Fox DA, Kashihara N: **Fluvastatin reverses endothelial dysfunction and increased vascular oxidative stress in rat adjuvant-induced arthritis.** *Arthritis Rheum* 2007, **56**:1827–1835.
- Nozaki K, Goto H, Nakagawa T, Hikiami H, Koizumi K, Shibahara N, Shimada Y: **Effects of keishibukuryogan on vascular function in adjuvant-induced arthritis rats.** *Biol Pharm Bull* 2007, **30**:1042–1047.
- 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**:1319–1328.
- 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.
- Prati C, Berthelot A, Kantelip B, Wendling D, Demougeot C: **Treatment with the arginase inhibitor N<sub>ω</sub>-hydroxy-nor-L-arginine restores endothelial function in rat adjuvant-induced arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2012, **14**:R130.
- Reynolds S, Williams AS, Williams H, Smale S, Stephenson HJ, Amos N, George SJ, O'Donnell VB, Lang D: **Contractile, but not endothelial, dysfunction in early inflammatory arthritis: a possible role for matrix metalloproteinase-9.** *Br J Pharmacol* 2012, **167**:505–514.
- He M, Liang X, He L, Wen W, Zhao S, Wen L, Liu Y, Shyy JY, Yuan Z: **Endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. The role of monocyte chemoattractant protein-1-induced protein.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013, **33**:1384–1391.
- Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münnel T: **Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension.** *Antioxid Redox Signal* 2008, **10**:1115–1126.
- Piech A, Dassy C, Havaux X, Feron O, Balligand JL: **Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats.** *Cardiovasc Res* 2003, **57**:456–467.

28. Pechánová O, Zicha J, Kojslová S, Dobesová Z, Jendeková L, Kunes J: Effect of chronic N-acetylcysteine treatment on the development of spontaneous hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2006, 110:235–242.
29. Burger D, Touyz RM: Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertens* 2012, 6:85–99.
30. Hua J, Suguro S, Hirano S, Sakamoto K, Nagaoka I: Preventive actions of a high dose of glucosamine on adjuvant arthritis in rats. *Inflamm Res* 2005, 54:127–132.
31. Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL: Superoxide generation from endothelial nitric oxide synthase. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* 1998, 273:25804–25808.
32. Wink DA, Miranda KM, Espey MG, Pluta RM, Hewett SJ, Colton C, Vitek M, Feilisch M, Grisham MB: Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2001, 3:203–213.
33. Bauersachs J, Schäfer A: Tetrahydrobiopterin and eNOS dimer/monomer ratio – a clue to eNOS uncoupling in diabetes? *Cardiovascular Res* 2005, 65:768–769.
34. Alp NJ, Channon KM: Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24:413–420.
35. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M: NAD (P) H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000, 86:494–501.
36. Mori M, Gotoh T: Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 275:715–719.
37. Morris SM Jr: Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br J Pharmacol* 2009, 157:922–930.
38. Ozkor MA, Quyyumi AA: Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. *Cardiol Res Pract* 2011, 2011:156146.
39. Feletou M, Vanhoutte PM: Endothelium-derived hyper-polarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26:1215–1225.
40. 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.
41. Félezou M, Huang Y, Vanhoutte PM: Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 2011, 164:894–912.
42. 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.
43. Félezou 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.
44. Epstein BJ, Leonard PT, Shah NK: The evolving landscape of RAAS inhibition: from ACE inhibitors to ARBs, to DRLs and beyond. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2012, 10:713–725.
45. der Stoep DF VB-V, Klop B, Van Zeben D, Hazes JM, Castro Cabezas M: Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: how to lower the risk. *Atherosclerosis* 2013, 231:163–172.
46. Murdaca G, Colombo BM, Cagnati P, Gulli R, Spanò F, Puppo F: Endothelial dysfunction in rheumatic autoimmune diseases. *Atherosclerosis* 2012, 224:309–317.
47. Murdaca G, Spanò F, Puppo F: Use of leflunomide plus TNF-α inhibitors in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Drug Saf* 2013, 12:801–804.
48. Cheung N, Bluemke DA, Klein R, Sharrett AR, Islam FM, Cotch MF, Klein BE, Criqui MH, Wong TY: Retinal arteriolar narrowing and left ventricular remodeling: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Am Coll Cardiol* 2007, 50:48–55.
49. Struijker-Boudier HA, Rosei AE, Bruneval P, Camici PG, Christ F, Henrion D, Lévy BI, Pries A, Vanoverschelde JL: Evaluation of the microcirculation in hypertension and cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2007, 28:2834–2840.

10.1186/ar4450

**Cite this article as:** Totoson et al.: Mechanisms of endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies. *Arthritis Research & Therapy* 2014, 16:R22



**2<sup>ème</sup> partie :**  
**Travaux personnels**



## A- Objectifs de la thèse :

Les données de la littérature présentées précédemment ont clairement identifié chez le patient PR l'existence d'une DE qui constituerait la pierre angulaire des complications CV de la maladie. Quelques études expérimentales sur des modèles d'arthrite ont confirmé le développement de la même anomalie vasculaire chez l'animal, du moins à l'étage macrovasculaire, rendant possible leur utilisation pour mieux comprendre les anomalies endothéliales survenant au cours de cette pathologie. Cependant, de nombreuses questions restent posées concernant la DE, tant sur le plan physiopathologique, que diagnostique et thérapeutique en cas de PR :

- A quel stade précis de la PR la DE apparaît-t-elle<sup>46</sup>?
- Affecte-t-elle différemment la macro et la microcirculation?
- Quels sont les moyens de diagnostic adéquats ?
- Cette DE nécessite-t-elle des traitements spécifiques non-rhumatologiques ? Car en dépit de la grande avancée thérapeutique de la PR, l'efficacité des traitements de fond sur la DE reste encore à spécifier<sup>66, 331</sup>.

Ce travail de thèse a eu pour objectif de mieux caractériser la DE dans cette pathologie, par le biais de 3 parties expérimentales, toutes réalisées dans le modèle de rat AIA. Le choix du modèle AIA a été guidé par les travaux antérieurs du laboratoire qui montraient l'existence d'une DE dans ce modèle, au niveau aortique, trois semaines après le début de l'arthrite<sup>332</sup>. De plus, comme présenté dans notre revue de littérature, il s'agit du modèle pour lequel les données vasculaires sont les plus abondantes<sup>327</sup>.

La première étude expérimentale a eu pour objectifs de déterminer la cinétique de la DE dans le modèle AIA au niveau des lits micro- et macrovasculaires, et de déterminer si la DE est corrélée aux taux circulants de marqueurs « classiques » de l'inflammation et d'activation endothéliale.

*Cette étude a fait l'objet d'une publication acceptée dans Arthritis and Rheumatology en 2015 (Facteur d'impact 7.764)*

La deuxième étude expérimentale a eu pour objectifs de mieux comprendre les modifications phénotypiques endothéliales macrovasculaires survenant au cours de l'arthrite, et de déterminer leur lien avec les cytokines pro-inflammatoires circulantes.

*Cette étude fait l'objet d'une publication actuellement soumise à Plos One (Facteur d'impact 3.354)*

La troisième étude expérimentale a eu pour objectifs de déterminer l'effet d'un anti-TNF- $\alpha$  (etanercept) sur la fonction endothéliale et de comprendre les mécanismes impliqués dans les effets observés.

*Cette étude a fait l'objet d'une publication soumise à Rheumatology (Facteur d'impact 4.475).*



## B- Travaux personnels

### 1<sup>ère</sup> étude :

**Cinétique d'évolution de la dysfonction endothéliale dans le modèle d'arthrite induite à adjuvant au niveau micro- et macrovasculaire et relation avec des marqueurs d'activation endothéliale**

\*\*\*\*\*

Article publié dans *Arthritis & Rheumatology*, 2015;67:1203-1213 (FI : 7.764)<sup>315</sup>

Totoson P\*, Maguin-Gaté K\*, Nappey M, Prati C, Wendling D, Demougeot C.

**Microvascular abnormalities in Adjuvant-Induced Arthritis: Relationship with Macrovascular Endothelial Function and Markers of Endothelial Activation.**

\* contributed equally to this work.

\*\*\*\*\*

## I. Contexte et objectifs

Un nombre croissant d'études atteste de la présence d'une DE chez les patients atteints de PR<sup>220, 232</sup>. Cependant, la majorité de ces études ont été réalisées à un stade de PR « installée », c'est-à-dire que l'élément principal d'inclusion des patients est le plus souvent le respect des critères de classification de l'ACR/EULAR (Figure 7, page 40). Aussi, les données actuelles de la littérature ne permettent pas de conclure sur le stade auquel la DE apparaît au cours de la PR<sup>46, 74, 228</sup>. De plus, la majorité des études dans la PR ont utilisé la mesure de la FMD comme index de fonction endothéliale et ont donc étudié les anomalies survenant à l'étage macrovasculaire. Peu de données sont disponibles concernant la DE à l'étage microvasculaire, alors que cette DE jouerait un rôle important dans le développement des atteintes de différents organes tels que le rein, le cerveau et le cœur<sup>181</sup>. Les lits vasculaires pourraient être différemment altérés dans la PR comme cela est observé en cas de diabète, où la DE microvasculaire précède celle des territoires macrovasculaires<sup>333</sup>. Enfin, d'un point de vue clinique, il paraît important d'identifier des outils permettant un diagnostic rapide et fiable de la DE, outils qui manquent aujourd'hui.

Le premier objectif de cette étude a été de comprendre la cinétique d'apparition et d'évolution de la DE dans le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant (AIA), et de comparer cette cinétique au niveau de lits micro et macrovasculaires. Un autre objectif a été de déterminer si des marqueurs de DE utilisés dans les pathologies CV « conventionnelles »<sup>334</sup> tels que la CRP (protéine C réactive, un marqueur d'inflammation systémique), ou des marqueurs d'activation endothéliale (ICAM-1 et VCAM-1) pourraient refléter la DE micro- ou macrovasculaires dans le modèle AIA.

## II. Méthodologie

### *Le modèle AIA*

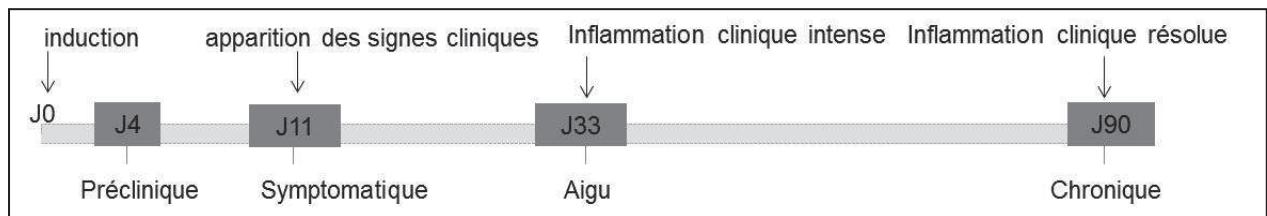
Le modèle AIA est induit chez des rats Lewis mâles de 6 semaines, par une injection unique à la base de la queue, de 1,2 mg de *Mycobacterium butyricum* inactivé en suspension dans l'adjuvant incomplet de Freund. En pratique, la poudre de *Mycobacterium Butyricum* est broyée au mortier, mise en suspension dans l'adjuvant, à une concentration de 10 mg/ml, puis soumise à une sonication de 5 minutes pour homogénéiser la suspension. L'injection (à J0) est réalisée chez un rat anesthésié à l'isoflurane. Des rats injectés au sérum physiologique servent de rats Contrôles non AIA. Le suivi clinique des animaux consiste en une mesure quotidienne du :

- poids corporel,
- diamètre du tarse par un pied à coulisse,
- score arthritique prenant en compte les œdèmes et/ou érythèmes des poignets, des chevilles et du tarse de chaque patte, ainsi que des articulations des doigts des 4 pattes (métacarpo/tarso-phalangiennes, inter-phalangiennes proximales et distales). Ce score

arthritique est attribué à chaque rat selon la méthode décrite par *Sakaguchi et al*<sup>335</sup>, où le score maximal par rat est égal à 6.

La cinétique de la fonction endothéliale a été réalisée à 4 stades de l'arthrite, choisis sur la base des données bibliographiques disponibles sur ce modèle<sup>336, 337</sup> :

- J4 : stade « préclinique » où le processus antigénique est démarré sans pour autant donner de signes cliniques visibles,
- J11 : stade « symptomatique » (« early arthritis ») correspondant à l'apparition des premiers signes cliniques d'arthrite,
- J33 : stade « aigu » où l'inflammation clinique est intense,
- J90 : stade « chronique » où l'inflammation clinique est résolue mais où les atteintes articulaires radiologiques persistent.



#### A chaque stade de l'AIA

- **La fonction endothéliale macrovasculaire** a été étudiée sur des anneaux d'aortes thoraciques isolés, par la technique de réactivité vasculaire en condition isométrique. La fonction endothéliale a été évaluée par la vasodilatation en réponse à des concentrations croissantes et cumulatives d'acétylcholine sur un anneau précontracté à la phényléphrine.
- **La fonction endothéliale microvasculaire** a été évaluée sur des segments d'artères mésentériques de 3<sup>ème</sup> ordre, montés sur l'artériographe de Halpern et étudiés en condition isobare. La fonction endothéliale a été mesurée par l'étude de la relaxation vasculaire induite par le flux intra-vasculaire (shear stress). La technique a aussi permis d'étudier des paramètres fonctionnels musculaires lisses comme **le tonus myogénique**, des **paramètres structuraux** comme le ratio lumière/media et la section transversale et enfin des **paramètres mécaniques** tels que le module élastique  $\beta$  et la courbe de contrainte-déformation.
- *Remarque : Par souci de réduction du nombre d'animaux, un même rat a été utilisé pour l'étude des 2 lits vasculaires, qui a donc nécessité le travail parallèle de 2 expérimentateurs. Les expériences réalisées sur le myographe d'Halpern ont été effectuées par le Dr. K. Maguin-Gaté.*

- Les **taux plasmatiques de CRP, ICAM-1, VCAM-1** ont été mesurés à l'aide de Kits Milliplex utilisant des billes magnétiques (eBioscience). L'analyse de fluorescence se fait par le système MAGPIX Luminex utilisant le logiciel analytique Milliplex.
- Les **atteintes articulaires** ont été évaluées par des radiographies des chevilles des rats et « quantifiées » à l'aide d'un score radiologique<sup>338</sup>.
- Les analyses statistiques ont utilisé le test de Spearman pour évaluer les corrélations entre 2 séries de valeurs, le t-test ou test de Mann Whitney pour comparer 2 groupes entre eux, et une analyse de variance (ANOVA) à mesures répétées pour comparer les courbes effet-concentrations entre elles.

### **III. Principaux résultats**

Cette étude a permis de montrer que :

- ❖ La DE à l'étage microvasculaire est d'apparition plus précoce (dès les premiers symptômes) que la DE macrovasculaire (au stade d'inflammation maximale).
- ❖ La DE à l'étage microvasculaire est pérenne tout au long de l'arthrite alors que la DE macrovasculaire régresse à la phase chronique, quand l'inflammation clinique a régressé.
- ❖ Les DE au niveau des deux territoires vasculaires sont indépendantes l'une de l'autre.
- ❖ Les taux circulants de CRP, ICAM-1 et VCAM-1 ne sont corrélés ni à la DE micro- ni à la DE macrovasculaire.

## Microvascular Abnormalities in Adjuvant-Induced Arthritis

### Relationship to Macrovascular Endothelial Function and Markers of Endothelial Activation

Perle Totoson,<sup>1</sup> Katy Maguin-Gaté,<sup>1</sup> Maude Nappey,<sup>1</sup> Clément Prati,<sup>2</sup>  
Daniel Wendling,<sup>3</sup> and Céline Demougeot<sup>1</sup>

**Objective.** To determine the time course of microvascular abnormalities and the link with macrovascular endothelial function and circulating markers of endothelial activation in adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats.

**Methods.** Microvascular function/structure and mechanics were studied in third-order mesenteric arteries subjected to flow and/or pressure on day 4 (preclinical arthritis), day 11 (very early arthritis), day 33 (severe disease), and day 90 (when inflammation has resolved) after AIA induction. Macrovascular function was studied in aortic rings, and blood pressure, plasma levels of C-reactive protein (CRP), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) were measured at each time point.

**Results.** Mesenteric flow-mediated vasodilation was significantly reduced from very early arthritis to chronic disease, whereas increased microvascular arterial stiffness was evident only on day 33. Macrovascular

endothelial dysfunction was observed only on day 33. Thus, on day 90, whereas rats with AIA recovered normal macrovascular endothelial function, microvascular endothelial function remained impaired. No correlation was found between micro- and macrovascular endothelial function throughout the course of arthritis ( $r = 0.180$ ,  $P = 0.229$ ). Furthermore, no correlation was found between CRP levels, ICAM-1 levels, and endothelial function whatever the vascular bed. AIA was not associated with change in blood pressure or VCAM levels.

**Conclusion.** Our findings indicate that microvascular endothelial dysfunction occurs earlier than macrovascular endothelial dysfunction and microvascular arterial stiffness during arthritis, suggesting that microvascular endothelial function would be a valuable tool for the early assessment of cardiovascular risk in RA. Neither the ICAM-1 level nor the CRP level is a good marker of micro- or macrovascular endothelial dysfunction.

<sup>1</sup>Perle Totoson, PharmD, Katy Maguin-Gaté, PhD, Maude Nappey, BS, Céline Demougeot, PharmD, PhD: Université de Franche-Comté EA 4267, Fonctions et Dysfonctions Epithéliales, Integrated Center for Research in Inflammatory Diseases, Besançon, France; <sup>2</sup>Clément Prati, MD, PhD: Université de Franche-Comté EA 4267, Fonctions et Dysfonctions Epithéliales, Integrated Center for Research in Inflammatory Diseases, and Centre Hospitalier Régional Universitaire Hôpital Jean Minjoz, Besançon, France; <sup>3</sup>Daniel Wendling, MD, PhD: Université de Franche-Comté EA 4266, Centre Hospitalier Régional Universitaire Hôpital Jean Minjoz, Besançon, France.

Drs. Totoson and Maguin-Gaté contributed equally to this work.

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

Address correspondence to Céline Demougeot, PharmD, PhD, EA 4267, Fonctions et Dysfonctions Epithéliales, UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 19 Rue Ambroise Paré, Bâtiment S, 25030 Besançon Cedex, France. E-mail: cdemouge@univ-fcomte.fr.

Submitted for publication June 4, 2014; accepted in revised form February 3, 2015.

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common systemic autoimmune disease associated with excessive cardiovascular (CV) mortality and morbidity (1). The CV risk for patients with RA is roughly 2-fold that for the general population and was recently found to be comparable to the risk for patients with diabetes (2,3). Surprisingly, despite a growing number of publications on the link between RA and CV disease (CVD), the exact reasons for the excess CV risk are still undetermined. Most evidence suggests that “traditional” risk factors account for only part of the excess CV risk, and other mechanisms, probably specific to or augmented in RA, are likely involved (4). Many, if not all, of these risk factors appear to affect CV health through changes in the endothelium. Indeed, in a wide range of CVDs, endothelial activation and dysfunction precedes and

initiates atherosclerosis (5) and has a prognostic value for CV events, and its correction is associated with reduced CV risk (6).

There is now ample evidence that endothelial dysfunction occurs in RA patients (7). In most studies, attention has largely been focused on macrovascular beds, a preferential site for atherosclerotic processes, and studies have mainly been performed in patients with "established" RA. Albeit of paramount importance from a therapeutic perspective, it is still unclear at what stage of the disease this abnormality develops (8–10). Less is known about microvascular function in RA, whereas microvasculature dysfunction plays an important role in the development of target organ damage in the heart, brain, and kidney as well as in the development of CV risk factors (11,12). In conditions associated with both macrovascular and microvascular endothelial dysfunction, such as diabetes (13), it has been suggested that microvascular dysfunction precedes any impairment found in the larger arteries, thereby making microcirculation a useful early marker of endothelial dysfunction in patients with high CV risk. To date, only a few studies have investigated the presence of microvascular endothelial dysfunction in RA patients, and those have led to controversial results, reporting either impaired (14–16), unchanged (8,17), or improved (18) microvascular endothelial function as compared to controls. Moreover, the time course of microvascular dysfunction is not documented in RA, and whether micro- and macrovascular dysfunctions are linked, and as such occur at the same time in the disease process, is also ill defined. This latter point is important to resolve because micro- and macrocirculation may be differently affected during RA and may have complementary roles with regard to the nosology of the cardiovascular system (19,20).

Animal models of RA provide the unique opportunity to unravel the pathophysiologic features of vascular alterations in this disease. They allow the study of micro/microvasculature in animals not receiving medications and at different stages in the disease course, including the preclinical stages. The first aim of the present study was to explore the time course of microvascular function, mechanical properties, and structure in adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats as a clinically relevant model of RA. The second aim was to determine whether microvascular endothelial dysfunction parallels macrovascular endothelial dysfunction. The third aim was to explore the link between micro/microvascular abnormalities and markers of endothelial activation/inflammation and blood pressure. For this purpose, microvascular function was studied on third-order mes-

enteric arteries that were collected on day 4 (preclinical arthritis), day 11 (very early arthritis), day 33 (severe disease), and day 90 (a time point at which the joint inflammation has resolved) after immunization. At each time point, blood pressure, plasma levels of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), and C-reactive protein (CRP) were measured, and the aorta was collected to assess macrovascular endothelial function.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** Male Lewis rats ( $n = 166$ ) were purchased from Janvier. Animals were kept on a 12-hour light/dark cycle and allowed free access to food and water. The study conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996).

**Induction and clinical evaluation of arthritis.** AIA was induced in rats by a single intradermal injection at the base of the tail of 120  $\mu$ l of 1 mg of heat-killed *Mycobacterium butyricum* (Difco) suspended in 0.1 ml of mineral oil (Freund's incomplete adjuvant) (Difco). The AIA model is characterized by rapid onset and progression of a robust and easily measurable polyarthritis, is clinically characterized by severe erythema and diffuse soft tissue swelling with complete ankyloses, paw malformations, and reduced locomotor activity, and is frequently associated with ear and tail inflammation, weight loss, anorexia, and diarrhea (21). Rats were weighed and monitored 5 days per week for clinical signs of arthritis. Arthritis was scored as follows (22): 0.1 = arthritis of 1 digit, 0.5 = weak and moderate arthritis of 1 big joint (ankle or wrist), and 1 = intense arthritis of 1 big joint. The tarsus and the ankle were considered the same joint. The sum of the joint scores in the 4 limbs gives a maximum possible arthritis score of 6 for each rat. Ankle diameter was measured with digital calipers (Vernier Stainless). A group of nonarthritic age-matched rats were used as controls and received saline at the base of the tail.

**Tissue collection and blood pressure measurements.** Rats were anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg intraperitoneally) on different days after inoculation with *Mycobacterium* or saline, corresponding to different stages of the disease (23). Day 4 represents preclinical expression of arthritis and a time point during antigen processing, day 11 represents the clinical onset of arthritis (very early arthritis) (in this group, rats were anesthetized on the day the first symptoms appeared, i.e., on day 11 in 75% of the rats and between day 12 and day 14 in 25% of the rats), day 33 corresponds to severe active disease with severe joint swelling and destruction, and day 90 represents a time point at which the disease has resolved, based on a lack of inflammation in the affected joints (24,25). Body temperature was monitored via a rectal probe and maintained at 37°C. Arterial systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured after cannulation (polyethylene tubing) of the left carotid artery and connection of the catheter to a pressure recorder system (Easy Graf Gould TA240). Blood was withdrawn from the abdominal artery, immediately centrifuged at 3,000g for 10 minutes at 4°C, and plasma was stored at -80°C until analyzed. Thoracic aorta and mesenteric arteries

were removed and immediately used for vascular reactivity studies. Ankles were removed and placed in 4% formalin until analyzed by radiography.

**Radiographic ex vivo analysis of rat ankle and foot joints.** Radiographs of the hind paws were obtained with a BMA High-Resolution Digital X-Ray (40 mV, 10 mA; D3A Medical Systems). A score of 0–20 was determined for each paw using a grading scale modified from Ackerman et al (26), as described in the Supplementary Methods, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.39065/abstract>. The maximum possible score for each rat was 40.

**Mesenteric artery function, structure, and mechanical properties.** Experiments on microvessels were conducted in third-order mesenteric arteries (~2 mm long) mounted in a pressurized myograph (Living System Instrumentation), as previously described (27,28). Endothelial function was assessed by measuring flow-induced vasodilation. Flow was increased step-wise, and arterial dilation was measured. AIA-associated endothelial dysfunction is defined as a significant reduction in flow-induced relaxation as compared to control rats. Myogenic tone was determined after increasing pressure in steps from 10 mm Hg to 150 mm Hg. The structural properties were evaluated by calculating the wall-to-lumen ratio and the cross-sectional area. The mechanical properties were assessed by calculating stress-strain relationships and the tangential elastic modulus  $\beta$ . (See Supplementary Methods, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.39065/abstract>).

**Aortic reactivity.** Experiments on macrovasculature were conducted on thoracic aorta 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 CaCl<sub>2</sub>, 1.18 mmoles/liter KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24.9 mmoles/liter NaHCO<sub>3</sub>, 1.18 mmoles/liter MgSO<sub>4</sub>, and 12 mmoles/liter glucose, pH 7.4), maintained at 37°C, and continuously aerated with 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> for isometric tension recording in organ chambers, as previously described (27). 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<sup>-6</sup> moles/liter). After a 90-minute equilibration period under a resting tension of 2 gm, rings with intact endothelium were constricted with phenylephrine (10<sup>-6</sup> moles/liter), and vasorelaxant responses to ACh (10<sup>-11</sup>–10<sup>-4</sup> moles/liter) were determined. AIA-associated aortic endothelial dysfunction was defined as a significant reduction in ACh-induced relaxation as compared to control rats. Endothelium-denuded rings were used to determine the relaxing effect of the nitric oxide donor sodium nitroprusside (SNP; 10<sup>-11</sup>–10<sup>-4</sup> moles/liter) after preconstriction with phenylephrine 10<sup>-6</sup> moles/liter.

**Plasma analysis.** CRP and peripheral markers of endothelial activation, i.e., VCAM-1 and ICAM-1, were measured in plasma by using Milliplex magnetic bead panel kits (eBioscience), which were analyzed using a Luminex MAGPIX system and Milliplex Analyst software. The limits of detection provided by the manufacturer for CRP, VCAM-1, and ICAM-1 were 2.44 pg/ml, 29.03 pg/ml, and 24.51 pg/ml, respectively.

**Statistical analysis.** Values are presented as the mean ± SEM. GraphPad Prism version 5.0 software was used for statistical analysis. We compared the overall relaxant response to increasing concentrations of ACh or to increasing

flow values between controls and AIA using repeated-measures one-way analysis of variance (ANOVA) (with “group” [AIA and controls] as source of variation and “response to ACh concentrations or to flow” as repeated-measures factor). The relationship between 2 variables was investigated using Spearman’s correlation coefficient; when one of the variables was the response to ACh, the response was evaluated from the values of maximal relaxation (Emax) to ACh that were calculated from each curve using nonlinear regression analysis; when one of the variables was the response to flow, the response was evaluated from the values of areas under the curve (AUCs) of flow-mediated dilation that were calculated from the individual curves (Emax cannot be used because these curves did not fit with the nonlinear model of “symmetrical sigmoidal shape”). The effect of AIA on radiologic scores from day 11 to day 90 was assessed by one-way ANOVA followed by Bonferroni test as post hoc test and the Bonferroni procedure to reduce Type I error. Comparison of body weights, SBP, DBP,  $\beta$  values, ICAM-1, VCAM-1, and CRP values between the AIA and control groups was assessed using unpaired Student’s *t*-test or Mann-Whitney test (when data were not normally distributed). *P* values less than 0.05 were considered significant.

## RESULTS

**Baseline characteristics.** On the day of AIA induction (day 0), the mean ± SEM body weight of the 6-week old Lewis rats included in the study was 172 ± 2 gm. As expected (21), the mean body weight was significantly lower in rats with AIA than in controls from day 4 to day 90 after immunization (Table 1). SBP and DBP did not differ significantly between rats with AIA and controls at any stage of arthritis.

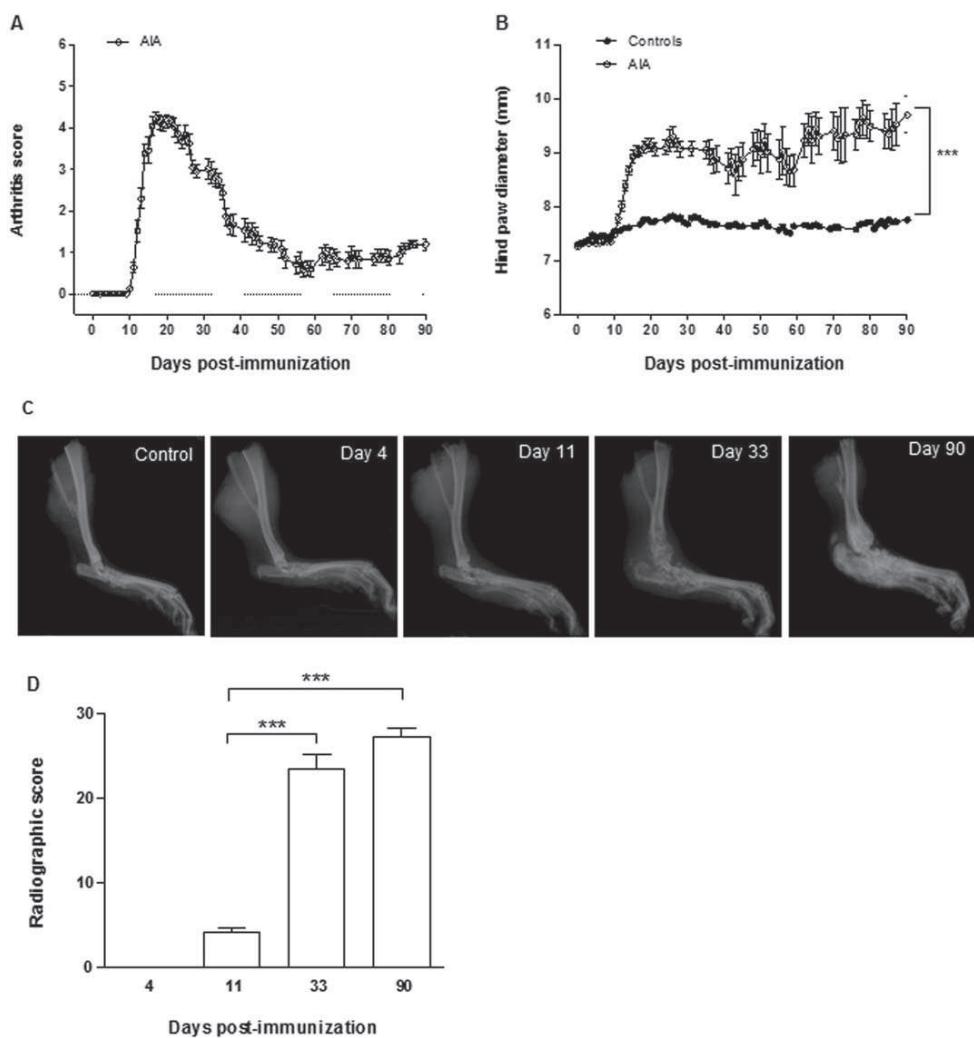
**Time course of arthritis.** On day 4 after immunization, rats with AIA were asymptomatic, and their

**Table 1.** Basic characteristics of the rats with AIA and age-matched controls\*

	Day after AIA induction			
	Day 4	Day 11	Day 33	Day 90
Body weight, gm				
Controls	200 ± 3	229 ± 3	311 ± 3	404 ± 5
Rats with AIA	186 ± 2†	183 ± 3†	212 ± 4†	309 ± 5†
SBP, mm Hg				
Controls	123 ± 3	129 ± 4	129 ± 4	132 ± 5
Rats with AIA	116 ± 3	122 ± 4	125 ± 4	129 ± 6
DBP, mm Hg				
Controls	77 ± 6	88 ± 4	90 ± 4	87 ± 4
Rats with AIA	68 ± 3	76 ± 3	80 ± 5	87 ± 6

\* Values are the mean ± SEM (*n* = 24 rats in the control group on day 4, 24 rats in the adjuvant-induced arthritis [AIA] group on day 4, 24 rats in the control group on day 11, 24 rats in the AIA group on day 11, 16 rats in the control group on day 33, 18 rats in the AIA group on day 33, 16 rats in the control group on day 90, and 20 rats in the AIA group on day 90). SBP = systolic blood pressure; DBP = diastolic blood pressure.

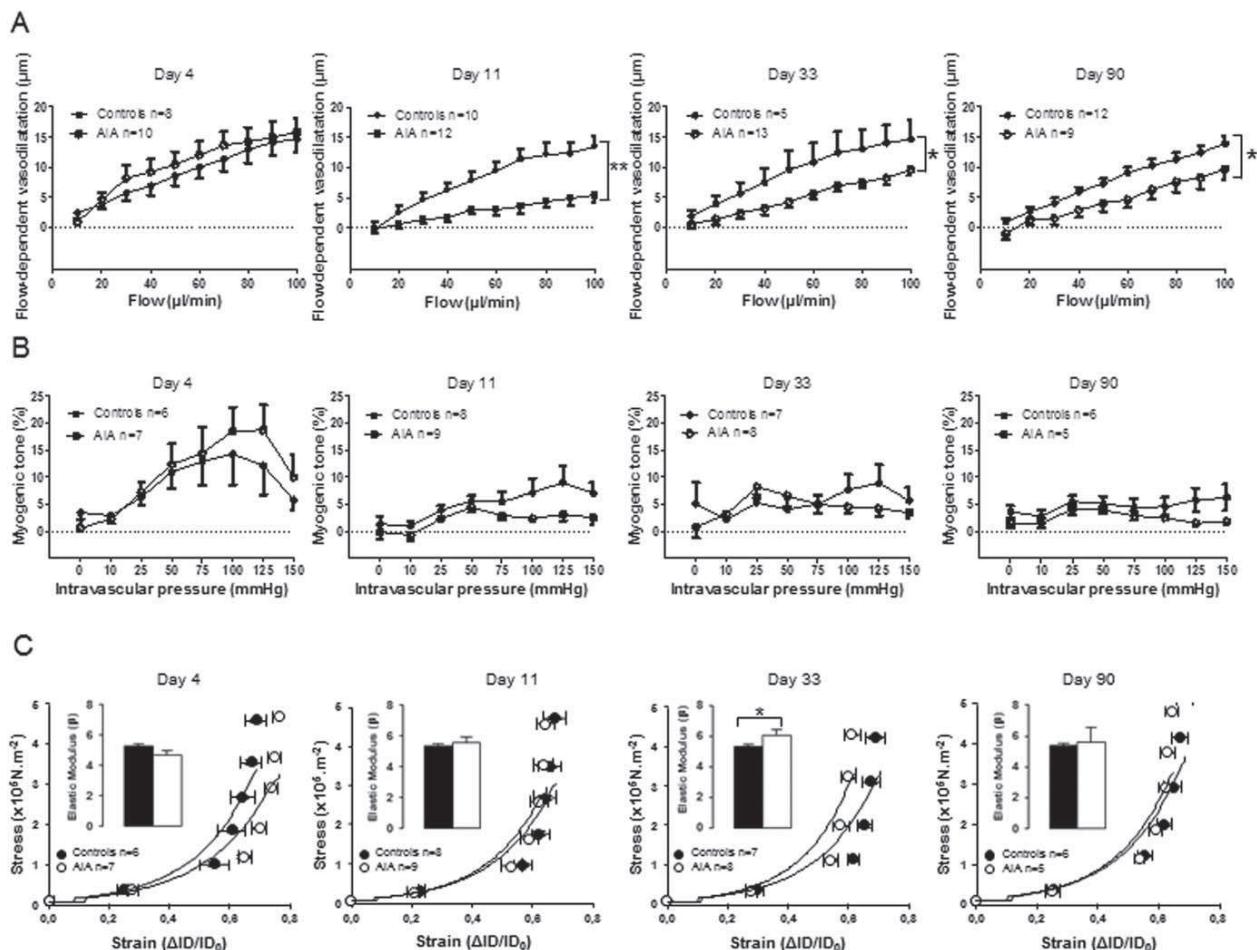
† *P* < 0.05 versus controls.



**Figure 1.** Time course of arthritis in rats with adjuvant-induced arthritis (AIA). **A** and **B**, Arthritis scores (**A**) and hind paw diameters (**B**) over time after induction of AIA. **C** and **D**, Representative hind limb radiographs (**C**) and corresponding radiographic scores (**D**) obtained at each stage of arthritis: preclinical (day 4), very early arthritis (day 11), severe disease (day 33), and chronic low-activity disease (day 90). Values are the mean  $\pm$  SEM from 80 control rats and 86 rats with AIA divided into groups of 16–24 rats per time point. \*\*\* =  $P < 0.001$ .

hind paw diameters did not differ from those of controls (Figures 1A and B). The first clinical signs of arthritis (paw edema, erythema, and stiffness) appeared between day 11 and day 14 after immunization. From day 11 on, rats with AIA experienced disease progression into a severe polyarthritis with erythema and diffuse soft swelling with complete ankylosis and paw malformations. After the period of maximal inflammation (after day 33), clinical signs of inflammation progressively disappeared, but joint malformations were still evident. As shown in Figure 1A, the arthritis score increased from day 11 until reaching a maximum

on day 17 (mean  $\pm$  SEM  $4.2 \pm 0.1$ ). Then it decreased but remained elevated until day 33 (mean  $\pm$  SEM  $2.5 \pm 0.1$ ). From day 33, it progressively decreased and plateaued around 1 from day 50 to day 90 (mean  $\pm$  SEM  $1.1 \pm 0.2$ ). The time course of change in hind paw diameter was superimposable on that of the arthritis score from day 0 to day 17 (Figure 1B). From day 17, hind paw diameters remained elevated through day 90 as a reflection of bone remodeling. The radiographs shown in Figure 1C are representative of the hind paw in arthritic groups at each stage of the disease. The rat hind limbs appeared normal on day 4. In connection

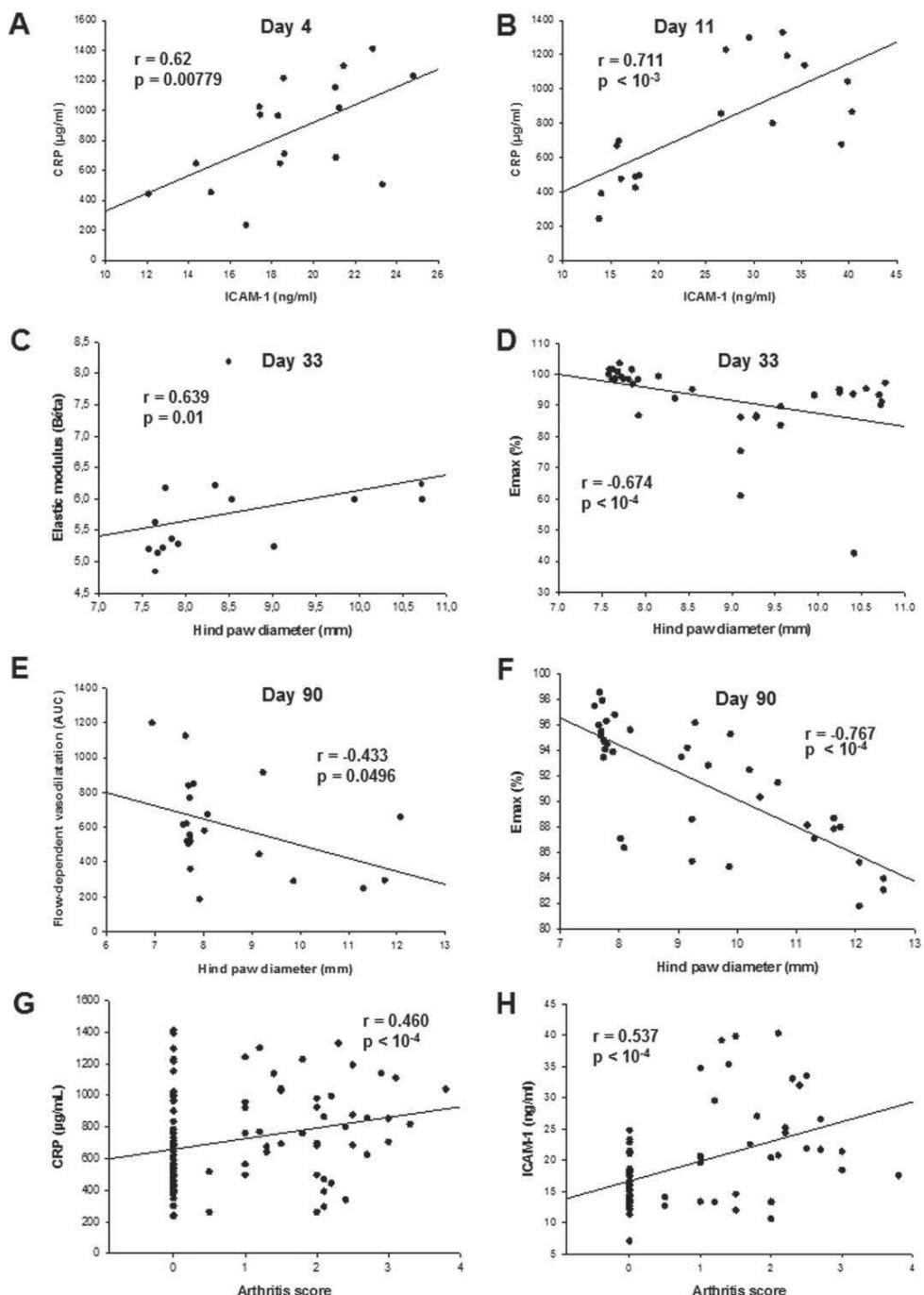


**Figure 2.** Flow-mediated dilation, myogenic tone, and mechanical properties in mesenteric arteries from rats with adjuvant-induced arthritis (AIA). **A** and **B**, Flow-mediated vasodilation (**A**) and myogenic tone (**B**) were determined in mesenteric arteries from rats with AIA and age-matched controls on days 4, 11, 33, and 90 after immunization. Values are the mean  $\pm$  SEM. The n values are the number of artery segments from 5–12 rats per group. \* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.01$ , by repeated-measures one-way analysis of variance. **C**, Stress-strain relationships were determined in mesenteric arteries from the same animals as in **A** and **B**. Values are the mean  $\pm$  SEM. The n values are the number of artery segments. \* =  $P < 0.05$  by Mann-Whitney test. ID = internal diameter.

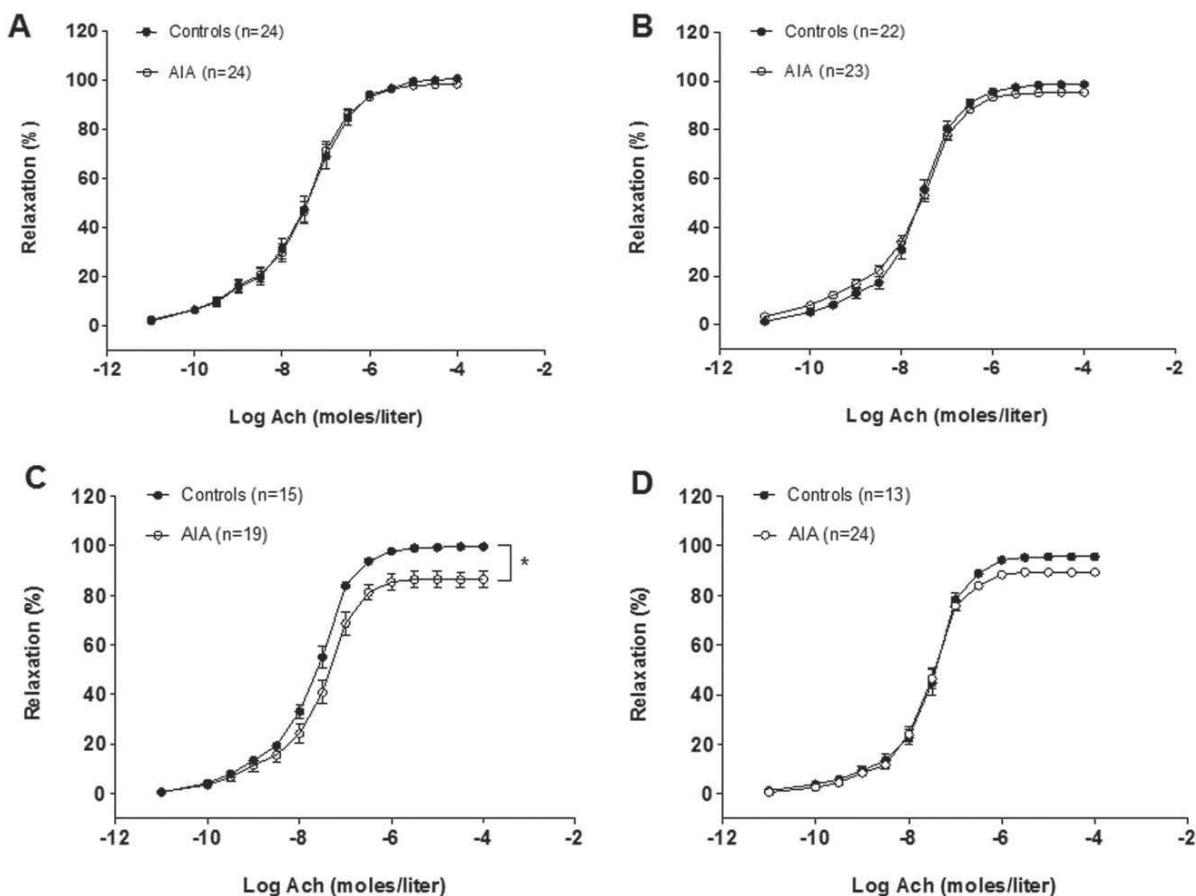
with clinical signs of AIA, soft tissue swelling was visible on day 11 and day 33. Progressive joint destruction and significant bone loss, coupled with periosteal bone formation were observed on day 33 and were more severe on day 90. Consistent with qualitative observations, radiographic scoring of the hind limbs on days 4, 11, 33, and 90 demonstrated significant time-dependent destructive joint changes in AIA (Figure 1D).

**Time course of microvascular abnormalities in AIA.** *Microvascular function.* Stepwise increases in flow induced a progressive vasodilation in vessels from control animals (Figure 2A). On day 4, flow-induced vasodilation was not modified by AIA. In contrast, as a reflection of

endothelial dysfunction, flow-induced vasodilation was significantly lower in rats with AIA compared to controls on day 11, day 33, and day 90. At this time point, flow-induced vasodilation (expressed as AUC of flow-induced vasodilation) negatively correlated with hind paw diameter ( $r = -0.433, P = 0.0496$ ) (Figure 3E), whereas no correlation was found between these 2 parameters on day 4 ( $r = -0.282, P = 0.252$ ), on day 11 ( $r = -0.378, P = 0.082$ ), or on day 33 ( $r = -0.2, P = 0.482$ ). As shown in Figure 2B, the stepwise increase in intraluminal pressure induced the development of myogenic tone, which did not differ between controls and rats with AIA at any stage of arthritis.



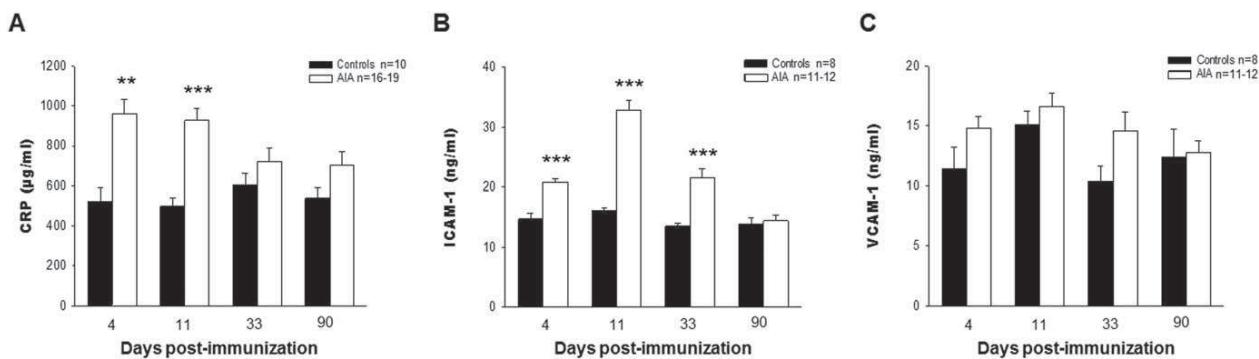
**Figure 3.** Significant correlations between parameters of vessel reactivity/structure, arthritis severity, and inflammation in rats with adjuvant-induced arthritis. **A** and **B**, Positive correlation between C-reactive protein (CRP) level and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) level on day 4 (**A**) and day 11 (**B**) after immunization. **C** and **D**, Positive correlation between the elastic modulus ( $\beta$  value; an index of mesenteric artery stiffness) and hind paw diameter (**C**) and negative correlation between the maximal relaxation (Emax) to acetylcholine (Ach) of aortic rings and hind paw diameter (**D**) on day 33 after immunization. **E** and **F**, Negative correlation between the area under the curve (AUC) of flow-mediated relaxation of mesenteric arteries and hind paw diameter (**E**) and negative correlation between the Emax of Ach to aortic rings and hind paw diameter (**F**) on day 90 after immunization. **G** and **H**, Positive correlation between CRP level and arthritis score (**G**) and positive correlation between ICAM-1 level and arthritis score (**H**) throughout the disease course (from day 4 to day 90).



**Figure 4.** Macrovascular endothelial function during the course of adjuvant-induced arthritis (AIA). Aortic rings from rats with AIA and age-matched controls were preconstricted with phenylephrine  $10^{-6}$  moles/liter. Concentration-response curves for acetylcholine (Ach) in endothelium-intact aortic rings on day 4 (**A**), day 11 (**B**), day 33 (**C**), and day 90 (**D**) after immunization are shown. Values are the mean  $\pm$  SEM. The n values are the number of aortic rings from 13–24 rats per group. \* =  $P < 0.05$ , by repeated-measures one-way analysis of variance.

**Structural and mechanical properties.** The structure of mesenteric arteries from rats with AIA assessed by wall-to-lumen ratio and cross-sectional area did not differ from that of controls at any stage of arthritis (see Supplementary Figure 1, available on the *Arthritis & Rheumatology* web site at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.39065/abstract>). With regard to mechanical properties (Figure 2C), on day 4, the stress-strain curve for rats with AIA was shifted to the right, albeit the  $\beta$  value did not differ between the 2 groups. On day 11, this difference was no longer evident. In contrast, on day 33, mesenteric arteries from rats with AIA showed increased stiffness, as demonstrated by the leftward shift of the strain-stress curve and the significantly higher  $\beta$  value. On day 90, the differences were no longer apparent. Of interest, the  $\beta$  value positively correlated with hind paw diameter only on day 33 ( $r = 0.639$ ,  $P = 0.01$ ) (Figure 3C).

**Time course of macrovascular endothelial dysfunction in AIA.** Figure 4 presents the endothelium-dependent response of aortic rings to ACh as an index of macrovascular endothelial function in controls and AIA at each stage of arthritis. As compared to controls, ACh-induced relaxation was not different in AIA at the preclinical stage (day 4) (Figure 4A) or at the very early arthritis stage (day 11) (Figure 4B). In contrast, ACh-induced relaxation was significantly decreased in AIA rats as compared to controls ( $P < 0.05$ ) on day 33 (severe disease) (Figure 4C). However, this difference was no longer evident on day 90 (Figure 4D). Of interest, a correlation was found between the vasorelaxant effects of ACh (expressed as the Emax to ACh) and hind paw diameter on day 33 ( $r = -0.674$ ,  $P < 10^{-4}$ ) (Figure 3D) and on day 90 ( $r = -0.767$ ,  $P < 10^{-4}$ ) (Figure 3F). It is noteworthy that no correlation was found between microvascular endothelial function



**Figure 5.** Plasma levels of C-reactive protein (CRP) (A), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (B), and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) (C) measured on days 4, 11, 33, and 90 after immunization in rats with adjuvant-induced arthritis (AIA) and age-matched controls. Values are the mean  $\pm$  SEM (n = 8–19 rats per group). \*\* =  $P < 0.01$ ; \*\*\* =  $P < 0.001$ , versus controls.

assessed by AUC of flow-induced vasodilation and macrovascular endothelial function assessed by the Emax to ACh throughout the disease ( $r = 0.180$ ,  $P = 0.229$ ). SNP-induced vasodilation did not differ between rats with AIA and controls at any stage of arthritis (data not shown).

**Plasma levels of CRP and markers of endothelial activation.** As shown in Figure 5A, CRP levels were significantly higher in rats with AIA than in controls on day 4 (99% higher;  $P < 0.01$ ) and on day 11 (80% higher;  $P < 0.001$ ), whereas no difference was measured thereafter. Compared to controls, rats with AIA exhibited increased levels of ICAM-1 on day 4 (41% higher;  $P < 0.001$ ), on day 11 (104% higher;  $P < 0.001$ ), and on day 33 (60% higher;  $P < 0.001$ ), but not on day 90 (Figure 5B). VCAM-1 levels did not differ between the 2 groups at any stage of arthritis (Figure 5C). ICAM-1 levels correlated positively with CRP levels on day 4 ( $r = 0.62$ ,  $P = 0.00779$ ) (Figure 3A) and on day 11 ( $r = 0.711$ ,  $P < 10^{-3}$ ) (Figure 3B) but not thereafter. CRP levels positively correlated with the arthritis score ( $r = 0.460$ ,  $P < 10^{-4}$ ) (Figure 3G), and ICAM-1 levels positively correlated with the arthritis score ( $r = 0.537$ ,  $P < 10^{-4}$ ) (Figure 3H) throughout the disease course. No correlation was found between microvascular endothelial function (AUC of flow-induced vasodilation) and CRP ( $r = -0.247$ ,  $P = 0.0718$ ), VCAM-1 ( $r = 0.0329$ ,  $P = 0.843$ ), or ICAM-1 levels ( $r = -0.274$ ,  $P = 0.1$ ). Likewise, there was no correlation between macrovascular endothelial function (Emax to ACh) and CRP ( $r = -0.167$ ,  $P = 0.139$ ), VCAM-1 ( $r = -0.0824$ ,  $P = 0.926$ ), or ICAM-1 ( $r = -0.0824$ ,  $P = 0.537$ ) levels.

## DISCUSSION

Using rats with AIA, the present study investigated, for the first time, the effect of arthritis on micro-

vascular reactivity, structure, and mechanics as well as the potential value of clinically used markers of endothelial function to reflect microvascular abnormalities. It also explored to what extent arthritis differentially affects the micro- and macrovasculature. The seminal findings are 1) that microvascular endothelial dysfunction occurs in very early arthritis and persists throughout the course of the disease, 2) that the course of microvascular endothelial dysfunction does not mirror that of macrovascular endothelial dysfunction and microvascular stiffness, and 3) that plasma levels of ICAM-1, VCAM-1, and CRP are not reliable markers of endothelial dysfunction whatever the vascular bed.

A large body of evidence indicates that CVD is the biggest contributor to the increased mortality observed in RA (1). Because endothelial dysfunction is an early step in atherogenesis, it is of paramount importance to determine its time course in RA in order to define the windows of opportunity for the treatment of endothelial dysfunction. In many diseases associated with both macrovascular and microvascular endothelial dysfunction, such as diabetes (13), the kinetics of endothelial dysfunction differ between micro- and macrovasculature, thus emphasizing the need to characterize endothelial dysfunction in different vascular beds. Crucially, the endothelial dysfunction observed in the present study cannot involve blood pressure-dependent mechanisms, since no difference in blood pressure levels was observed between rats with AIA and controls at any stage of the disease. In conduit arteries, our results demonstrated that endothelial dysfunction was absent at the preclinical stage and during very early AIA but became evident at the time of acute clinical inflammation (day 33). These data are consistent with previous results obtained in animal models of RA (29,30) and in RA patients (7,17,31).

An original aspect of our study was the investigation of endothelial function in a late stage of the AIA model (day 90) when clinical and biologic (CRP levels) inflammation has resolved. At this time point, rats with AIA exhibited severe joint damage associated with periosteal new bone formation. Because bony formation is not a classic hallmark of RA, but rather, of diseases such as spondyloarthritis or Reiter's syndrome, these data suggest that the AIA model in its late phase combines features from spondyloarthropathies with those of RA. With regard to endothelial function, an important finding is that macrovascular endothelial function was no longer different from that in controls in the late phase of AIA, suggesting that endothelial dysfunction in macrovascular beds is spontaneously reversible in AIA. An additional finding is that AIA led to an early and long-lasting microvascular endothelial dysfunction, as evidenced by impaired flow-mediated dilation of mesenteric arteries from the very early stage (day 11) to the late stage (day 90) of AIA. Thus, the time course of microvascular function is disconnected from that of the macrovasculature in AIA.

A few studies have investigated the relationship between micro- and macrovascular endothelial dysfunction in RA patients. Some reported no association (18,32), whereas another did find an association (33). A limitation of these clinical studies was that antirheumatic as well as cardiovascular medications may be confounding factors in the evaluation of endothelial function. Our data obtained in rats with AIA without pharmacologic intervention demonstrated that micro- and macrovascular endothelial function were not correlated in arthritis. Evidence of a territorial differential impact of arthritis on the vasculature indicates that endothelial dysfunction is governed by distinct mechanisms according to the vascular bed.

From a clinical perspective, this evidence suggests that an overall evaluation of endothelial function in RA would require the study of different vascular beds. Since the late stage of AIA was concomitant with a reduction in clinical inflammation, the reversibility of macrovascular endothelial dysfunction, but not microvascular endothelial dysfunction, strongly suggests that macrovascular function is more dependent on clinical inflammation than microvascular function. From a therapeutic perspective, it indicates that macrovascular endothelial dysfunction would be more sensitive to treatments reducing disease activity than microvascular endothelial dysfunction. Consistent with this hypothesis are studies of RA patients showing that the improvement in macrovascular endothelial function was related to the reduction in disease activ-

ity after treatment with biologic agents (34–36). Likewise, our findings are consistent with a study showing the presence of microvascular endothelial dysfunction in patients with longstanding RA with low levels of disease activity (37), and with studies reporting that treatment with anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  induced only a transient improvement but did not fully reverse microvascular endothelial dysfunction despite efficient control of disease activity (38,39).

From a diagnostic perspective, our data showing that microvascular endothelial dysfunction occurs earlier than macrovascular endothelial dysfunction supports the evaluation of microvascular endothelial function as an early diagnostic indicator of CV risk in RA patients. Of interest, a recent study of a cohort of 1,574 apparently healthy men demonstrated that the measure of microvascular endothelial function by hyperemic brachial artery velocity, but not macrovascular endothelial function, by flow-mediated dilation was predictive of future CV events (40). In light of our results in AIA, it appears that further studies are now needed to address whether the early measurement of microvascular function would be predictive of future CV events in RA patients, to identify which noninvasive method (hyperemic velocity, peripheral arterial tonometry, or cutaneous laser Doppler flowmetry, for instance) would be most appropriate for this early assessment, and to determine whether the adequate treatment of micro- or macrovascular endothelial dysfunction would be beneficial for the prevention of CV morbidity/mortality in RA.

The present study also demonstrated a lack of remodeling of the microvasculature from the preclinical to the chronic stage of RA, while microvascular stiffness was observed on day 33. Since recognized stimuli for microvessel remodeling include hypertension (41,42) and endothelial dysfunction (43), from our results showing that blood pressure did not differ between control rats and rats with AIA, it is tempting to conclude that endothelial dysfunction per se is not sufficient to induce microvascular remodeling during arthritis. Moreover, consistent with data obtained in RA patients (44,45), enhanced microvascular stiffness in AIA was unrelated to endothelial dysfunction but was linked to inflammation. Of note, we showed that *functional* microvascular abnormalities predate *mechanical* impairments in the course of arthritis. This suggests that the measurement of small artery elasticity should not be used as a surrogate marker of microvascular endothelial dysfunction, at least in the early stages of RA. Overall data suggest that mechanical and functional abnormalities are likely governed by distinct mechanisms. Our data extend the

findings of previous studies in RA patients showing that pioglitazone reduced RA activity, systemic inflammation, and small artery stiffness, but not endothelial dysfunction (46), and that micro/macrovacular endothelial function and arterial stiffness were not related (20).

Because the assessment of endothelial function cannot easily be performed in the routine clinical setting, there is a need to identify surrogate circulating biomarkers of endothelial function in RA patients. To date, no consensus exists and no marker has yet been incorporated in major CV risk prediction tools in RA. Circulating markers of endothelial function include various products that can be released when the endothelium is activated, including soluble adhesion molecules (47).

In various CVDs, increased plasma levels of ICAM-1 and VCAM-1 are accepted as markers of endothelial dysfunction (47). In our study, ICAM-1 levels were elevated from the preclinical to the severe inflammatory phase of the disease. This result might reflect an endothelial *activation* that precedes endothelial *dysfunction* in arthritis. However, our data showed that ICAM-1 levels, like CRP levels, correlated with arthritis severity but not with endothelial function whatever the vascular bed. Therefore, ICAM-1 cannot be considered a reliable marker of endothelial function in arthritis, but rather, as a marker of disease severity. Because ICAM-1 can be up-regulated both in endothelial cells and in leukocytes (48), we can hypothesize that the source of circulating ICAM-1 is likely leukocytes, which are recruited and activated in the early phase of the disease (49), rather than endothelial cells. It is also noteworthy that plasma CRP levels did not correlate with endothelial function whatever the vascular bed. This result does not support the idea of a direct link between systemic inflammation and endothelial dysfunction, but suggests a complex interplay between these two parameters that needs to be unraveled in future studies.

In conclusion, this study is the first to characterize microvascular abnormalities in a rat model of arthritis. Our results suggest that the measurement of microvascular endothelial function, microvascular arterial stiffness, and macrovascular function cannot be used interchangeably for vascular health assessment in RA. They emphasize the relevance of measuring microvascular endothelial function as an early diagnostic indicator of CVD in RA patients. This point is of particular importance since, to date, neither specific CV risk scores (50) nor circulating markers has been validated for indicator CV risk assessment in RA patients. They encourage performing experimental studies to unravel the distinct mechanisms involved in micro- and macrovascu-

lar endothelial dysfunction, in order to design drugs that would specifically target each dysfunction.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr. C. Cachia for help with statistical analysis of the data.

## 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.** Totoson, Maguin-Gaté, Prati, Wendling, Demougeot.

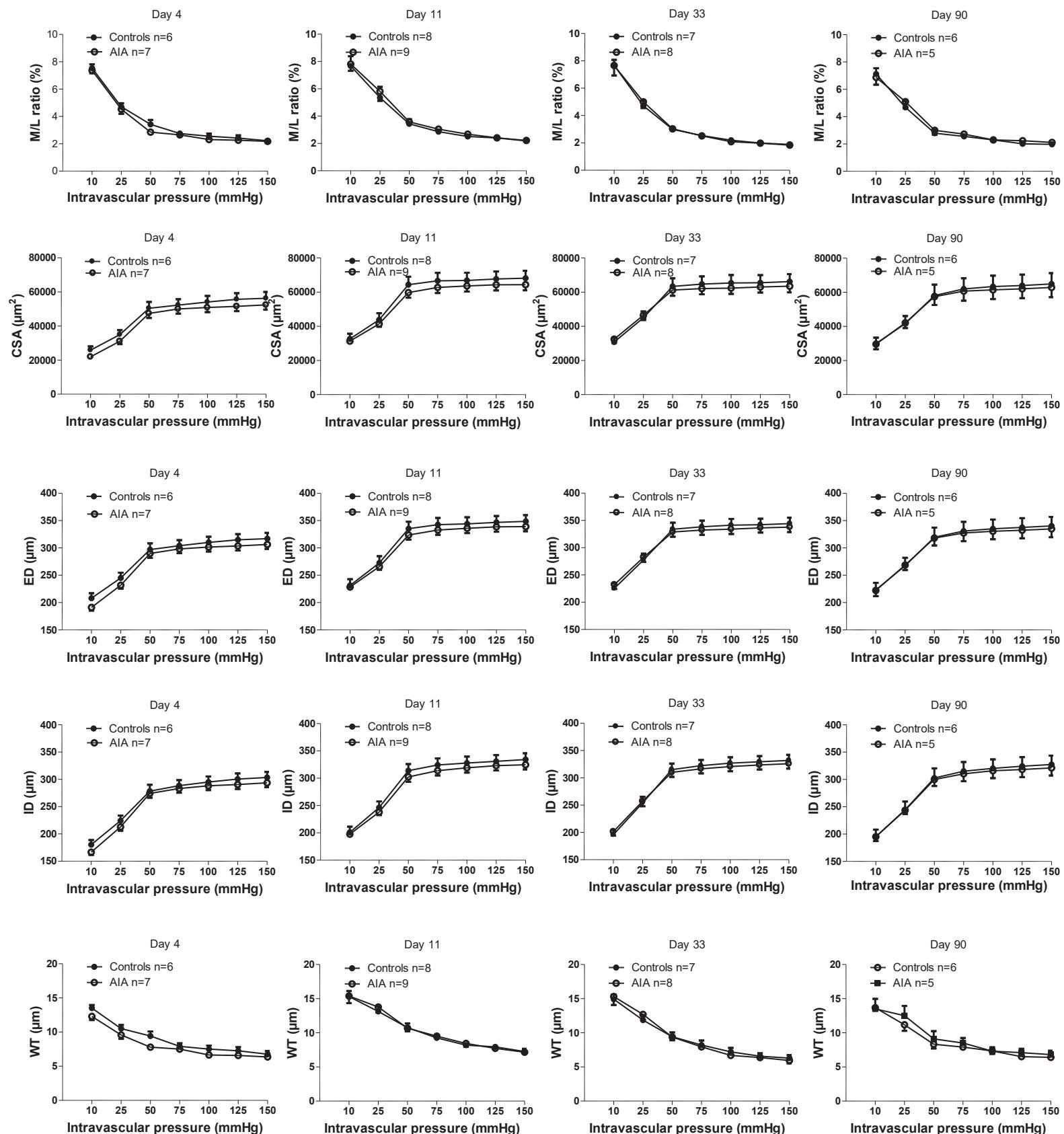
**Acquisition of data.** Totoson, Maguin-Gaté, Nappey.

**Analysis and interpretation of data.** Totoson, Maguin-Gaté, Demougeot.

## REFERENCES

- Avina-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum* 2008;59:1690–7.
- 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.
- Stamatopoulos KS, Kitas GD, Papamichael CM, Chryssohoou E, Kyrokou K, Georgopoulos G, et al. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis versus diabetes: a comparative study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(10):1702–8.
- Dessein PH, Joffe BI, Veller MG, Stevens BA, Tobias M, Reddi K, et al. Traditional and nontraditional cardiovascular risk factors are associated with atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005;32:435–42.
- Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr* 2012;23:222–31.
- Martin BJ, Anderson TJ. Risk prediction in cardiovascular disease: the prognostic significance of endothelial dysfunction. *Can J Cardiol* 2009;25:15A–20A.
- 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;50:2125–39.
- Foster W, Lip GY, Raza K, Carruthers D, Blann AD. An observational study of endothelial function in early arthritis. *Eur J Clin Invest* 2012;42:510–6.
- Kerola AM, Kauppi MJ, Kerola T, Nieminen TV. How early in the course of rheumatoid arthritis does the excess cardiovascular risk appear? *Ann Rheum Dis* 2012;71:1606–15.
- Van den Oever IA, van Sijl AM, Nurmohamed MT. Management of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: evidence and expert opinion. *Ther Adv Musculoskeletal Dis* 2013;5:166–81.
- Serne EH, de Jongh RT, Eringa EC, IJzerman RG, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome. *Hypertension* 2007;50:204–11.
- Struijker-Boudier HA, Rosei AE, Bruneval P, Camici PG, Christ F, Henrion D, et al. Evaluation of the microcirculation in hypertension and cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2007;28:2834–40.

13. Krentz AJ, Clough G, Byrne CD. Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: pathophysiology and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab* 2007;9:781–91.
14. Yki-Jarvinen H, Bergholm R, Leirisalo-Repo M. Increased inflammatory activity parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in vivo in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:630–4.
15. Datta D, Ferrell WR, Sturrock RD, Jadhav ST, Sattar N. Inflammatory suppression rapidly attenuates microvascular dysfunction in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2007;192:391–5.
16. Maki-Petaja KM, Cherian 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.
17. Van Eijk IC, Serne EH, Dijkmans BA, Smulders Y, Nurmohtamed M. Microvascular function is preserved in newly diagnosed rheumatoid arthritis and low systemic inflammatory activity. *Clin Rheumatol* 2011;30:8:1113–8.
18. Arosio E, De Marchi S, Rigoni A, Prior M, Delva P, Lechi A. Forearm haemodynamics, arterial stiffness and microcirculatory reactivity in rheumatoid arthritis. *J Hypertens* 2007;25:1273–8.
19. Ganz P, Vita JA. Testing endothelial vasoconstrictor function: nitric oxide, a multipotent molecule. *Circulation* 2003;108:2049–53.
20. Sandoo A, Hodson J, Douglas KM, Smith JP, Kitas GD. The association between functional and morphological assessments of endothelial function in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R107.
21. Oliver SJ, Brahn E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. *J Rheumatol Suppl* 1996;44:56–60.
22. 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.
23. Bolon B, Stolina M, King C, Middleton S, Gasser J, Zack D, et al. Rodent preclinical models for developing novel anti-arthritis molecules: comparative biology and preferred methods for evaluating efficacy. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:569068.
24. Carter JL, Lubahn C, Lorton D, Osredkar T, Der TC, Schaller J, et al. Adjuvant-induced arthritis induces c-Fos chronically in neurons in the hippocampus. *J Neuroimmunol* 2011;230:85–94.
25. Szekanecz Z, Halloran MM, Volin MV, Woods JM, Strieter RM, Haines GK III, et al. Temporal expression of inflammatory cytokines and chemokines in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1266–77.
26. Ackerman NR, Rooks WH II, Shott L, Genant H, Maloney P, West E. Effects of naproxen on connective tissue changes in the adjuvant arthritic rat. *Arthritis Rheum* 1979;22:1365–74.
27. Bagnost T, Berthelot A, Bouhaddi M, Laurant P, Andre C, Guillaume Y, et al. Treatment with the arginase inhibitor N<sup>ω</sup>-hydroxy-nor-L-arginine improves vascular function and lowers blood pressure in adult spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 2008;26:1110–8.
28. Bagnost T, Ma L, da Silva RF, Rezakhaniha R, Houdayer C, Stergiopoulos N, et al. Cardiovascular effects of arginase inhibition in spontaneously hypertensive rats with fully developed hypertension. *Cardiovasc Res* 2010;87:569–77.
29. Totolon P, Maguin-Gate K, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Mechanisms of endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R22.
30. Reynolds SI, Williams AS, Williams H, Smale S, Stephenson HJ, Amos N, et al. Contractile, but not endothelial, dysfunction in early inflammatory arthritis: a possible role for matrix metalloproteinase-9. *Br J Pharmacol* 2012;167:505–14.
31. Sodergren A, Karp K, Boman K, Eriksson C, Lundstrom E, Smedby T, et al. Atherosclerosis in early rheumatoid arthritis: very early endothelial activation and rapid progression of intima media thickness. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R158.
32. 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;13:R99.
33. Foster W, Carruthers D, Lip GY, Blann AD. Inflammation and microvascular and macrovascular endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: effect of treatment. *J Thromb Thrombolysis* 2010;29:437–42.
34. Hurlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, et al. Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2002;106:2184–7.
35. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Sanchez-Andrade A, Garcia-Porrúa C, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Short-term adalimumab therapy improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis refractory to infliximab. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24:309–12.
36. Sidirooulos PI, Siakka P, Pagonidis K, Raptopoulou A, Kritikos H, Tsetis D, et al. Sustained improvement of vascular endothelial function during anti-TNF $\alpha$  treatment in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol* 2009;38:6–10.
37. Hansel S, Lassig G, Pistorius F, Passauer J. Endothelial dysfunction in young patients with long-term rheumatoid arthritis and low disease activity. *Atherosclerosis* 2003;170:177–80.
38. 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;14:R117.
39. Komai N, Morita Y, Sakuta T, Kuwabara A, Kashihara N. Anti-tumor necrosis factor therapy increases serum adiponectin levels with the improvement of endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2007;17:385–90.
40. Anderson TJ, Charbonneau F, Title LM, Buitenhuis J, Rose MS, Conradson H, et al. Microvascular function predicts cardiovascular events in primary prevention: long-term results from the Firefighters and Their Endothelium (FATE) study. *Circulation* 2011;123:163–9.
41. Quinn U, Tomlinson LA, Cockcroft JR. Arterial stiffness. *JRSM Cardiovasc Dis* 2012;1:cvd.2012.012024.
42. Rizzoni D, Rose EA. Small artery remodeling in diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;19:587–92.
43. Marti CN, Gheorghiade M, Kalogeropoulos AP, Georgiopoulos VV, Quyyumi AA, Butler J. Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1455–69.
44. Wong M, Toh L, Wilson A, Rowley K, Karschimkus C, Prior D, et al. Reduced arterial elasticity in rheumatoid arthritis and the relationship to vascular disease risk factors and inflammation. *Arthritis Rheum* 2003;48:81–9.
45. Hinkema HJ, Nienhuis HL, de Groot L, Smit AJ, van Roon AM, Bijl M, et al. Is small artery elasticity decreased prior to intima-media thickening in patients with longstanding rheumatoid arthritis? *J Rheumatol* 2011;38:2133–40.
46. Ormseth MJ, Oeser AM, Cunningham A, Bian A, Shintani A, Solus J, et al. Reversing vascular dysfunction in rheumatoid arthritis: improved augmentation index but not endothelial function with peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist therapy. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:2331–8.
47. Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2006;368:33–47.
48. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;170:191–203.
49. Szekanecz Z, Halloran MM, Volin MV, Woods JM, Strieter RM, Haines GK III, et al. Temporal expression of inflammatory cytokines and chemokines in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1266–77.
50. Crowson CS, Matteson EL, Roger VL, Therneau TM, Gabriel SE. Usefulness of risk scores to estimate the risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Am J Cardiol* 2012;110:420–4.



**2<sup>ème</sup> étude :**  
**Mécanismes impliqués dans la DE macrovasculaire :**  
**cinétique et lien avec les cytokines pro-inflammatoires**

\*\*\*\*\*

Publication soumise à *Plos One*, septembre 2015 (FI 3.534)

Totoson P, Maguin-Gaté K, Nappey M, Prati C, Wendling D, Demougeot C.

**Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis:  
Mechanistic Insights and Link with Systemic Inflammation**

\*\*\*\*\*



## I. Contexte et objectifs

Dans l'étude précédente, les résultats obtenus sur les anneaux aortiques des rats AIA ont confirmé les données de la littérature attestant l'existence d'une DE au stade d'inflammation clinique maximale du modèle c'est-à-dire entre 24 et 35 jours après immunisation<sup>332, 339-343</sup>. Nos résultats ont montré pour la première fois que cette DE macrovasculaire n'est pas détectable au stade précoce de l'arthrite (premiers symptômes), alors qu'une DE est déjà détectable au niveau microvasculaire mésentérique. Ceci laisse penser qu'une certaine plasticité de l'endothélium aortique pourrait exister dans les stades précoce de l'arthrite, à l'origine de phénomènes de compensations permettant de retarder l'apparition de la DE dans ce lit vasculaire. Par ailleurs, nous avons montré que la régression de l'inflammation clinique (stade chronique de l'AIA, J90) s'accompagnait d'une normalisation de la fonction endothéliale aortique. Ces données sont en faveur d'un lien entre la DE macrovasculaire et l'inflammation. Au stade chronique, l'étude précédente a regroupé les données globales des rats AIA. Cependant, l'analyse détaillée de ce groupe d'animaux montre qu'en dépit d'un score arthritique homogène et faible puisque l'inflammation clinique a régressé, une partie des rats (soit 45%) présentaient toujours une DE, alors que 55% d'entre eux avaient une fonction endothéliale normale. Il semble donc, qu'à l'instar de ce qui est observé dans certaines études cliniques qui rapportent la présence d'une DE macrovasculaire même quand l'activité de la PR est considérée comme faible<sup>99, 161, 221</sup>, la réduction de l'arthrite sur le plan clinique ne suffit pas forcément à faire régresser la DE.

Dans cette étude, nous avons voulu comprendre la cinétique qui gouverne la dérégulation des principales voies de signalisation endothéliale impliquées dans la DE aortique dans le modèle AIA. Compte tenu des données de la littérature disponibles dans ce modèle, nous nous sommes particulièrement intéressés à la voie des NOS, COX-2 et des anions superoxydes. Afin d'éclaircir le lien qui relie DE et inflammation, nous avons dosé différentes cytokines / chimiokines impliquées dans la physiopathologie de l'arthrite et rechercher leur lien avec la fonction endothéliale.

## II. Méthodologie

Cette étude est une partie ancillaire de la première étude. Aussi, les expériences ont été réalisées sur les mêmes rats que ceux présentés précédemment.

- Le rôle de chaque facteur endothérial, à chaque stade de l'arthrite (J4, J11, J33 et J90) a été étudié sur le modèle d'anneaux aortiques isolés précontractés à la Phénylephrine et relaxés par des concentrations croissantes et cumulatives d'acétylcholine en présence d'inhibiteur spécifique de la NOS (NG-nitro-L-arginine methyl ester , L-NAME  $10^{-4}$  M), inhibiteur de la COX-2 (NS398,  $10^{-5}$  M), un analogue de la superoxyde dismutase (Tempol,  $10^{-4}$  M).

- La réponse vasoconstrictrice à la noradrénaline a également été évaluée à chaque stade de l'arthrite sur des anneaux d'aorte désendothélialisés de façon à évaluer la fonction contractile des CML.
- Les taux de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ ), de cytokines anti-inflammatoires (IL-4 and IL-10), de chimiokines (MCP-1 et MIP-1 $\alpha$ ) et d'un marqueur osseux l'ostéoprotégérine (OPG) ont été dosés au niveau plasmatique, par méthode multiplex.

### **III. Principaux résultats**

Cette étude a permis de montrer que :

- ❖ Dès les premiers symptômes de l'arthrite, alors qu'il n'y a pas de DE au niveau aortique, des altérations du phénotype endothérial sont déjà présentes (augmentation de l'activité de la COX-2 et surproduction d'anions superoxydes) mais sont compensées par une suractivité de la NOS.
- ❖ Au stade tardif J90, les rats qui présentent une DE sont ceux qui ont un déséquilibre endothérial entre la voie de la NOS et de la COX-2, et qui ont également des taux plasmatiques de TNF- $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  les plus élevés.
- ❖ Les taux circulants d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et de MIP-1 $\alpha$  sont corrélés négativement à la fonction endothéiale (tous stades de l'AIA confondus).
- ❖ L'anomalie aortique la plus précoce au décours de l'arthrite n'est pas une anomalie endothéiale mais une altération de la réponse du muscle lisse vasculaire à la noradrénaline.

**Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis:  
Mechanistic Insights and Link with Systemic Inflammation**

Perle Totoson<sup>a</sup>, PharmD, Katy Maguin-Gaté<sup>a</sup>, PhD, Maude Nappey<sup>a</sup>, Daniel Wendling<sup>b, c</sup>, MD,  
PhD, Céline Demougeot, PharmD, PhD<sup>a, #</sup>

<sup>a</sup> EA 4267 FDE, FHU INCREASE, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25030 Besançon, France

<sup>b</sup> Service de Rhumatologie, CHRU Besançon, France

<sup>c</sup> EA 4266, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25030 Besançon, France

**Running title:** *Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis*

**# Corresponding author:**

Prof. Céline DEMOUGEOT

EA 4267 « Fonctions et Dysfonctions Epithéliales »

UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 19 rue Ambroise Paré, bâtiment S, 25030  
BESANCON cedex, FRANCE.

Tel: (33) 3 63 08 23 25, Fax: (33) 3 81 66 56 91

E-mail address: [cdemouge@univ-fcomte.fr](mailto:cdemouge@univ-fcomte.fr)

**Key words:** rheumatoid arthritis – endothelial dysfunction – cytokines – chemokines - rat

**Total number of figure and tables:** 8 figures, 1 table.

1    **Abstract**

2    *Objectives:* To determine mechanisms involved in endothelial dysfunction (ED) during the  
3    course of arthritis and to investigate the link between cytokines, chemokines and  
4    osteoprotegerin.

5    *Approach and Results:* Experiments were conducted on aortic rings at day 4 (preclinical), day  
6    11 (onset of disease), day 33 (acute disease) and day 90 (chronic disease) after adjuvant-  
7    induced arthritis (AIA) in Lewis rats. At day 4, the unique vascular abnormality was a  
8    reduced norepinephrine-induced constriction. At day 11, endothelial function assessed by the  
9    relaxation to acetylcholine was normal despite increased cyclo-oxygenase-2 activity (COX-2)  
10   and overproduction of superoxide anions that was compensated by increased nitric oxide  
11   synthase (NOS) activity. At day 33, ED apparition coincides with the normalization of NOS  
12   activity. At day 90, ED was only observed in rats with a persisting imbalance between  
13   endothelial NOS and COX-2 pathways and higher plasma levels of IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ . Plasma  
14   levels of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  negatively correlated with Ach-induced relaxation  
15   throughout the course of AIA.

16   *Conclusions:* Our data identified increased endothelial NOS activity as an important  
17   compensatory response that opposes the ED in the early arthritis. Thereafter, a cross-talk  
18   between COX-2/NOS and IL-1 $\beta$ /TNF $\alpha$  appears as an important element for the occurrence of  
19   ED. Our results suggest that IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  are potential biomarkers of ED in  
20   arthritis.

21

22

23

24

25

26     **Introduction**

27       Rheumatoid arthritis (RA) is the most common systemic autoimmune disease resulting in  
28       excessive cardiovascular (CV) events and mortality [1]. The CV risk is roughly 2-fold that of  
29       the general population and was recently found to be comparable to the risk in diabetes [2].  
30       Increased incidence of CV mortality is mainly the consequence of accelerated atherogenesis  
31       which is secondary to endothelial dysfunction (ED) [3], a vascular abnormality present in RA  
32       patients [4]. Therefore the understanding of mechanisms involved in ED as well as their time-  
33       course in RA is an important challenge for designing the adequate therapeutic strategy to  
34       reduce CV risk. A few animal studies provided mechanistic data on ED using the widely-used  
35       model of adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats. Our systematic literature review reported  
36       increased cyclo-oxygenase-2 (COX-2) activity, overproduction of superoxide anions ( $O_2^-$ )  
37       and nitric oxide synthase (NOS) uncoupling as seminal mechanisms involved in ED, at least  
38       in the acute inflammatory phase of AIA [5]. Recently, we reported that ED was absent in the  
39       early symptomatic stages of the disease but became detectable at the time of maximal  
40       inflammation in AIA [6]. However, ED is not a dichotomous parameter (“present” or “not  
41       present”) and develops over a long period of time. Thus the time at which changes in  
42       endothelial phenotype appear during the course of arthritis is not known whereas its  
43       knowledge may help to identify the “window of opportunity” for CV risk prevention in RA.  
44       In addition, whether these phenotypes changes persist when disease activity decreased is  
45       unknown.

46

47       ED is considered as the consequence of a combination of elements including genetic  
48       predisposition, traditional CV risk factors and systemic inflammation [7]. This latter factor is  
49       suspected to be a pivotal contributor of ED in RA because pro-inflammatory mediators such  
50       as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , that might putatively modify endothelial phenotype, are produced by the

51 inflamed synovium and released into circulation [8]. The above pro-inflammatory factors up-  
52 regulate the expression of adhesion molecules by endothelial cells and stimulated the release  
53 of chemokines. Therefore it is striking that in RA the contribution of systemic mediators of  
54 inflammation to ED is not yet elucidated [9-11]. Likewise whether such circulating indices of  
55 systemic inflammation could be used as biomarkers of ED is not demonstrated.

56

57 The first aim of this study was to investigate the mechanisms of ED from the preclinical  
58 to the late stages of the disease in the model of adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats with  
59 an emphasis on the role of NOS, COX-2 and O<sub>2</sub><sup>-</sup>. The second aim was to explore the potential  
60 value of various circulating cytokines/chemokines to reflect ED.

61

## 62 **Material and methods**

### 63 **Animals**

64 Six-week-old male Lewis rats (n=160) were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle,  
65 France). Animals were kept under a 12h-12h light: dark cycle and allowed free access to food  
66 and water. This work is the extended study for our previous report [6] and all experimental  
67 procedures were approved by the local committee for ethics in animal experimentation n°  
68 2012/001-CD) of Franche-Comté University (Besançon, France), and complied with the  
69 Guide for the Care and Use of Laboratory Animal published by the US National Institutes of  
70 Health (NIH publication No. 85-23, revised 2011).

71

### 72 **Induction and clinical evaluation of the arthritis model**

73 As previously described [6], adjuvant arthritis was induced by a single intradermal injection at  
74 the tail of Lewis rats, of 120 µL of 1 mg of heat-killed *Mycobacterium butyricum* (Difco,  
75 Detroit, MI) suspended in 0.1 ml of mineral oil (Freund's incomplete adjuvant (Difco,

76 Detroit, MI)). A group of saline-infused non-arthritic rats was used as controls. Rats were  
77 weighed and monitored 5 days per week for clinical signs of arthritis. The scoring system was  
78 employed as follows [12]: arthritis of one finger scores 0.1, weak and moderate arthritis of  
79 one big joint (ankle or wrist) scores 0.5 and, intense arthritis of one big joint scores 1. Tarsus  
80 and ankle were considered as the same joint. Sum of joints scores of 4 limbs leads to an  
81 arthritic score of maximum 6 to each rat. Rats were anaesthetized with pentobarbital (60  
82 mg/kg, i.p.) at different days after inoculation with *Mycobacterium* or saline corresponding to  
83 different stages of the disease [13]: *day 4* that represents the preclinical expression of arthritis  
84 and a time during antigen processing; *day 11* that represents the clinical onset of arthritis  
85 (very early arthritis); *day 33* corresponding to severe active disease with severe joint swelling  
86 and destruction associated to macrovascular ED; *day 90* that represents a time point at which  
87 the disease has been resolved, based on a lack of inflammation in the affected joints. Blood  
88 was withdrawn from the abdominal artery, immediately centrifuged at 3000g for 10 min at  
89 4°C, and plasma was stored at -80°C until analysis. Thoracic aorta were removed and  
90 immediately used for vascular reactivity studies.

91

## 92 **Radiographical ex-vivo analysis of joints of ankle and foot**

93 Radiographs of hind paws were performed at each stage of arthritis with a BMA High  
94 Resolution Digital X Ray (40mV, 10mA) – D3A Medical Systems (France). A score of 0 to  
95 20 was determined for each paw using a grading scale modified from Ackerman et al. (1979)  
96 [14]. This score used the scale: 0 (normal), 1 (slight), 2 (mild), 3 (moderate), and 4 (severe)  
97 abnormalities in the tissue for each of 5 characteristic features of AIA. Radiographs takes into  
98 account: (a) the soft tissue swelling, (b) the osteoporosis as measured by bone density, (c) the  
99 loss of cartilage shown by narrowing of the joint spaces; (d) the bone erosions and (e) the

100 heterotopic ossification defined as proliferation of new bone tissue. The maximum score for  
101 each rat is 40.

102

103 **Vascular reactivity**

104 At each time of arthritis course, thoracic aorta was excised, cleaned of connective tissue, and  
105 cut into rings of approximately 2 mm in length. Rings were suspended in Krebs solution  
106 (NaCl 118 mmoles/liter, KCl 4.65 mmoles/liter, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mmoles/liter, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18  
107 mmoles/liter, NaHCO<sub>3</sub> 24.9 mmoles/liter, MgSO<sub>4</sub> 1.18 mmoles/liter, glucose 12 mmoles/liter,  
108 pH 7.4), maintained at 37°C and continuously aerated with 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, for isometric  
109 tension recording in organs chambers, as previously described<sup>14</sup>. In some rings, endothelium  
110 was mechanically removed. The completeness of endothelial denudation was confirmed by  
111 the absence of relaxation to the endothelium-dependent agonist acetylcholine (ACh, 10<sup>-6</sup>  
112 moles/liter). After a 90-min-equilibration period under a resting tension of 2g, endothelium-  
113 denuded rings were used to determine the vasoconstrictive response to norepinephrine (NE,  
114 10<sup>-11</sup>-10<sup>-4</sup> moles/liter). In parallel, rings with intact endothelium were constricted with Ach  
115 (10<sup>-11</sup>-10<sup>-4</sup> moles/liter). The results regarding the effect of Ach-induced relaxation in AIA and  
116 controls have been presented elsewhere [6]. To dissect the mechanisms involved in  
117 endothelial response to Ach, rings were incubated for 30-min either with the non-selective  
118 NO synthase inhibitor N<sub>ω</sub>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10<sup>-4</sup> moles/liter), the  
119 selective COX-2 inhibitor (NS398, 10<sup>-5</sup> moles/liter), and the superoxide dismutase mimetic  
120 (SOD) Tempol (10<sup>-4</sup> moles/liter). Contractile responses to NE were calculated as the  
121 percentage of the maximum response to KCl 100 mmoles/liter, and vasorelaxant responses to  
122 Ach were calculated as the percentage of relaxation of the contractile response to PE 10<sup>-6</sup>  
123 moles/liter.  
124

125

126 **Plasma measurements**

127 Plasma levels of pro-inflammatory cytokines (interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and Tumor Necrosis  
128 Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), anti-inflammatory cytokines (interleukin 4 (IL-4) and interleukin 10 (IL-  
129 10)), monocyte/macrophage chemokines (Macrophage Inflammatory Protein (MIP-1 $\alpha$ ),  
130 Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1)) and osteoprotegerin (OPG) were measured by  
131 using Milliplex magnetic bead panel kits (eBioscience, Vienne, Austria) that were analyzed  
132 using a Luminex MAGPIX system (Luminex Corporation; Houston, TX) and Milliplex  
133 Analyst software (Millipore; St. Charles, MO). The limits of detection provided by the  
134 manufacturer for IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-10, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 and OPG were (pg/mL) 13,  
135 3.78, 0.82, 8.59, 2.32, 18 and 1 respectively.

136

137 **Data and Statistical analysis**

138 Values are presented as means  $\pm$  SEM. Data were analyzed using GraphPad Prism software  
139 (version 5.0). The overall relaxant response to ACh and the constrictive response to NE were  
140 characterized by the area under the curve (AUCs) calculated from the individual  
141 concentration-response curves. Concentration-responses to ACh in the presence or not of a  
142 specific inhibitor were compared by 2-way analysis of variance (ANOVA) for repeated  
143 measures. To better understand the effect of L-NAME in AIA as compared to control rats, the  
144 results were expressed as the percentage of reduction of AUCs between curves of Ach  
145 without and with L-NAME. Comparison of two values between AIA and controls was  
146 assessed by using unpaired Student *t* test or Mann-Whitney test when data were not normally  
147 distributed. Analysis of the relationship between two parameters was determined by linear  
148 regression analysis and Spearman's correlation coefficient was calculated between these  
149 variables. P<0.05 was considered statistically significant.

150

151 **Results**

152 **Time-course of clinical and radiographic parameters in AIA rats**

153 Consistent with our earlier study [6], the first clinical signs of arthritis (paw edema, erythema,  
154 stiffness) appeared between day 11 and day 14 after immunization. From day 11 onwards, the  
155 severity of arthritis increased until day 33. After the period of acute clinical inflammation,  
156 clinical signs of inflammation spontaneously regressed but joint malformations are still  
157 evident. Consistent with the progression of bone damage in AIA, radiographic score  
158 progressively increased from day 4 to day 90. The means arthritis scores and radiographic  
159 score at different phases of AIA are presented in Table 1.

160

161 **Profile of plasma cytokines, chemokines and OPG levels during AIA**

162 Data are presented in Table 1. Except IL-4 levels that were not changed by AIA, all  
163 cytokines/chemokines increased during AIA but with a different profile. As compared to  
164 controls, IL-10 levels increased in AIA at day 4 and day 11 but not thereafter. MCP-1 levels  
165 were increased in AIA from day 4 to day 33 but not at day 90. IL-1 $\beta$  levels were higher in  
166 AIA from day 11 to day 90. The increase in TNF $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  levels occurred later, at day 33  
167 and day 90. OPG was significantly elevated at day 11 but not at the other times.

168

169 **Vasoconstrictive response to NE in AIA**

170 Before investigating endothelial function and related pathways, we checked whether  
171 differences exist regarding the response of vascular smooth muscle cells (VSMCs) to  
172 norepinephrine. As shown in Figure 1, AIA exhibited reduced constrictive response to NE at  
173 day 4 post-immunization ( $p<0.01$ ) but not thereafter.

174

175 **Endothelial NOS, COX-2 and superoxide anion pathways during the course of AIA**

176 To determine at which time of the arthritis course abnormalities in endothelial pathways  
177 appear, the effects of the NOS inhibitor L-NAME, the COX-2 inhibitor NS-398 and the SOD  
178 mimetic Tempol were studied in Ach-relaxed rings from AIA and controls rats.

179

180 At day 4, Ach-induced relaxation was not impaired [6] (Fig 2A). Neither NS-398 nor Tempol  
181 modified Ach-induced relaxation in controls or in AIA thus indicating a lack of deleterious  
182 COX-2 activity and O<sub>2</sub><sup>-</sup> production at this time (Fig 2C-D). L-NAME significantly blunted  
183 Ach-associated relaxation in both groups, to the same extent (% reduction of AUC: 69 ± 10 vs  
184 70 ± 2 in controls, NS) (Fig 2B). This indicates no difference in NOS activity between  
185 groups.

186

187 At day 11 (Fig 3A), endothelial function was normal in AIA rats [6]. However, as a reflection  
188 of enhanced NOS activity in AIA, the reduction of AUC of Ach induced by L-NAME was  
189 significantly greater in AIA (80 ± 4%) than in controls (61 ± 8%, p<0.05, Fig 2B). Of interest,  
190 NS-398 (Fig 3C) and Tempol (Fig 3D) slightly but significantly improved Ach-induced  
191 vasodilation in AIA but not in controls. These data revealed that abnormal overactivation of  
192 COX-2 associated with O<sub>2</sub><sup>-</sup> production was initially compensated by increased NOS activity.

193

194 At day 33, an impaired response to Ach was observed in AIA [6] (Fig 4A). The dysfunctions  
195 regarding COX-2 and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in AIA observed at day 11 were still evident (Fig 4C-D) but, as  
196 shown in Fig 4B, NOS activity is no longer increased in AIA as attested by the lack of  
197 difference in the effect of L-NAME between AIA and controls (% reduction of AUC: 80 ± 4  
198 in AIA vs 72 ± 5 in controls, NS).

199

200 At day 90, the overall response of AIA to Ach was not different from controls [6] (Fig 5A).  
201 However, the detailed analysis of individual data revealed that two populations of AIA  
202 emerged on the basis of their response to Ach. One group (55% of rats, “without ED”) did not  
203 exhibit impaired response to Ach (Fig 5B), whereas another group (45% of rats, “with ED”)  
204 had depressed response to Ach ( $p<0.001$ , Fig 5C). Of interest, differences in cytokines levels  
205 were found between these 2 groups of rats at day 90. As compared to the AIA group without  
206 ED, the AIA group with ED had higher levels of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (Fig 5D,  $p<0.05$ ) whereas  
207 no difference was found for the other cytokines or chemokines (Fig 6). By contrast, arthritis  
208 (Fig 5E) and radiographic scores (Fig 5F) did not differ between these two populations. As  
209 shown in Fig 7A, in AIA “with ED”, the effect of L-NAME was not different from controls  
210 (% reduction of AUC:  $72 \pm 4$  vs  $75 \pm 5$  in controls, NS) whereas its effect was greater in AIA  
211 “without ED” compared to controls, thus reflecting enhanced NOS activity in this latter group  
212 (% reduction of AUC:  $84 \pm 4$  vs  $75 \pm 5$  in controls,  $p<0.05$ ). Likewise, a difference in COX-2  
213 activity was observed between AIA “with ED” and “without ED”. In the former, NS-398 still  
214 improved the vasorelaxant effect of Ach as a reflection of persisting deleterious COX-2  
215 activity whereas this inhibitor was devoid of impact on Ach-relaxation in the latter (Fig 7B).  
216 By contrast, Tempol did not modify the effect of Ach whatever the group (Fig 7C). Above  
217 results suggest that the presence of ED in AIA rats at the late phase of arthritis did not rely on  
218 O<sub>2</sub><sup>-</sup> overproduction but on the persisting imbalance between NOS and COX-2 endothelial  
219 pathways.

220

## 221 **Correlations between endothelial function and cytokines/chemokines/OPG plasma levels**

222 To determine whether levels of mediators of inflammation are linked to ED, we investigated  
223 the correlations between Ach-induced relaxations (expressed as AUCs) from day 4 to day 90  
224 and the corresponding levels of cytokines/chemokines (Table 1). The results showed that

225 plasma levels of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  negatively correlated with Ach-induced relaxation  
226 (Fig 8). By contrast, no correlation was found between endothelial function and levels of IL-4  
227 ( $r=-0.0561$ ,  $p=0.953$ ), IL-10 ( $r=0.0937$ ,  $p=0.441$ ), MCP-1 ( $r=0.199$ ,  $p=0.0966$ ) and OPG  
228 ( $r=0.169$ ,  $p=0.124$ ).

229

230 **Discussion**

231 The seminal findings of our study in AIA are that 1) increased NOS activity is an  
232 important compensatory response that opposes the ED in the early phase of the disease, 2)  
233 plasma levels of IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  correlate with endothelial function throughout the  
234 course of AIA, 3) impaired response of smooth muscle to vasoconstriction precedes the  
235 alterations of endothelial phenotype.

236

237 The understanding of the pathogenesis of ED in RA is a prerequisite to propose an  
238 adequate therapeutic strategy for CV risk prevention. Previous analysis of the literature  
239 identified increased COX-2 activity, O $_2^-$  overproduction and NOS decoupling as seminal  
240 mechanisms involved in ED at the acute phase of arthritis [5]. The new findings are that these  
241 pathways are also altered in the very early phase of AIA as well as in the late phase after  
242 resolution of inflammatory symptoms. Our study demonstrated that despite the lack of  
243 detectable ED at the onset of clinical symptoms, the deleterious O $_2^-$  production and COX-2  
244 activity are initially compensated by increased vascular NOS activity thereby opposing ED.  
245 These findings can be related to those of a clinical study in which the basal forearm blood  
246 flow was measured in newly diagnosed RA patients in the presence or not of a NOS inhibitor  
247 [16]. The authors found a greater inhibition of blood flow by the NOS inhibitor in RA patients  
248 than in controls, which is consistent with a compensatory NOS activation in this early stage of  
249 RA. It is striking that this considerable endothelial plasticity is not specific to RA since the

250 same compensatory NOS upregulation exists in the early phase of models of hypertension  
251 [17] or diabetes [18]. These suggest that common mechanisms are involved in such  
252 compensation. As  $O_2^-$  has been involved in NOS pathway upregulation [17] and is  
253 overproduced in hypertension or diabetes [19], its excessive production at the onset of AIA  
254 might contribute to the high NOS activity. However, our results at day 90 showed that  
255 increased NOS activity occurs without impaired  $O_2^-$  production, so this mechanism is likely  
256 of minor importance. Whatever the mechanisms involved in NOS upregulation, overall data  
257 identify NOS is a pivotal target for the early CV risk prevention in RA, and encourage the use  
258 of therapy aiming to increase NOS activity such as arginase inhibition or L-arginine  
259 supplementation.

260

261 The occurrence of ED at the acute inflammatory phase of arthritis (day 33) coincides  
262 with loss of NOS compensation and enhancement of COX-2/ $O_2^-$  impairments. Given the  
263 recognized cross-talk between COX-2 and NOS pathways [20, 21], decreased NOS activity  
264 might result from COX-2 overactivity but in turn itself enhance COX-2 activity in a vicious  
265 circle. TNF- $\alpha$  might also contribute to the loss of NOS compensation. Indeed, at this time of  
266 arthritis, plasma IL-1 $\beta$  and MCP-1 levels are elevated in AIA like at day 11, but additionally  
267 TNF- $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  increased. Whilst both TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  have been reported to acutely  
268 induce ED [22, 23], only TNF- $\alpha$  was reported to decrease endothelial NOS expression [24].  
269 The major role of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , the two dominant mediators of immune-mediated joint  
270 disease in RA patients and experimental animals [25], in arthritis-associated ED is further  
271 supported by the results obtained at day 90. At this time, the rats exhibiting ED are those with  
272 the highest IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels. Consistent with a link between pro-inflammatory  
273 cytokines levels and endothelial phenotype alterations, the same group of rats exhibited  
274 persistent COX-2 activity and low NOS activity. Notably, the two populations of rats at day

275 90, with and without ED, had no significant differences in disease severity and joint damage,  
276 suggesting that the levels of systemic pro-inflammatory cytokines are more predictive of ED  
277 than the severity of the disease. Consistent with this, a recent study reported that changes in  
278 disease activity (DAS28 score) did not correlate with endothelial function in RA patients [26].  
279 At the light of our results, it appears that further research is required to elucidate whether  
280 these cytokines/chemokines are causally involved in ED or act solely as biomarkers.

281

282 At present, efforts to characterize endothelial function by measuring soluble plasma  
283 biomarkers in RA patients have been largely unsuccessful. Strikingly, albeit a role for  
284 inflammation in arthritis-induced ED is highly suspected, reports on the association between  
285 systemic inflammation and ED in RA patients are inconsistent. A positive relationship  
286 between circulating markers of inflammation and ED was reported by some authors [27-29]  
287 whereas others showed no associations both in early [30] and long-term RA [11]. In the  
288 present study, we demonstrated that plasma levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  correlated with ED  
289 throughout the arthritis course. Of interest plasma levels of MIP-1 $\alpha$  also correlated with ED.  
290 MIP-1 $\alpha$  is a chemotactic factor for monocytes and T lymphocytes mainly secreted by  
291 synoviocytes in RA [31]. To the best of our knowledge, while high MIP-1 $\alpha$  levels have been  
292 reported in RA patients [31], its potential role on ED has never been explored and warrants  
293 further investigation. Our data revealed that plasma levels of MCP-1 did not correlate with  
294 ED, in agreement with the findings of Södergen [27] in RA patients. These data are not  
295 consistent with a recent study conducted in collagen-induced arthritis in mice (mCIA) [32] in  
296 which an inverse correlation between serum MCP-1 levels and Ach-induced vasodilation was  
297 found. However, the study was performed only at the time of maximal clinical inflammation  
298 and whether MCP-1 levels reflected ED during the whole course of mCIA was not  
299 investigated. Emerging data highlighted OPG as a new promising biomarker of ED in various

300 diseases [33, 34]. This protein of utmost importance for bone remodelling is expressed in  
301 other tissues including vessels [35]. In our study, no association was found between OPG and  
302 endothelial function in AIA. A few studies in RA patients reported an association between  
303 high plasma OPG levels and indices of carotid atherosclerosis [36, 37]. Our results encourage  
304 performing further studies to investigate the link between OPG levels and endothelial *function*  
305 in RA.

306

307 The present study demonstrated that modifications of endothelial phenotype occur at the  
308 first clinical symptoms of arthritis. However, a few clinical studies demonstrated that  
309 increased CV risk precedes RA onset [38, 39]. In our study, the unique detectable vascular  
310 dysfunction at the preclinical stage was a depressed contractile response to NE. As this  
311 finding was obtained in endothelium-denuded rings, the problem relies on VSMCs and not on  
312 endothelial cells. Our result obtained in AIA rats resonates with the recent finding of  
313 Reynolds et al [40] showing impaired contractile response to serotonin in the very early stage  
314 of development of mCIA that was, like in our study, unrelated to endothelial function. We  
315 added the new information that this contractile dysfunction is only transient during the course  
316 of arthritis. At present it is difficult to speculate on the underlying mechanisms. A role of pro-  
317 inflammatory cytokines can be discarded because TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels are not elevated at  
318 this time of arthritis. From a clinical perspective, our data give arguments to focus interest on  
319 the vascular contractile response for an early diagnostic of vascular dysfunction in RA, using  
320 for instance “low-flow mediated constriction” (L-FMC), a new technique introduced to assess  
321 in humans the conduit artery constrictor response to decreased flow [41].

322

323 In conclusion, the present study in AIA rats provided new insights in the mechanisms  
324 of ED in RA, and showed that a dysregulation of vasodilator and vasoconstrictor responses

325 occurs with a distinct time course in RA progression. From a diagnostic perspective, they  
326 identified plasma IL-1 $\beta$ , TNF-  $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  as promising biomarkers of ED in RA. From a  
327 therapeutic perspective, they emphasized a seminal role for the cross-talk between NOS and  
328 COX-2 in RA-associated ED that encourage investigating the potential of new drugs such as  
329 NO-releasing NSAIDs [42] to decrease CV risk in RA.

330

331

332 **References**

- 333 1. del Rincón ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of  
334 cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac  
335 risk factors. *Arthritis Rheum.* 2001;44: 2737-45.
- 336 2. Stamatelopoulos KS, Kitas GD, Papamichael CM, Chryssohoou E, Kyrkou K,  
337 Georgopoulos G, et al. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis versus diabetes: a  
338 comparative study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;2910: 1702-1708.
- 339 3. Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of  
340 atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr.* 2012;23: 222-231.
- 341 4. Prati C, Demougeot C, Guillot X, Godfrin-Valnet M, Wendling D. Endothelial dysfunction  
342 in joint disease. *Joint Bone Spine.* 2014;81: 386-91.
- 343 5. Totoson P, Maguin-Gaté K, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Mechanisms of  
344 endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies. *Arthritis Res  
345 Ther.* 2014;16: R22.
- 346 6. Totoson P, Maguin-Gaté K, Nappey M, Prati C, Wendling D, Demougeot C.  
347 Microvascular Abnormalities in Adjuvant-Induced Arthritis: Relationship with  
348 Macrovascular Endothelial Function and Markers of Endothelial Activation. *Arthritis  
349 Rheumatol.* 2015;67: 1203-1213.

- 350 7. van Breukelen-van der Stoep DF, Klop B, van Zeven D, Hazes JM, Castro Cabezas M.  
351      Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: how to lower the risk? Atherosclerosis.  
352      2013;231: 163-72.
- 353 8. Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining how “high-grade” systemic  
354      inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. Circulation. 2003;108:  
355      2957–2963.
- 356 9. Mason JC, Libby P. Cardiovascular disease in patients with chronic inflammation:  
357      mechanisms underlying premature cardiovascular events in rheumatologic conditions. Eur  
358      Heart J. 2015;36: 482-489.
- 359 10. Klimek E, Skalska A, Kwaśny-Krochin B, Surdacki A, Sulicka J, Korkosz M, et al.  
360      Differential associations of inflammatory and endothelial biomarkers with disease activity  
361      in rheumatoid arthritis of short duration. Mediators Inflamm. 2014;2014: 681635.
- 362 11. Sandoo A, Kitas GD, Carroll D, Veldhuijzen van Zanten JJ. The role of inflammation and  
363      cardiovascular disease risk on microvascular and macrovascular endothelial function in  
364      patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional and longitudinal study. Arthritis Res  
365      Ther. 2012;14: R117.
- 366 12. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Altered  
367      thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis  
368      in mice. Nature. 2003;426: 454-60.
- 369 13. Carter JL, Lubahn C, Lorton D, Osredkar T, Der TC, Schaller J, et al. Adjuvant-induced  
370      arthritis induces c-Fos chronically in neurons in the hippocampus. J Neuroimmunol.  
371      2011;230: 85-94.
- 372 14. Ackerman NR, Rooks WH 2<sup>nd</sup>, Shott L, Genant H, Maloney P, West E. Effects of  
373      naproxen on connective tissue changes in the adjuvant arthritic rat. Arthritis Rheum. 1979;  
374      22: 1365–1374.

- 375 15. Bagnost T, Berthelot A, Bouhaddi M, Laurant P, André C, Guillaume Y, et al. Treatment  
376 with the arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine improves vascular function  
377 and lowers blood pressure in adult spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens.* 2008;26:  
378 1110-1118.
- 379 16. Yki-Järvinen H, Bergholm R, Leirisalo-Repo M. Increased inflammatory activity  
380 parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in  
381 vivo in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62: 630-4.
- 382 17. Vaziri ND, Ding Y, Ni Z. Compensatory up-regulation of nitric-oxide synthase isoforms  
383 in lead-induced hypertension: reversal by a superoxide dismutase-mimetic drug. *J  
384 Pharmacol Exp Ther.* 2001;298: 679-85.
- 385 18. Joshi A, Woodman OL. Increased nitric oxide activity compensates for increased  
386 oxidative stress to maintain endothelial function in rat aorta in early type 1 diabetes.  
387 *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012;385: 1083-94.
- 388 19. Cohen RA, Tong X. Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and  
389 diabetic vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;55: 308-16
- 390 20. Clancy R, Varenika B, Huang W, Ballou L, Attur M, Amin AR, et al. Nitric oxide  
391 synthase/COX cross-talk: nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived  
392 prostaglandin production. *J Immunol.* 2000;165: 1582-1587.
- 393 21. Hink U, Münz T. COX-2, another important player in the nitric oxide-endothelin cross-  
394 talk: good news for COX-2 inhibitors? *Circ Res.* 2006;98: 1344-1346
- 395 22. Jiménez-Altayó F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salaices M, Vila E. Increased  
396 superoxide anion production by interleukin-1beta impairs nitric oxide-mediated relaxation  
397 in resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 316:42-52

- 398 23. Wimalasundera R, Fexby S, Regan L, Thom SA, Hughes AD. Effect of tumour necrosis  
399 factor-alpha and interleukin 1beta on endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric  
400 resistance arteries in vitro. *Br J Pharmacol.* 2003;138: 1285-94.
- 401 24. Anderson HD, Rahmutula D, Gardner DG. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Inhibits Endothelial  
402 Nitric-oxide Synthase Gene Promoter Activity in Bovine Aortic Endothelial Cells. *J Biol  
403 Chem.* 2004;279: 963-9.
- 404 25. Stolina M, Bolon B, Middleton S, Dwyer D, Brown H, Duryea D, et al. The evolving  
405 systemic and local biomarker milieu at different stages of disease progression in rat  
406 adjuvant-induced arthritis. *J Clin Immunol.* 2009;29: 158-74.
- 407 26. de Groot L, Jager NA, Westra J, Smit AJ, Kallenberg CG, Posthumus MD, et al. Does  
408 reduction of disease activity improve early markers of cardiovascular disease in newly  
409 diagnosed rheumatoid arthritis patients? *Rheumatology (Oxford).* 2015;54: 1257-61.
- 410 27. Södergren A, Karp K, Boman K, Eriksson C, Lundström E, Smedby T, et al.  
411 Atherosclerosis in early rheumatoid arthritis: very early endothelial activation and rapid  
412 progression of intima media thickness. *Arthritis Res Ther.* 2010;12: R158.
- 413 28. Del Rincón I, Williams K, Stern MP, Freeman GL, O'Leary DH, Escalante A.  
414 Association between carotid atherosclerosis and markers of inflammation in rheumatoid  
415 arthritis patients and healthy subjects. *Arthritis Rheum.* 2003;48: 1833-40.
- 416 29. Dessein PH, Joffe BI, Singh S. Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular  
417 risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7: R634-  
418 43.
- 419 30. Foster W, Lip GY, Raza K, Carruthers D, Blann AD. An observational study of  
420 endothelial function in early arthritis. *Eur J Clin Invest.* 2012;42: 510-516.
- 421 31. Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S. Molecular aspects of rheumatoid  
422 arthritis: chemokines in the joints of patients. *FEBS J.* 2008;275: 4448-55.

- 423 32. He M, Liang X, He L, Wen W, Zhao S, Wen L, et al. Endothelial dysfunction in  
424 rheumatoid arthritis: the role of monocyte chemotactic protein-1-induced protein.  
425 Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33: 1384-91.
- 426 33. Wang HH, Xiang GD. Changes of plasma concentration of osteoprotegerin and its  
427 association with endothelial dysfunction before and after hypouricemic therapy in patients  
428 with hyperuricemia. Mod Rheumatol. 2015;25: 123-7
- 429 34. Pepene CE, Ilie IR, Marian I, Duncea I. Circulating osteoprotegerin and soluble receptor  
430 activator of nuclear factor κB ligand in polycystic ovary syndrome: relationships to insulin  
431 resistance and endothelial dysfunction. Eur J Endocrinol. 2011;164: 61-8.
- 432 35. Montagnana M, Lippi G, Danese E, Guidi GC. The role of osteoprotegerin in  
433 cardiovascular disease. Ann Med. 2013;45: 254-64.
- 434 36. López-Mejias R, Ubilla B, Genre F, Corrales A, Hernández JL, Ferraz-Amaro I, et al.  
435 Osteoprotegerin concentrations relate independently to established cardiovascular disease  
436 in rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2015;42: 39-45.
- 437 37. Dessein PH, López-Mejias R, González-Juanatey C, Genre F, Miranda-Filloy JA, Llorca  
438 J, et al. Independent relationship of osteoprotegerin concentrations with endothelial  
439 activation and carotid atherosclerosis in patients with severe rheumatoid arthritis. J  
440 Rheumatol. 2014;41: 429-36.
- 441 38. van Halm VP, Nielen MM, Nurmohamed MT, van Schaardenburg D, Reesink HW,  
442 Voskuyl AE, et al. Lipids and inflammation: serial measurements of the lipid profile of  
443 blood donors who later developed rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2007;66: 184-8.
- 444 39. Maradit-Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, et al.  
445 Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a  
446 population-based cohort study. Arthritis Rheum. 2005;52: 402-11.

- 447 40. Reynolds SI, Williams AS, Williams H, Smale S, Stephenson HJ, Amos N, et al.  
448 Contractile, but not endothelial, dysfunction in early inflammatory arthritis: a possible role  
449 for matrix metalloproteinase-9. *Br J Pharmacol.* 2012;167: 505-14.
- 450 41. Gori T, Parker JD, Münzel T. Flow-mediated constriction: further insight into a new  
451 measure of vascular function. *Eur Heart J.* 2011;32: 784-7.
- 452 42. Koç And E, Küçükgüzel SG. Medicinal chemistry and anti-inflammatory activity of  
453 nitric oxide-releasing NSAID drugs. *Mini Rev Med Chem.* 2009;9: 611-9.
- 454
- 455
- 456
- 457
- 458
- 459
- 460
- 461
- 462
- 463
- 464
- 465
- 466
- 467
- 468
- 469
- 470
- 471

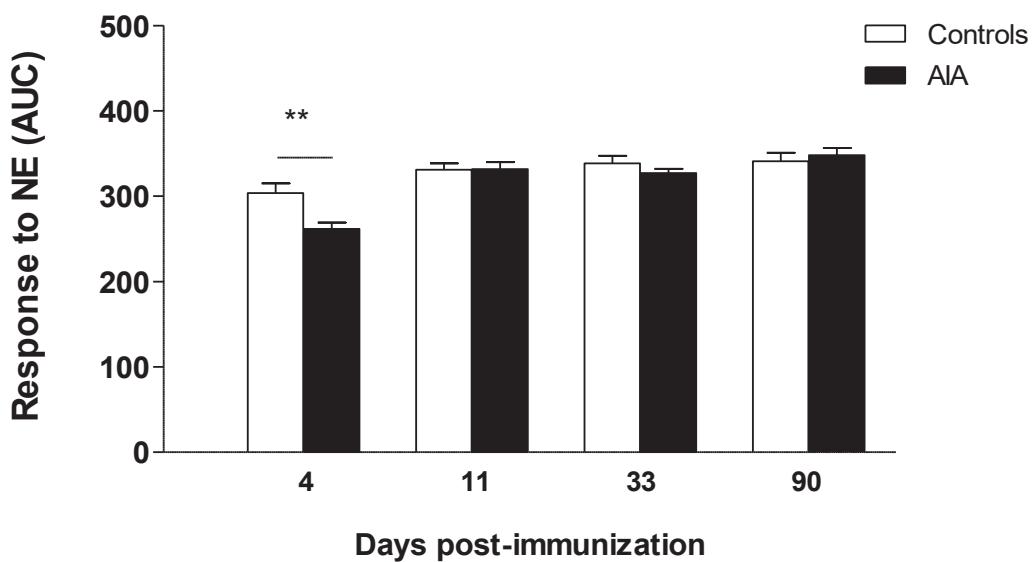
472 **Table 1. Clinical, radiological characteristics and cytokines/chemokines levels.**

473

		Day post-immunization			
		4	11	33	90
Arthritis score	AIA	0	1.9 ± 0.1	2.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2
Radiographic score	AIA	0.8 ± 0.5	3.1 ± 0.6	21.6 ± 2.1	21.9 ± 0.7
IL-1β	Controls	23.3 ± 4.3	15.8 ± 2.9	9.6 ± 3.2	8.7 ± 1.1
	AIA	38.3 ± 5.5	49.7 ± 6.1*	83.4 ± 13.5*	46.8 ± 9.1*
TNF-α	Controls	6.7 ± 1.1	3.8 ± 0.7	2.7 ± 0.7	2.4 ± 0.3
	AIA	7.0 ± 1.1	5.4 ± 0.7	18.0 ± 3.1*	11.9 ± 2.3*
IL-10	Controls	12.7 ± 1.3	12.7 ± 0.9	13.8 ± 2.5	13.4 ± 1.5
	AIA	21.8 ± 2.5*	30.6 ± 3.4*	16.6 ± 1.6	12.5 ± 0.9
IL-4	Controls	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
	AIA	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.1
MIP-1α	Controls	13.2 ± 1.7	9.1 ± 1.1	14.6 ± 4.0	6.1 ± 0.8
	AIA	14.6 ± 2.2	11.6 ± 1.5	31.5 ± 4.7*	17.4 ± 2.9*
MCP-1	Controls	1580 ± 155	1365 ± 114	1138 ± 105	915 ± 64
	AIA	2612 ± 208*	3693 ± 315*	2046 ± 162*	1182 ± 113
OPG	Controls	224 ± 19	230 ± 15	169 ± 15	162 ± 12
	AIA	262 ± 18	537 ± 48*	212 ± 16	187 ± 35

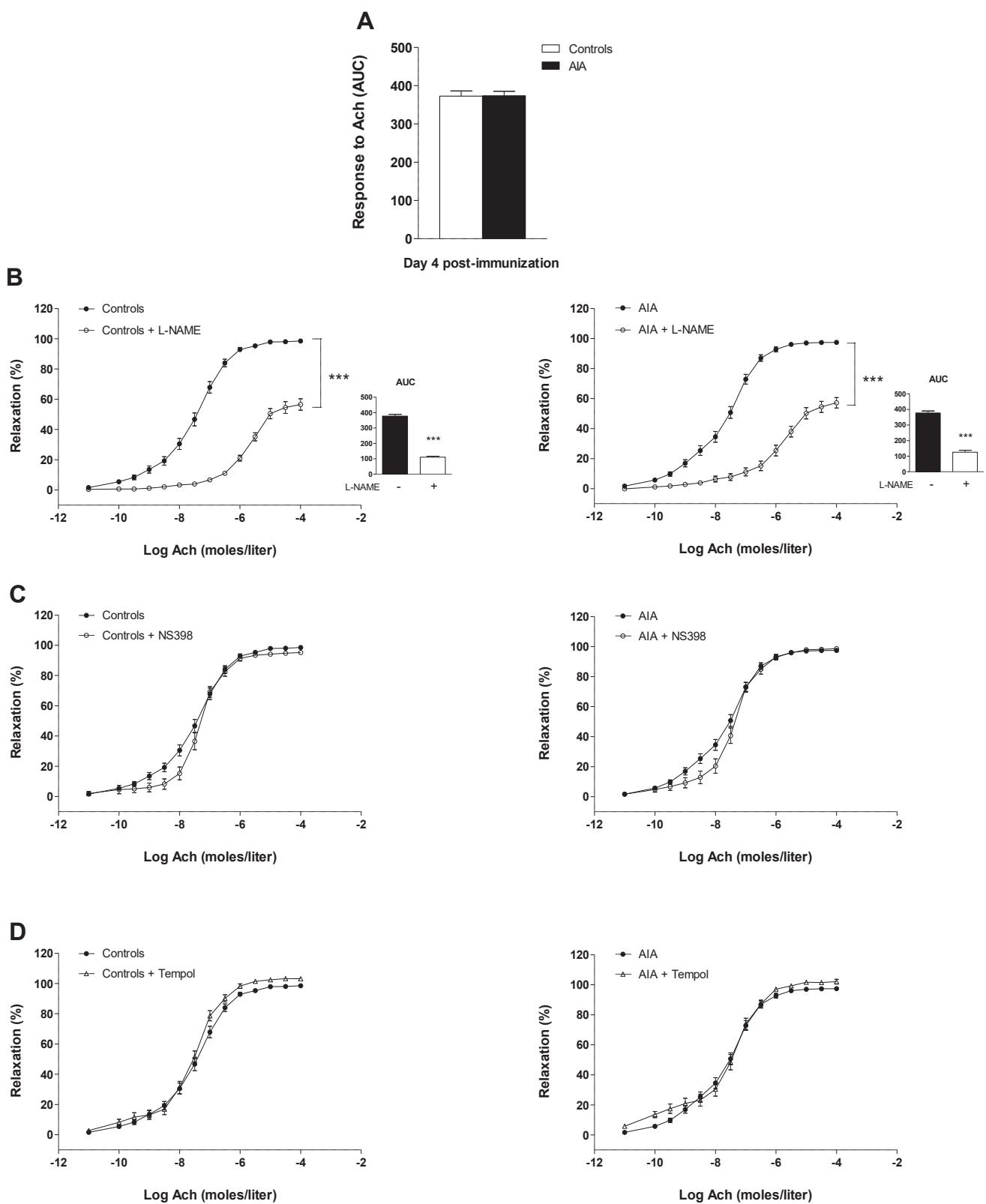
474

475 Clinical data were obtained from all rats (n=20/group/stage). Plasma cytokines and  
 476 chemokines levels (pg/mL) measured at day 4, 11, 33 and 90 post-immunization in AIA and  
 477 age-matched controls (n = 11-17 per AIA groups and n=7-12 per Control groups). Values are  
 478 the mean ± SEM. \*p <0.05 versus age-matched control.  
 479

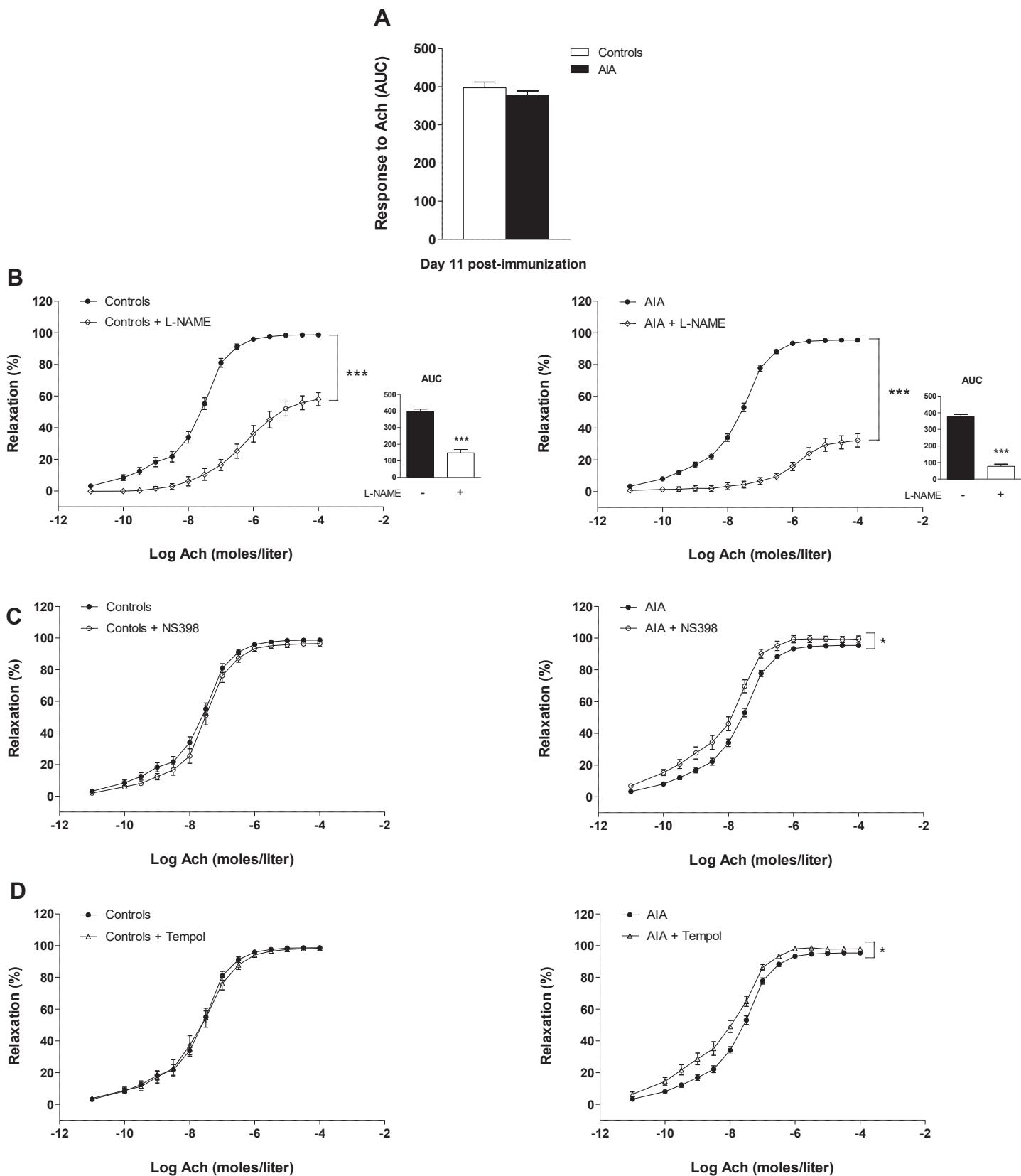


**Figure 1. Vascular reactivity to norepinephrine during the course of AIA.**

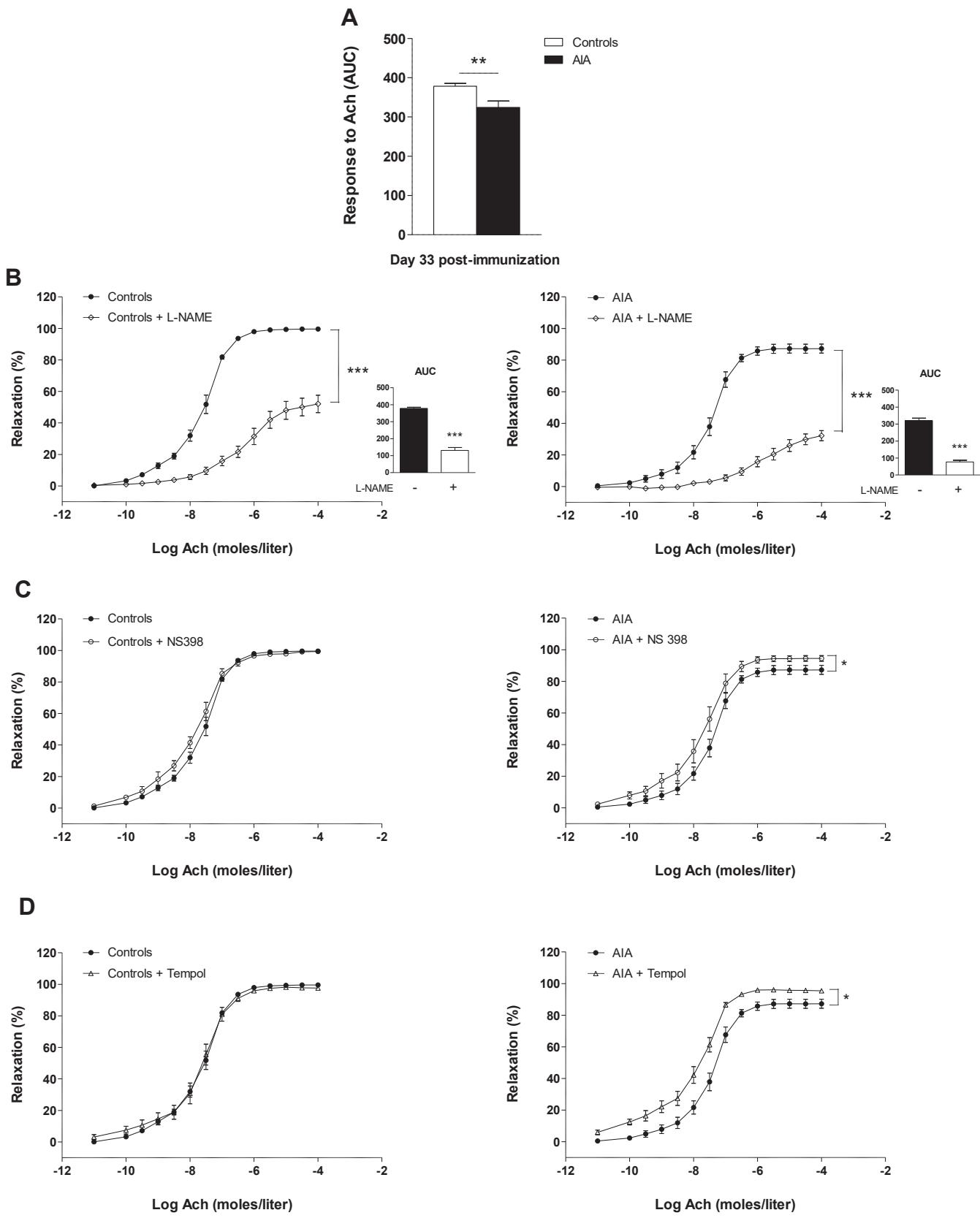
Experiments were performed on endothelium-denuded aortic rings from AIA and control rats at each stage of arthritis. The overall response to norepinephrine is expressed as area under the curve (AUC). Values are means  $\pm$  SEM of 12 to 20 aortic rings from 12 to 20 rats/group/stage. \*\* $p$ < 0.01 vs controls.



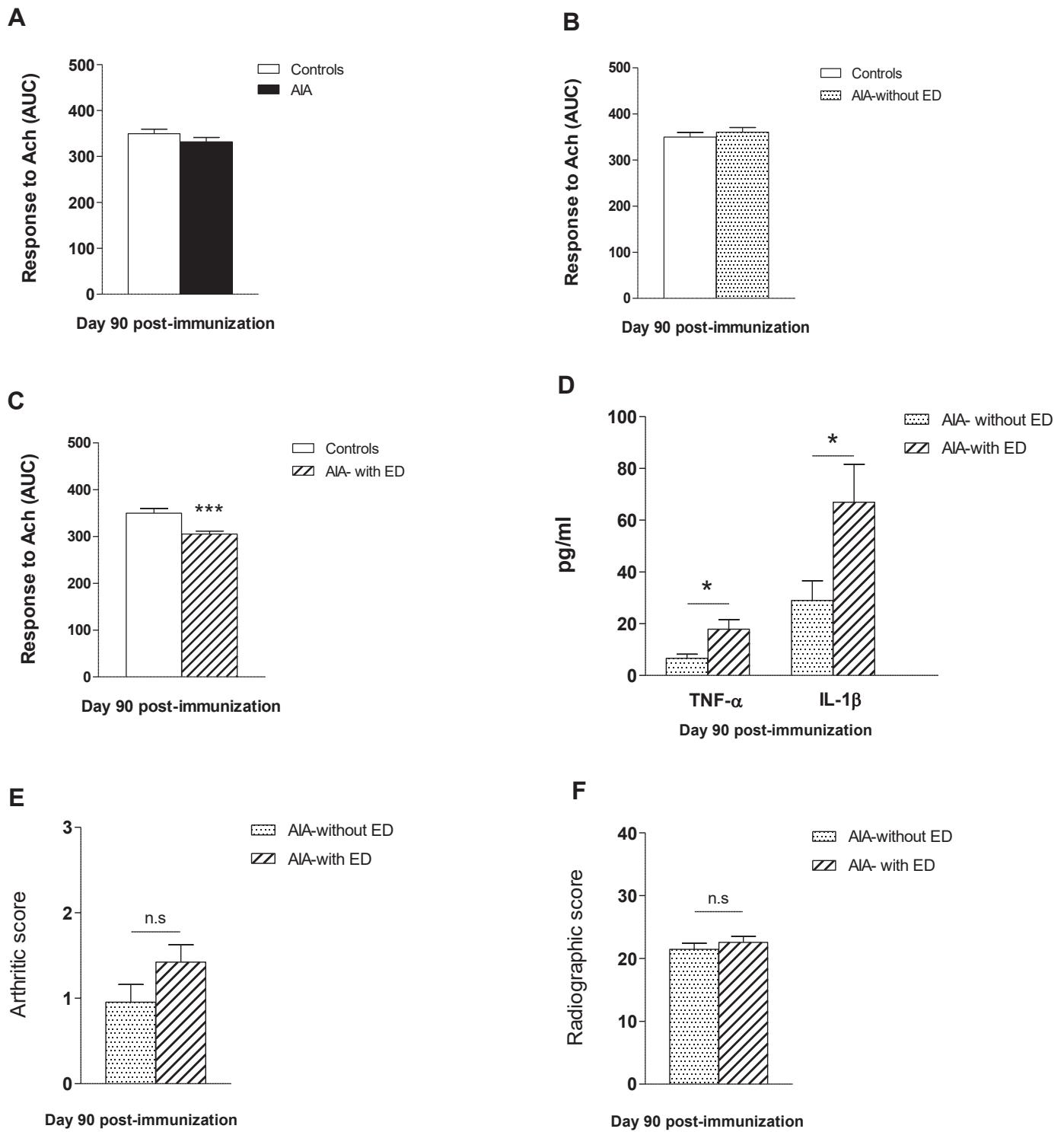
**Figure 2. Effect of L-NAME, NS398 and Tempol on the response to Ach at the preclinical stage of AIA.** (A) The vasodilator response to Ach (expressed as AUC of Ach) was assessed in aortic rings from AIA and controls at day 4 post-immunization. The same experiment was performed after incubation with L-NAME (B) (the insert presents AUC of Ach), NS398 (C) and Tempol (D). Results are expressed as means  $\pm$  SEM of 13 to 17 aortic rings from 17 rats/group. \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 3. Effect of L-NAME, NS398 and Tempol on response to Ach at the clinical onset of arthritis.** (A) The vasodilator response to Ach (expressed as AUC of Ach) was assessed in aortic rings from AIA and controls at day 11 post-immunization. The same experiment was performed after incubation with L-NAME (B) (the insert presents AUC of Ach), NS398 (C) and Tempol (D). Results are expressed as means  $\pm$  SEM of 12 to 18 aortic rings from 18 rats/group. \* $p<0.05$ , \*\*\*  $p<0.001$ .

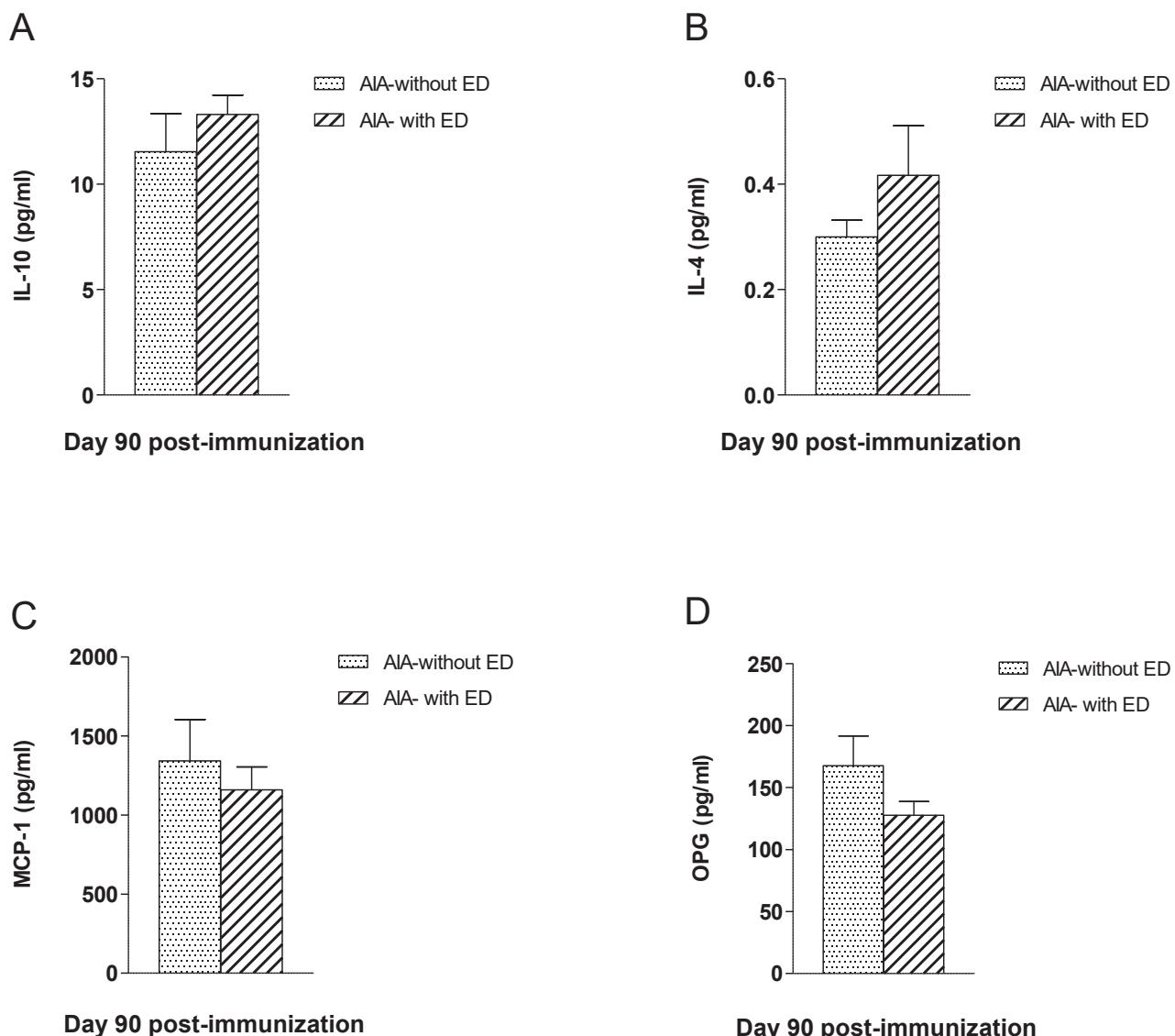


**Figure 4. Effect of L-NAME, NS398 and Tempol on response to Ach at the acute inflammatory phase of AIA.** (A) The vasodilator response to Ach (expressed as AUC of Ach) was assessed in aortic rings from AIA and controls at day 33 post-immunization. The same experiment was performed after incubation with L-NAME (B) (the insert presents AUC of Ach), NS398 (C) and Tempol (D). Results are expressed as means  $\pm$  SEM of 12 to 19 aortic rings from 19 rats/group. \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

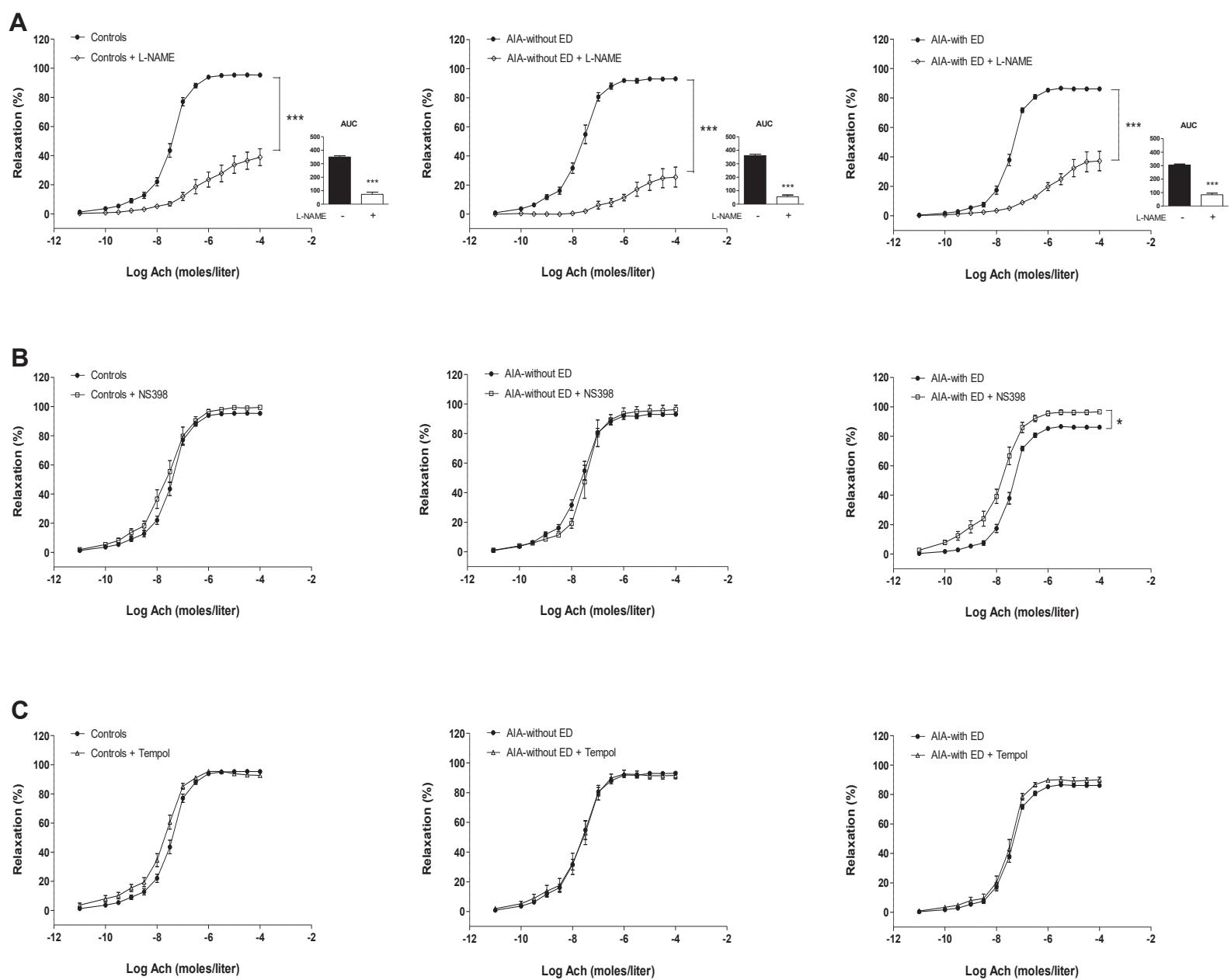


**Figure 5. Endothelial function and cytokines levels at day 90 post-immunization.**

Experiments were performed from AIA and control rats at day 90 post-immunization. (A) The overall vasodilator response to Ach (expressed as AUC of Ach) was not different in AIA vs control rats. (B,C) The detailed analysis of individual data revealed two populations of AIA rats, with and without endothelial dysfunction. These two groups differed from pro-inflammatory cytokines levels (D) but not from arthritis score (E) or radiographic score (F). Values are as means  $\pm$  SEM from 8 to 11 values/group. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

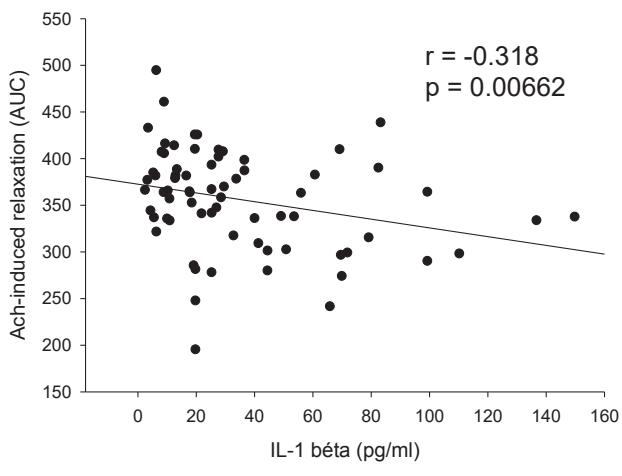
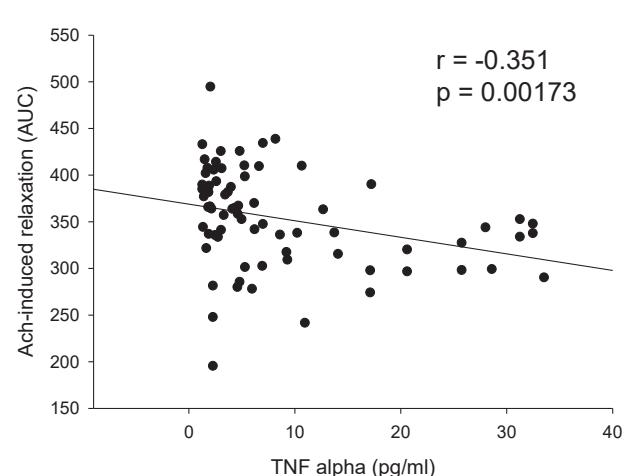
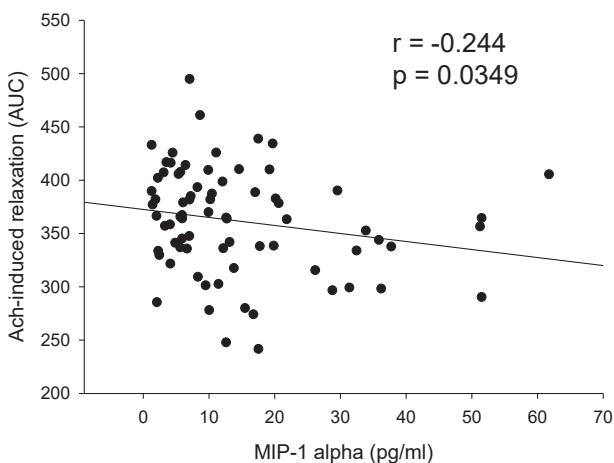


**Figure 6. Plasma levels of IL-10, IL-4, MCP-1 and OPG in AIA rats at day 90 post-immunization.** At day 90 post-immunization, plasma levels of IL-10 (A), IL-4 (B), MCP-1 (C) and OPG (D) did not differ between AIA rats “with endothelial dysfunction (ED)” and AIA “without ED”. Results are expressed as means  $\pm$  SEM from 6 to 9 rats/subgroups.



**Figure 7. Effect of L-NAME, NS398 and Tempol on vasodilation response to Ach at the late phase of arthritis.**

Cumulative concentration curves were performed in aortic rings from controls, AIA without endothelial dysfunction (ED) and in AIA with ED, in the presence or not of L-NAME (A) (the insert presents AUC of Ach), NS398 (B) and Tempol (C). Values are as means  $\pm$  SEM of 6 to 11 aortic rings from 15 Controls rats, 11 rats AIA-without ED and 9 rats AIA-with ED. \* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

**A****B****C**

**Figure 8. Correlations between endothelial function and cytokines/chemokines plasma levels.** Ach-induced relaxation (expressed as AUC) and plasma levels of IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B) and MCP-1 levels (C) negatively correlated throughout the AIA course (from day 4 to day 90 post-immunization).



**3<sup>ème</sup> étude :**

**Effet d'un traitement par un anti-TNF- $\alpha$  sur la dysfonction endothéliale :  
mécanismes impliqués**

\*\*\*\*\*

Article soumis à *Rheumatology*, en octobre 2015 (FI : 4.475)

Totoson P, Maguin-Gaté K, Monnier A, Prigent-Tessier A,  
Verhoeven F, Marie C, Wendling D, Demougeot C.

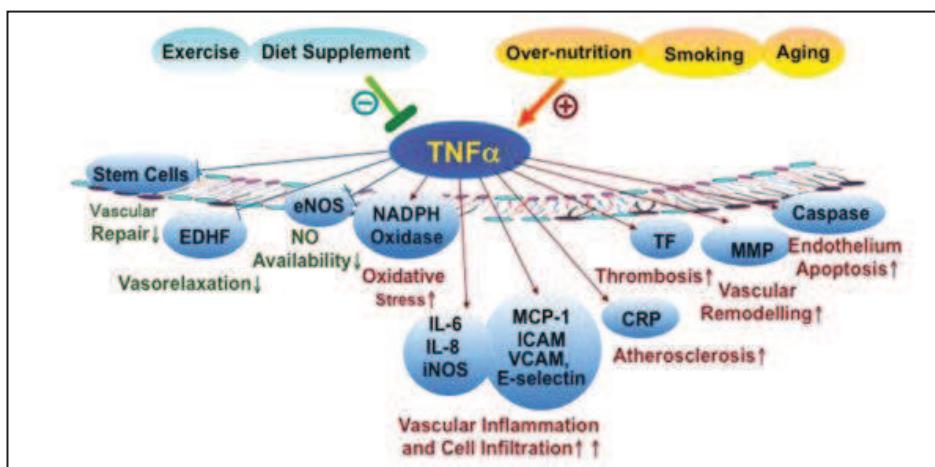
**Etanercept Improves Endothelial Function in Rheumatoid Arthritis:  
Mechanisms Involved.**

\*\*\*\*\*



## I. Contexte et objectifs

Les résultats obtenus dans l'étude précédente ont mis en lumière le lien potentiel entre les cytokines pro-inflammatoires circulantes et la DE aortique dans le modèle AIA. Cette étude suggère que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  ne seraient pas seulement des marqueurs de fonction endothéliale, mais que ces cytokines pourraient être, en particulier le TNF- $\alpha$ , des acteurs de la DE associée à l'arthrite. En effet, la perte de la compensation de la DE aortique qui survient au stade d'inflammation maximale est concomitante de l'élévation des taux de TNF- $\alpha$  dans notre modèle. Le lien entre TNF- $\alpha$  et DE n'est pas nouveau et l'impact délétère du TNF- $\alpha$  sur la fonction endothéliale dans des pathologies CV « conventionnelles » a déjà été étudié<sup>257</sup>. Ainsi comme présenté dans la figure ci-dessous, le TNF- $\alpha$  est susceptible de modifier plusieurs voies de signalisations inflammatoires et endothéliales<sup>257</sup> (**Figure 22**).



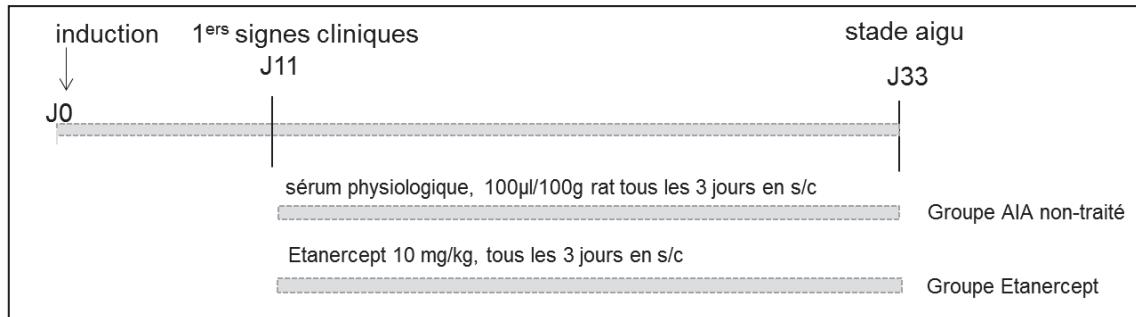
**Figure 22.** Effet du TNF- $\alpha$  sur la fonction endothéliale et mécanismes potentiellement impliqués.

Il est par conséquent très surprenant de constater que l'impact des anti-TNF- $\alpha$  sur la fonction endothéliale des patients PR ne soit pas clairement déterminé et demeure controversé. Certaines études ont rapporté un effet bénéfique des anti-TNF- $\alpha$  sur la fonction endothéliale<sup>222, 238, 247, 262, 274</sup>, alors que d'autres ne montrent aucun effet<sup>275</sup>, quand d'autres décrivent un effet bénéfique mais uniquement transitoire<sup>276, 277</sup>. De façon encore plus surprenante, alors que plusieurs études ont décrit l'effet de différents traitements pharmacologiques sur la DE dans des modèles animaux de PR<sup>327</sup>, aucune étude ne s'est intéressée à l'impact des DMARDs, qu'ils soient « conventionnels » ou « biologiques » comme les anti-TNF- $\alpha$  dans ces modèles, alors que ce point est crucial pour la prise en charge du risque CV du patient PR.

Dans notre étude, nous avons évalué l'effet d'un traitement curatif par Etanercept, l'un des anti-TNF $\alpha$  les plus utilisés au monde dans la PR, sur la fonction endothéliale des rats AIA. Son impact sur les différentes voies de signalisation endothéliale impliquées dans la DE a été étudié, ainsi que son effet sur des facteurs de risque CV traditionnels tels que la pression artérielle, la fréquence cardiaque, la glycémie, le taux de cholestérol et la triglycéridémie.

## II. Méthodologie

- Les expériences ont été conduites chez des rats AIA, qui ont été traités dès l'apparition des symptômes (J11 post-induction), par :
  - Etanercept, en s.c à une dose de 10 mg/kg tous les 3 jours pendant 21 jours : groupe AIA-etanercept
  - Sérum physiologique : en s.c à 1 ml/kg, tous les 3 jours pendant 21 jours : groupe AIA-non traité « Vehicle ».



- A J33, l'effet du traitement sur la fonction endothéliale a été évalué sur le modèle d'anneaux aortiques isolés (relaxation à l'acétylcholine).
- Les mécanismes impliqués dans l'effet de l'Etanercept ont été étudiés par incubation des anneaux avec :
  - Un inhibiteur de NOS (NG-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME  $10^{-4}$  M),
  - Un inhibiteur de COX-2 (NS398,  $10^{-5}$  M),
  - Un inhibiteur d'arginase (Nor-NOHA  $10^{-4}$  M),
  - Un analogue de la superoxyde dismutase (Tempol,  $10^{-4}$  M).
- L'expression aortique de plusieurs protéines a été étudiée par western blotting afin de déterminer si les modifications fonctionnelles observées lors des manipulations vasculaires pouvaient provenir des modifications d'expression des protéines correspondantes, incluant :
  - La NOS endothéliale et sa forme phosphorylée sur la sérine 1177, principale forme active de eNOS dont la phosphorylation est altérée en cas de pathologies CV<sup>344</sup>,
  - La COX-2,
  - L'Arginase-2,
  - Les p22<sup>phox</sup> et p47<sup>phox</sup> : des sous-unités membranaires et cytosoliques de la NADPH oxydase, principale enzyme de production d'anions superoxydes à l'origine du stress oxydant vasculaire.

- L'effet d'Etanercept sur les facteurs de risque CV a été évalué par la mesure de la pression artérielle et du rythme cardiaque par voie invasive (cathétérisme carotidien), de la triglycéridémie, cholestérolémie et glycémie à la fin du traitement.

#### **IV. Principaux résultats**

Nos résultats ont révélé que :

- ❖ Le traitement par étanercept, qui réduit la sévérité de l'arthrite, améliore significativement la fonction endothéliale des rats AIA.
- ❖ Cet effet repose sur des effets vasculaires pléiotropes : restauration de l'équilibre NOS/arginase, diminution de l'activité/expression COX-2, réduction de la production d'anions superoxydes et de l'expression de p22<sup>phox</sup>.
- ❖ Les effets bénéfiques endothéliaux du traitement sont indépendants de son impact sur les facteurs de risque CV étudiés, puisqu'il ne modifie pas les paramètres biologiques des rats AIA et, paradoxalement, augmente de façon isolée la pression artérielle systolique.

**Etanercept Improves Endothelial Function in Rheumatoid Arthritis via  
Pleiotropic Effects: a Study in Rat Adjuvant-induced Arthritis**

**Running Head:** Totoson P. *Etanercept and endothelial function in rheumatoid arthritis*

Perle Totoson<sup>1</sup>, PharmD, Katy Maguin-Gaté<sup>1</sup>, PhD, Anne Prigent-Tessier<sup>2</sup>, Pharm D, PhD,  
Alice Monnier<sup>2</sup>, Frank Verhoeven<sup>1,3</sup>, MD, Christine Marie<sup>2</sup>, Pharm D, PhD,  
Daniel Wendling<sup>3,4</sup>, MD, PhD, Céline Demougeot, PharmD, PhD<sup>1, #</sup>

<sup>1</sup> EA 4267 FDE, FHU INCREASE, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25030 Besançon, France

<sup>2</sup> INSERM U1093, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000, Dijon, France

<sup>3</sup> Service de Rhumatologie, CHRU Besançon, France

<sup>4</sup> EA 4266, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25030 Besançon, France

**# Corresponding author:**

Prof. Céline DEMOUGEOT

EA 4267 « Fonctions et Dysfonctions Epithéliales »

UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 19 rue Ambroise Paré, bâtiment S, 25030 BESANCON cedex, FRANCE.

Tel: (33) 3 63 08 23 25, Fax: (33) 3 81 66 56 91

E-mail address: cdemouge@univ-fcomte.fr

## **Abstract**

**Aims:** To determine the effect of etanercept on endothelial dysfunction and on traditional cardiovascular (CV) risk factors in the adjuvant-induced arthritis (AIA) rat model.

**Methods:** At the first signs of arthritis, etanercept (10 mg/kg/3 days, s.c.) or saline was administered for 3 weeks in AIA rats. Body weights and arthritis scores were daily monitored. Endothelial function was studied in aortic rings relaxed with acetylcholine (Ach) with or without inhibitors of NOS, COX-2, Arginase, EDHF and superoxide anions ( $O_2^-$ ) production. Aortic expression of eNOS, Ser1177-phospho-eNOS, COX-2, Arginase-2, p22<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup> was evaluated by western blotting analysis. Blood pressure, heart rate and blood levels of triglycerides, cholesterol, glucose were measured.

**Results:** Etanercept significantly reduced arthritis score ( $p<0.001$ ). It improved Ach-induced relaxation ( $p<0.05$ ) as a result of increased NOS activity, decreased COX-2 / arginase activities and decreased  $O_2^-$  production. These functional effects relied on increased eNOS expression and phosphorylation, decreased COX-2, Arginase-2 and p22<sup>phox</sup> expressions. No correlation was found between arthritis score and Ach-induced relaxation. The treatment did not change triglycerides, cholesterol and glucose levels but significantly increased systolic blood pressure and heart rate ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** Our data demonstrated that efficient dosage of etanercept on inflammatory symptoms improved endothelial function in AIA. This beneficial effect on endothelial function is disconnected from its impact on CV risk factors and relates to pleiotropic effects of etanercept on endothelial pathways. These results suggest that etanercept could be a good choice for patients with rheumatoid arthritis at high risk of CV events.

**Key words:** rheumatoid arthritis – endothelial dysfunction – etanercept – mechanisms

## **Introduction**

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common systemic autoimmune disease characterized by reduced life expectancy ranging between 3 to 18 years compared with the general population [1]. One of the leading causes of excess mortality in RA patients is cardiovascular (CV) diseases due to accelerated atherogenesis, irrespective of classical CV risk factors [2]. Evidence from clinical studies showed that endothelial dysfunction (ED), the “*sine qua non*” condition for atherosclerosis appearance, is present in established RA [3] and is an important target for reducing CV diseases. Given that RA and atherosclerosis share common immunopathogenic features, it has been proposed that inflammatory mechanisms involved in the development of synovial lesions might contribute to ED [4]. This hypothesis was supported by *in vivo* experimental data showing that administration of the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  depressed endothelium-dependent relaxation [5]. Surprisingly then, clinical studies on the effects of anti-TNF- $\alpha$  on ED in RA have provided conflicting results. Some showed improvement of endothelial function [6-9] whereas some reported no changes in ED despite efficient reduction of disease activity [10-15] and others demonstrated only a transient improvement of ED [16-18].

The major concern for addressing whether anti-TNF- $\alpha$  improves or not ED in clinical studies is that on the one hand, according to the international guidelines, TNF- $\alpha$  inhibitors are usually used in combination therapy with methotrexate, and in the other hand, RA patients take multiple medications including cardiovascular drugs which can impact upon endothelial function. Thus animal models of RA provide the unique opportunity to determine the impact of one given drug on endothelial function without the influence of other medications, with a direct assessment of vascular function on isolated vessels, and using rat cohorts with reproducible polyarthritis severity. Previous studies conducted on the widely-used model of

adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats identified nitric oxide synthase (NOS) uncoupling, arginase 2 overactivation, endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) deficiency, cyclo-oxygenase-2 (COX-2) overactivity and overproduction of superoxide anions ( $O_2^-$ ) as important pathomechanisms involved in ED [19].

The aim of the present study was to investigate the effect of a curative treatment with etanercept on endothelial function in the AIA model in rats. Endothelial function was studied on isolated aortic rings on day 33 after arthritis induction, a time at which ED was previously characterized<sup>20</sup>, and the mechanisms involved were dissected. The efficacy of etanercept on disease activity and joint damage was assessed by measurement of arthritic score and radiographic score, respectively. To assess whether the treatment modified CV risk factors, blood pressure, heart rate, glycemia and lipid levels were also measured.

## **Material and methods**

### **Animals**

Six-week-old male Lewis rats (n=60) were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Animals were kept under a 12h-12h light: dark cycle and allowed free access to food and water. The experimental procedures were approved by the local committee for ethics in animal experimentation n° 2012/001-CD of Franche-Comté University (Besançon, France), and complied 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 2011).

### **Induction and clinical evaluation of the arthritis model**

Adjuvant arthritis was induced by a single intradermal injection at the base of the tail of 120 µL of 1 mg of heat-killed *Mycobacterium butyricum* (Difco, Detroit, MI) suspended in 0.1 ml

of mineral oil (Freund's incomplete adjuvant (Difco, Detroit, MI)). The AIA model is characterized by rapid onset and progression of a robust and easily measurable polyarthritis, characterized by severe erythema and diffuse soft swelling with complete ankylosis and malformations in the paws, reduced locomotor activity, frequently associated to ears and tail inflammation, weight loss, anorexia and diarrhea [21]. Rats were daily weighed and monitored for clinical signs of arthritis. The scoring system was employed as follows [22]: 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 were considered as the same joint. Sum of joints scores of 4 limbs leads to an arthritis score of maximum 6 to each rat.

### **Drug treatment**

At the day of the first inflammatory symptoms (i.e. at day 11-12 post-immunization) AIA rats were randomized in two groups. One group received etanercept, at 10 mg/kg (s.c.) every 3 days for 3 weeks (Etanercept, n=30). The dose of etanercept was chosen on the basis of previous data on the AIA model showing a significant reduction in arthritis severity and radiographic lesion [23]. The other group received saline at 1 ml/kg (s.c.) for 3 weeks (Vehicle, n=30).

### **Tissue collection, blood pressure and heart rate measurements**

Twenty-one days after treatment initiation, rats were anaesthetized with pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). Arterial systolic (SBP), diastolic (DBP), mean arterial (MAP) blood pressure and heart rate were measured after cannulation of the left carotid artery and connection of the catheter to a pressure recorder system (Easy Graf, Gould, USA) under temperature control. Blood was withdrawn from the abdominal artery and centrifuged to obtain serum, divided into

aliquots and stored at -80°C until analysis. Thoracic aorta were removed and immediately used for the group of rats used for vascular reactivity studies (n=15/group) or frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis for the group used for western blot (n=15/group). Ankles were removed and placed in 4% formalin until assessment of radiographs.

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

Radiographs of hind paws were performed with a BMA High Resolution Digital X Ray (40mV, 10mA) – D3A Medical Systems (Orleans, France). A score of 0 to 20 was determined for each paw using a grading scale modified from Ackerman et al. (1979) [24]. This score used the scale: 0 (normal), 1 (slight), 2 (mild), 3 (moderate), and 4 (severe) abnormalities in the tissue for each of 5 characteristic features of AIA. Radiographs takes into account: (a) the soft tissue swelling, (b) the osteoporosis as measured by bone density, (c) the loss of cartilage shown by narrowing of the joint spaces; (d) the bone erosions and (e) the heterotopic ossification defined as proliferation of new bone tissue. The maximum score for each rat is 40.

### **Vascular reactivity**

At the end of the treatment period, thoracic aorta was excised, cleaned of connective tissue, and cut into rings of approximately 2 mm in length. Rings were suspended in Krebs solution (moles/liter: NaCl 118, KCl 4.65, CaCl<sub>2</sub> 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, NaHCO<sub>3</sub> 24.9, MgSO<sub>4</sub> 1.18, glucose 12, pH 7.4), maintained at 37°C and continuously aerated with 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, for isometric tension recording in organs chambers, as previously described [25]. 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<sup>-6</sup> moles/liter). After a 90-min-equilibration period under a resting tension of 2g, to determine whether etanercept improved endothelial function, rings with intact endothelium

were constricted with phenylephrine (PE,  $10^{-6}$  moles/liter) and endothelium-dependent relaxation to Ach ( $10^{-11}$ - $10^{-4}$  moles/liter) was compared between etanercept and vehicle group. To investigate the contribution of NOS, tetrahydrobiopterin (the co-factor of NOS, BH<sub>4</sub>), arginase, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, COX-2 and EDHF, rings were previously incubated for 1 hour with the non-selective NOS inhibitor N<sub>ω</sub>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME,  $10^{-4}$  moles/liter), BH<sub>4</sub> ( $10^{-7}$  moles/liter), the arginase inhibitor N<sub>ω</sub>-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA,  $10^{-4}$  moles/liter), the superoxide dismutase mimetic (SOD) Tempol ( $10^{-4}$  moles/liter), the selective COX-2 inhibitor (NS-398,  $10^{-5}$  moles/liter), and the Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels inhibitors apamin ( $10^{-7}$  moles/liter) and charybdotoxin ( $10^{-7}$  moles/liter), respectively. Endothelium-denuded rings were used to determine the vasoconstrictive response to norepinephrine (NE,  $10^{-11}$ - $10^{-4}$  moles/liter) and the vasorelaxant response to the NO-donor sodium nitroprussiate (SNP,  $10^{-11}$ - $10^{-4}$  moles/liter) after preconstriction with PE  $10^{-6}$  moles/liter.

## Western blots

To investigate whether the effects of etanercept on endothelial function relied on changes in protein expression, the protein content of eNOS and Phospho-Ser1177-eNOS (P-eNOS, an activated form of eNOS at serine 1177 that produces a sustained release of endothelial NO), arginase-2, COX-2, p22<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup> (membrane-bound and cytosolic components, respectively, of NADPH oxidase, a major vascular enzyme responsible for O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in RA)<sup>26</sup>, were assessed in thoracic aortas from vehicle and etanercept AIA rats. After homogenization in ice-cold lysis buffer, thoracic aortas were sonicated and centrifuged (12.000 g, 20min, +4°C) and the supernatants stored at -80 °C until protein measurement by the Lowry method. Total proteins were separated by SDS-PAGE on 12% (Arginase 2, p22<sup>phox</sup> or p47<sup>phox</sup>) or 8% (COX-2, P-eNOS and eNOS) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membrane. After blocking unspecific binding with a 5% non-fat dry milk

in TBS buffer containing 0.1% Tween 20, membranes were incubated for 3h at room temperature with anti-eNOS (mouse monoclonal 610297, BD Transduction Laboratories, 1/2500), anti-P-eNOS (mouse monoclonal 612393, BD Transduction Laboratories, 1/1000), anti-arginase 2 (rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, 1/4000), anti-COX-2 (rabbit polyclonal aa 570-598, Cayman Chemical, 1/2500), anti-p22<sup>phox</sup> (mouse monoclonal sc-271968, Santa Cruz Biotechnology, 1/4000), anti-p47<sup>phox</sup> (mouse monoclonal sc-17845, Santa Cruz Biotechnology, 1/4000) or anti-β actin (mouse monoclonal, A5441, Sigma-Aldrich, 1/5000) antibodies and then for 2h with a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgGs (for eNOS, P-eNOS, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> and β-actin, 115-035-166 Jackson ImmunoResearch) or anti-rabbit IgGs (for arginase 2 and COX-2, 111-035-144 Jackson ImmunoResearch) and visualized using enhanced chemiluminescence (ECL+, GE Healthcare). The band densities were determined by scanning densitometry, and values were expressed as arbitrary units.

### Blood measurements

Total cholesterol and triglycerides were measured in serum (Vista, Siemens, USA) and glucose was measured in blood by using glycometer (GlucoMen, Menarini diagnostics, Italy).

### Data and Statistical analysis

Values are presented as means±SEM. Data were analyzed using GraphPad Prism software (version 5.0). Contractile responses to NE were expressed as the percentage of the maximum response to KCl 100 mmoles/liter. Relaxant responses to SNP and Ach were expressed as the percentage of relaxation of the contractile response to PE 10<sup>-6</sup> moles/liter. Concentration-responses curves to Ach, SNP and NE in vehicle and etanercept were compared by 2-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures. In each group (vehicle or etanercept), concentration-response curves to Ach with or without a specific inhibitor were compared by

2-way ANOVA for repeated measures. When necessary, to better understand the effect of inhibitors, the results were expressed as the area under the curve (AUCs) calculated from the individual concentration-response curves. Comparison between two values was assessed by unpaired Student *t* test or Mann-Whitney test when data were not normally distributed. 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

### ***Etanercept decreased clinical and radiological scores in AIA***

Etanercept did not influence body weights as compared to vehicle (Table 1). As expected, the treatment significantly decreased mean arthritis scores (Figure 1A). The clinical effect of etanercept was associated with a slight but significant decrease in radiological score (Figure 1B). When detailing the different components of this score, it appeared that etanercept significantly reduced soft tissue swelling, loss of cartilage, osteoporosis but not bone erosion and new bone formation (supplemental Fig. S1).

### ***Etanercept improved endothelial function in AIA***

To determine whether etanercept modified endothelial function, the concentration-response curves to Ach were compared between etanercept- and vehicle-treated AIA rats. As shown in Figure 2A, anti-TNF $\alpha$  treatment significantly improved Ach-associated vasorelaxation. To ascertain that this effect was not due to impaired response of vascular smooth muscle cells (VSMCs) to vasoconstrictive stimulus or to the relaxant effect of NO, the effect of etanercept on NE-induced vasoconstriction and on SNP-induced vasodilation was determined on endothelium-denuded aortic rings. Our results demonstrated that etanercept-treated rats

displayed similar constriction to NE (Figure 2B) as well as similar relaxation to the NO-donor SNP (Figure 2C). Of note, no correlation was found between arthritis score and Ach-induced relaxation (AUC) ( $r=-0.322$ ;  $p=0.0817$ , all AIA rats, data not shown).

### ***Etanercept improved the NOS/BH<sub>4</sub>/arginase balance in AIA***

NO is the key endothelial-derived relaxing factor in the macrovasculature. Its production by eNOS depends, in part, on the competition between eNOS and arginase for their common substrate: L-arginine [27]. Incubation of rings with L-NAME significantly blunted Ach-associated relaxation in both vehicle (Fig. 3A) and etanercept group (Fig. 3B). However, the effect of L-NAME was greater in etanercept as compared to vehicle (% reduction of AUC:  $87 \pm 2$  vs  $77 \pm 4$  in vehicle,  $p=0.042$ ) indicating that NOS activity was enhanced by etanercept. This finding was confirmed by the higher expression of P-eNOS (the active form of eNOS) in the etanercept group (Fig. 3D) associated with a higher total eNOS expression (Fig. 3C). To assess the effect of treatment on arginase activity, rings were incubated with nor-NOHA, an arginase inhibitor. In vehicle-treated rats (Fig. 3G), nor-NOHA significantly improved Ach-induced vasorelaxation (AUC without inhibitor  $304 \pm 16$  vs AUC with inhibitor  $362 \pm 20$ ,  $p=0.029$ ) confirming the deleterious role of arginase in Ach-induced relaxation [28]. In etanercept group, as a reflection of the normalization of arginase activity, nor-NOHA did not change AUC of Ach-induced relaxation (Fig. 3H). Consistent with this, aortic arginase-2 expression was significantly reduced by etanercept (Fig. 3I). Additionally, as NOS activity also depends on the availability on its co-factor BH<sub>4</sub>, we investigated the impact of etanercept on BH<sub>4</sub> deficiency. As previously reported in this model [26], incubation of rings with BH<sub>4</sub> significantly improved Ach-induced relaxation in vehicle-treated AIA (Fig. 3E). By contrast, BH<sub>4</sub> did not improve the response to Ach in etanercept-treated rats (Fig. 3F). In summary, all the above indicated that the effect of etanercept on endothelial function was mediated by a

modification of the NOS/BH<sub>4</sub>/arginase balance in favour of increased NOS activity/expression, reduced BH<sub>4</sub> deficiency along with decreased arginase activity/expression.

#### ***Etanercept blunted the COX-2 pathway but did not change EDHF production***

Besides NO, EDHF and COX-derived products are endothelium-derived relaxing factors with a relevant contribution to normal endothelial function. Previous data on the AIA model demonstrated that impaired vascular EDHF production and enhanced COX-2 activity are both contributors of ED [28]. To assess the contribution on EDHF in Ach-induced relaxation, rings were incubated with apamin/charybdotoxin, two K<sup>+</sup> channel inhibitors that blunt vasodilation to Ach when used in rings from normal animals [28]. In vehicle AIA, consistent with impaired EDHF production, apamin/charybdotoxin did not reduce but on contrary improved Ach-induced relaxation (Fig. 4A). As shown in Fig. 4B, etanercept did not improve EDHF deficiency in AIA since it did not change the effect of apamin/charybdotoxin on the response to Ach. As regards COX-2 activity, our results showed that NS-398, a COX-2 inhibitor, significantly improved Ach relaxation in the vehicle group (Fig. 4C). Conversely, the COX-2 inhibitor did not change Ach response in the etanercept group (Fig. 4D) indicating that COX-2 activity was reduced by the treatment. Consistent with this, aortic COX-2 expression was significantly decreased by etanercept (Fig. 4E). Altogether, these data demonstrated that etanercept did not change EDHF production but reduced the deleterious contribution of COX-2 to ED.

#### ***Etanercept decreased superoxide anions production and NADPH oxidase expression***

The role of excessive O<sub>2</sub><sup>°</sup> production and increased NADPH oxidase expression in AIA-associated ED has been previously demonstrated [26]. In the present study, the fact that the

SOD mimetic Tempol significantly improved Ach-induced vasodilation in the vehicle group confirmed this data (Fig. 5A). In etanercept-treated AIA rats, Tempol did not change the response to Ach thus indicating that the  $O_2^-$  production decreased after treatment (Fig. 5B). Western blot analysis of the components of NADPH oxidase showed that the beneficial effect of etanercept on  $O_2^-$  production relied, at least in part, on decreased expression of p22<sup>phox</sup> (Fig. 5C) but not of p47<sup>phox</sup> (Fig. 5D).

### ***Effect of etanercept on CV risk factors***

Data are presented in Table 1. As compared to vehicle, etanercept induced a significant increase in SBP and heart rate ( $p<0.05$ ). Conversely, it did not change DBP, MAP, blood glucose, total cholesterol and triglyceride levels.

## **Discussion**

TNF- $\alpha$  is a pro-inflammatory cytokine secreted by activated macrophages and T cells and recognized by TNF- $\alpha$  receptors that are expressed on critical cellular effectors of vascular function/dysfunction including vascular endothelial and smooth muscle cells [29]. This cytokine was previously reported to contribute to ED in animal models of low-grade inflammation such as fructose-induced hypertension [30], ageing [31], estrogen-deficiency [32], chronic-mild stress [33] and diabetes [34] as evidenced by the improvement by etanercept of Ach-induced vasodilation in these models. A new finding provided by the present study is the positive impact of etanercept in ED associated with experimental arthritis indicating that the cytokine also acts as a contributor to ED in situations associated with high-grade inflammation. This new data strongly suggests that lower CV events reported in RA patients treated with TNF- $\alpha$  inhibitors [35] are likely mediated by ED reduction and resonates with studies that showed association between several polymorphisms of the TNF- $\alpha$  gene and

predisposition to CV complications in RA patients [36, 37]. An intriguing result of our study was a lack of association between endothelial function and arthritis score in AIA rats. This data suggests that, even though TNF- $\alpha$  is likely involved in both vascular and joint detrimental processes in RA, the pathomechanisms governing joint disease and vascular disease in RA are probably distinct.

Classical CV risk factors including hypertension are minimally explaining the CV risk in RA [2, 38]. Besides, ED was reported to be present in RA patients independently of traditional risk factors [39]. To support this latter point are our results showing that etanercept did not modify triglycerides, total cholesterol and blood glucose levels but resulted in a slight increase in SBP in AIA as observed in RA patients [40, 41]. Hypertension is a little-known side effect of anti-TNF- $\alpha$  therapy in RA [42] and the underlying mechanisms are still unknown. In our study, high SBP in etanercept AIA rats is likely the consequence of increased heart rate since DBP was unaffected by the treatment. From a clinical perspective, all the above data indicate that the measurements of traditional CV risk factors such as blood pressure, lipids or glucose levels cannot be used as relevant endpoints to evaluate the effect of TNF- $\alpha$  inhibitors on endothelial function in RA.

The comprehensive analysis of the mechanisms underlying the effects of etanercept on endothelial function revealed both an improvement of NO production and a decrease in oxidative stress. This is consistent with studies showing an increased frequency of CV events and an increased risk to develop CV events in RA patients who carried a polymorphism in the eNOS gene [43] and in the methionine sulfoxide reductase [44], an oxidative stress-related enzyme. We showed that the improvement of endothelial NO production by etanercept was associated with an increase in eNOS phosphorylation at serine 1177 and in total eNOS

expression, as previously reported in other animal models of ED [30-34]. The new finding of the present study is that increased NO output by endothelium is also consecutive to a decrease in arginase 2 expression/activity, an enzyme that starves eNOS from its substrate L-arginine, and that was previously reported to be upregulated *in vitro* by TNF- $\alpha$  [45]. Besides a switch of the eNOS/arginase balance towards NOS pathway, etanercept also reduced oxidative stress and more precisely the production of  $O_2^-$ , a radical oxygen species that largely contribute to ED in AIA [19]. Our results suggest that reduced  $O_2^-$  production by etanercept may involve several mechanisms. A major mechanism is likely a decrease in p22<sup>phox</sup> expression, the membrane-bound subunit of NADPH oxidase. However, reduced arginase activity and the improvement of BH<sub>4</sub> availability may also be implicated. Indeed, under conditions of reduced substrate and/or cofactor availability, eNOS becomes uncoupled i.e. loses its ability to convert L-arginine to L-citrulline but removes an electron from NADPH and donates it to molecular oxygen to yield  $O_2^-$  instead of NO. An additional mechanism suggested by our study is a decrease in vascular COX-2 expression since COX-2 is a source of oxygen radicals itself. Evidence that etanercept improves endothelial function through mechanisms other than increased NOS activity/expression might explain why the beneficial effects of disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs) including TNF- $\alpha$  inhibitors on endothelial function were observed despite unchanged plasma dimethyl-L-arginine (ADMA) levels, an endogenous inhibitor of eNOS [46, 47].

In conclusion, despite the general consensus that the reduction of CV morbidity and mortality is of utmost importance in RA, clinical data on the impact of TNF- $\alpha$  inhibitors on ED, provided inconclusive results. This present study provide the first evidence of a favorable effect of etanercept on endothelial function in an animal model of RA, through pleiotropic effects on endothelial pathways namely a switch of the eNOS/arginase balance towards NOS

pathway, a reduction of NAPDH oxidase/ $O_2^-$  production pathway, a decrease in COX-2 deleterious contribution. It is noteworthy that these pleiotropic effects of etanercept endorse the idea that etanercept interacts with a pivotal common endothelial effector which remains however to be identified. The benefits of the TNF- $\alpha$  inhibitor on endothelial function occurred independently of its impact on CV risk factors. From a therapeutic point of view, they suggest that etanercept could be a good choice in RA patients at high risk of CV events. Further studies are warranted to determine whether the observed results are specific to etanercept or likely reflect a class-effect of anti-TNF- $\alpha$  agents.

### **Key messages**

Etanercept improves endothelial function in RA via pleiotropic effects on endothelial pathways. This effect occurs independently of its impact on disease activity or CV risk factors.

**Total word count of the manuscript:** 3492 words

### **Acknowledgements**

The authors thank Dr. C. Moussard for the analysis of cholesterol and triglycerides levels and M. Nappey for her technical assistance for tissue collection and blood pressure measurements.

**Conflict of interest:** none declared.

**Funding:** This work was supported by funding from the French Ministry for Higher Education and Research.

## References

1. Van Doornum S, McColl G, Wicks IP. Accelerated atherosclerosis: an extraarticular feature of rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 2002;46:862-73.
2. del Rincón ID, 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;44:2737-45.
3. Steyers CM 3rd, Miller FJ Jr. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *Int J Mol Sci* 2014;15:11324-49.
4. Stevens RJ, Douglas KM, Saratzis AN, Kitas GD. Inflammation and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Expert Rev Mol Med* 2005;7:1-24.
5. Wang P, Ba ZF, Chaudry IH. Administration of tumor necrosis factor-alpha in vivo depresses endothelium-dependent relaxation. *Am J Physiol* 1994;266:H2535-41.
6. Datta D, Ferrell WR, Sturrock RD, Jadhav ST, Sattar N. Inflammatory suppression rapidly attenuates microvascular dysfunction in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2007;192:391-5.
7. Sidiropoulos PI, Siakka P, Pagonidis K, Raptopoulou A, Kritikos H, Tsetis D, et al. Sustained improvement of vascular endothelial function during anti-TNFalpha treatment in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol* 2009;38:6-10.
8. Hürlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2002;106:2184-7.

9. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Sanchez-Andrade A, Garcia-Porrúa C, Martín J, Gonzalez-Gay MA. Short-term adalimumab therapy improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis refractory to infliximab. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24:309-12.
10. Van Doornum S, McColl G, Wicks IP. Tumour necrosis factor antagonists improve disease activity but not arterial stiffness in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1428-32.
11. Spinelli FR, Metere A, Barbatì C, Pierdominici M, Iannuccelli C, Lucchino B, et al. Effect of therapeutic inhibition of TNF on circulating endothelial progenitor cells in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 2013;2013:537539.
12. Mathieu S, Couderc M, Pereira B, Soubrier M. The effects of TNF-alpha inhibitor therapy on arterial stiffness and endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum* 2013;43:e1-2.
13. Hänsel S, Lässig G, Pistorius F, Passauer J. Endothelial dysfunction in young patients with long-term rheumatoid arthritis and low disease activity. *Atherosclerosis* 2003;170:177-80.
14. Sandoo A, van Zanten JJ, Toms TE, Carroll D, Kitas GD. Anti-TNF $\alpha$  therapy transiently improves high density lipoprotein cholesterol levels and microvascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *BMC Musculoskelet Disord* 2012;13:127.
15. Menghini R, Campia U, Tesauro M, Marino A, Rovella V, Rodia G, et al. Toll-like receptor 4 mediates endothelial cell activation through NF- $\kappa$ B but is not associated with endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2014;9:e99053.

16. Södergren A, Karp K, Boman K, Eriksson C, Lundström E, Smedby T, et al. Atherosclerosis in early rheumatoid arthritis: very early endothelial activation and rapid progression of intima media thickness. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R158.
17. 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;51:447-50.
18. 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;14:R117.
19. Totoson P, Maguin-Gaté K, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Mechanisms of endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R22.
20. Totoson P, Maguin-Gaté K, Nappey M, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Microvascular Abnormalities in Adjuvant-Induced Arthritis: Relationship with Macrovascular Endothelial Function and Markers of Endothelial Activation. *Arthritis Rheumatol* 2015;67:1203-1213.
21. Oliver SJ, Brahn E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. *J Rheumatol* 1996; 23 (suppl 44):56-60.
22. 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.

23. Lu Y, Stinnette TW, Westrick E, Klein PJ, Gehrke MA, Cross VA, et al. Treatment of experimental adjuvant arthritis with a novel folate receptor-targeted folic acid-aminopterin conjugate. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R56.
24. Ackerman NR, Rooks WH 2<sup>nd</sup>, Shott L, Genant H, Maloney P, West E. Effects of naproxen on connective tissue changes in the adjuvant arthritic rat. *Arthritis Rheum* 1979;22:1365–1374.
25. Bagnost T, Berthelot A, Bouhaddi M, Laurant P, André C, Guillaume Y, et al. 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.
26. 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;54:1847-1855.
27. Pernow J, Jung C. Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc Res* 2013;98:334-343.
28. Prati C, Berthelot A, Kantelip B, Wendling D, Demougeot C: Treatment with the arginase inhibitor Nw-hydroxy-nor-L-arginine restores endothelial function in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R130.
29. Campbell IK, Roberts LJ, Wicks IP. Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumour necrosis factor and rheumatoid arthritis. *Immunology and Cell Biology* 2003;81:354–366.
30. Tran LT, MacLeod KM, McNeill JH. Chronic etanercept treatment prevents the development of hypertension in fructose-fed rats. *Mol Cell Biochem* 2009;330:219-28.

31. Arenas IA, Xu Y, Davidge ST. Age-associated impairment in vasorelaxation to fluid shear stress in the female vasculature is improved by TNF-alpha antagonism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H1259-63.
32. Arenas IA, Armstrong SJ, Xu Y, Davidge ST. Chronic tumor necrosis factor-alpha inhibition enhances NO modulation of vascular function in estrogen-deficient rats. *Hypertension* 2005;46:76-81.
33. Bayramgurler D, Karson A, Yazir Y, Celikyurt IK, Kurnaz S, Utkan T. The effect of etanercept on aortic nitric oxide-dependent vasorelaxation in an unpredictable chronic, mild stress model of depression in rats. *Eur J Pharmacol* 2013;710:67-72.
34. Utkan T, Yazir Y, Karson A, Bayramgurler D. Etanercept improves cognitive performance and increases eNOS and BDNF expression during experimental vascular dementia in streptozotocin-induced diabetes. *Curr Neurovasc Res* 2015;12:135-46.
35. Peters MJ, van Sijl AM, Voskuyl AE, Sattar N, Smulders YM, Nurmohamed MT. The effects of tumor necrosis factor inhibitors on cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des* 2012;18:1502-11.
36. Rodríguez-Rodríguez L, González-Juanatey C, Palomino-Morales R, Vázquez-Rodríguez TR, Miranda-Filloy JA, Fernández-Gutiérrez B, et al. TNFA -308 (rs1800629) polymorphism is associated with a higher risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2011;216:125–130.
37. Vallvé JC, Paredes S, Girona J, Uliaque K, Ribalta J, Hurt-Camejo E, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  -1031 T/C polymorphism is associated with smaller and more proatherogenic low density lipoprotein particles in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 2008;35:1697–1703.

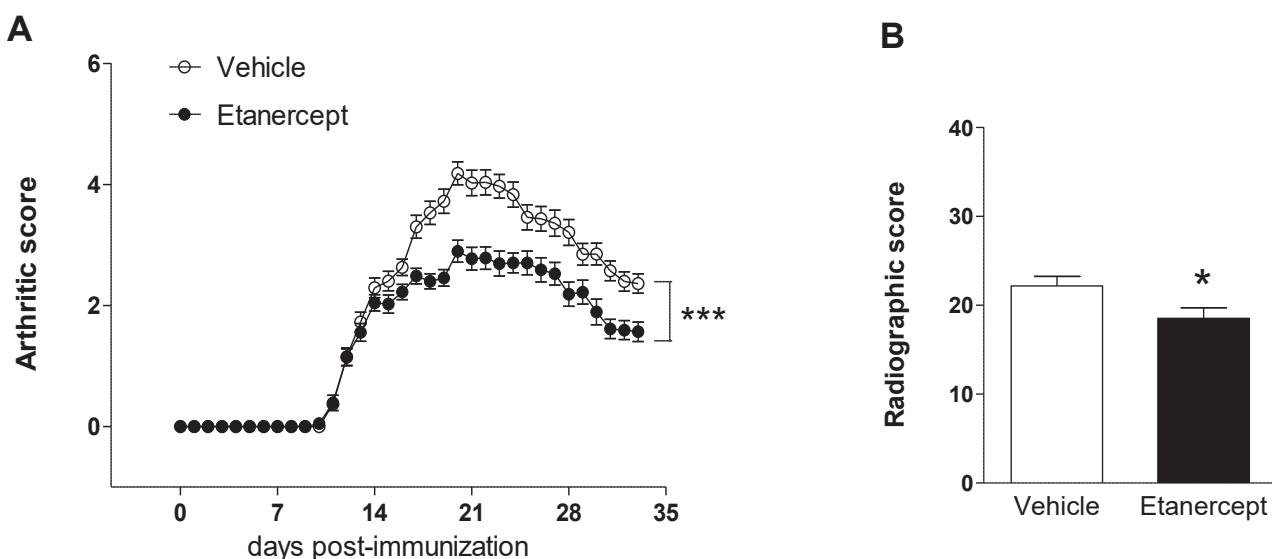
38. van Halm VP, Peters MJ, Voskuyl AE, Boers M, Lems WF, Visser M, et al. Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease: a cross-sectional study, the CARRE Investigation. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1395-400.
39. de Groot L, Jager NA, Westra J, Smit AJ, Kallenberg CG, Posthumus MD, et al. Does reduction of disease activity improve early markers of cardiovascular disease in newly diagnosed rheumatoid arthritis patients? *Rheumatology (Oxford)* 2015;54:1257-61.
40. Senel S, Cobankara V, Taskoylu O, Karasu U, Karapinar H, Erdis E et al. The safety and efficacy of etanercept on cardiac functions and lipid profile in patients with active rheumatoid arthritis. *J Investig Med* 2012;60:62-5.
41. Soubrier M, Jouanel P, Mathieu S, Poujol D, Claus D, Dubost JJ, et al. Effects of anti-tumor necrosis factor therapy on lipid profile in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2008;75:22-4.
42. Zhao Q, Hong D, Zhang Y, Sang Y, Yang Z, Zhang X. Association between anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis and hypertension: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(14):e731.
43. Gonzalez-Gay MA, Llorca J, Palomino-Morales R, Gomez-Acebo I, Gonzalez-Juanatey C, Martin J. Influence of nitric oxide synthase gene polymorphisms on the risk of cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27:116-9.
44. García-Bermúdez M, López-Mejías R, González-Juanatey C, Castañeda S, Miranda-Filloy JA, Blanco R, et al. Association of the methionine sulfoxide reductase A rs10903323 gene polymorphism with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2012;41:350-3.
45. Dschietzig T, Brecht A, Bartsch C, Baumann G, Stangl K, Alexiou K. Relaxin improves TNF- $\alpha$ -induced endothelial dysfunction: the role of glucocorticoid receptor and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Cardiovascular Research* 2012;95: 97-107.

46. Turiel M, Tomasoni L, Sitia S, Cicala S, Gianturco L, Ricci C, et al. Effects of long-term disease-modifying antirheumatic drugs on endothelial function in patients with early rheumatoid arthritis. *Cardiovasc Ther* 2010;28:e53-64.
47. Sandoo A, Dimitroulas T, Toms TE, Hodson J, Veldhuijzen van Zanten JJ, Smith JP, et al. 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;45:1399-403.

**Table 1. Effect of etanercept on physiological and biological parameters**

	Vehicle	Etanercept
Body weight (g)	218 ± 2	224 ± 2
SBP (mm Hg)	114 ± 5	125 ± 6*
DBP (mm Hg)	77 ± 3	85 ± 5
MAP (mm Hg)	89 ± 5	103 ± 5
Heart Rate (bpm)	256 ± 14	294 ± 10*
Total cholesterol (g/L)	0.99 ± 0.03	0.88 ± 0.03
Triglycerides (g/L)	0.47 ± 0.04	0.45 ± 0.04
Blood glucose (g/L)	1.10 ± 0.04	1.13 ± 0.07

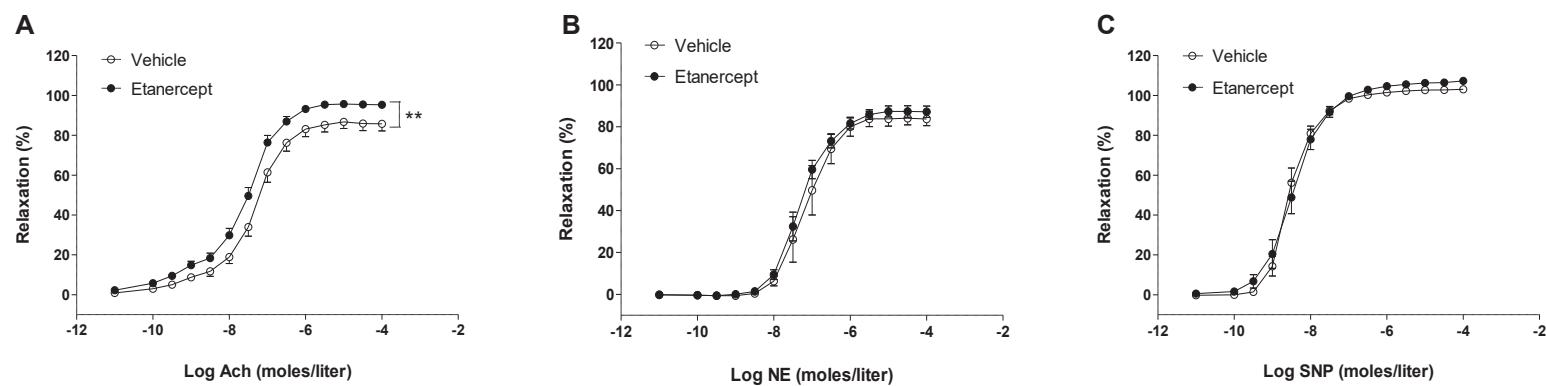
All parameters were measured at day 33 post-immunization after 21 days of treatment (s.c.) with saline (vehicle) or etanercept (10 mg/kg/3 days). SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, MAP: mean arterial blood pressure. Values are expressed as means ± SEM (n = 15 rats per group). \*p <0.05 different from vehicle.



**Figure 1. Evolution of arthritis in Vehicle and Etanercept-treated rats.**

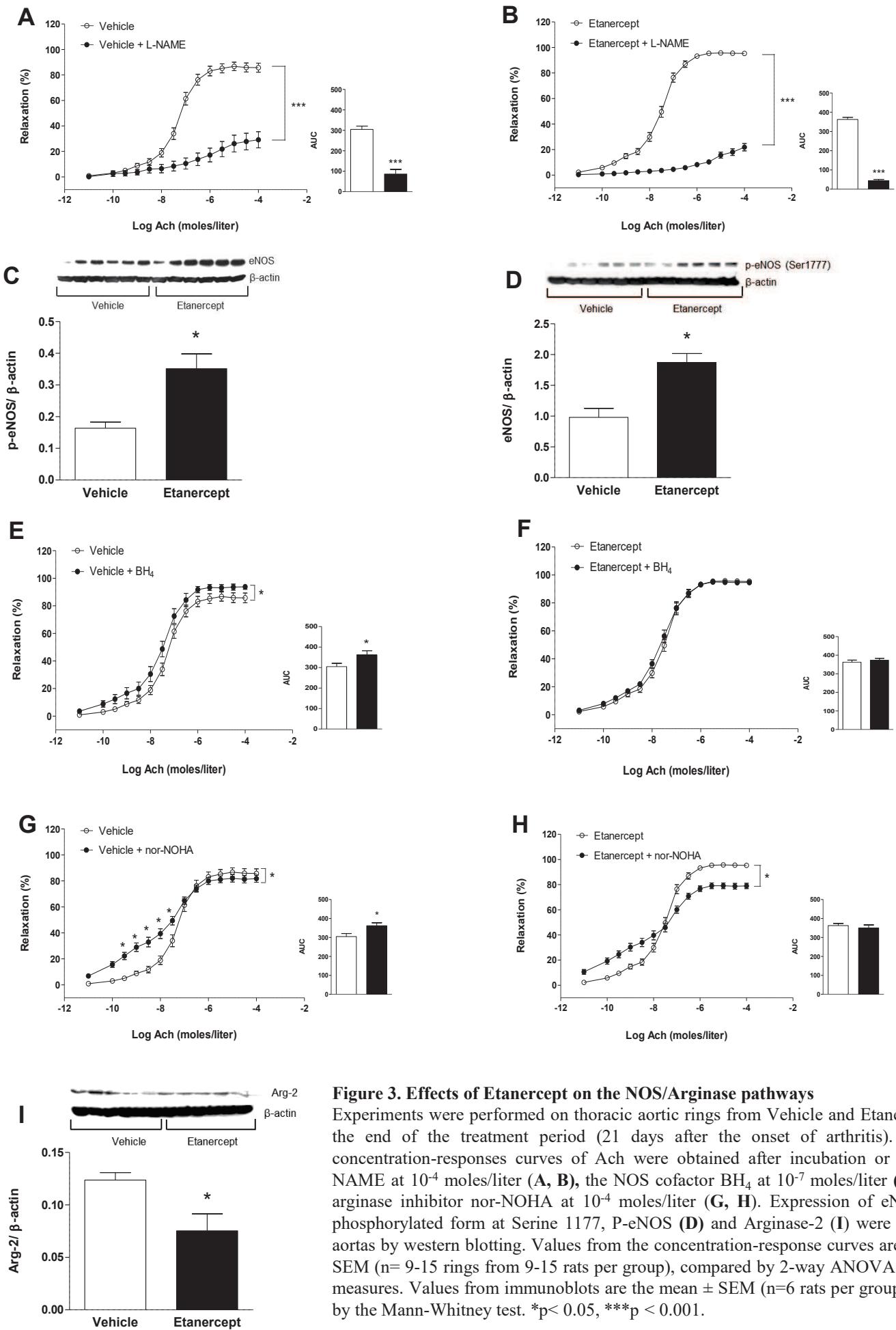
**A:** Arthritis scores were plotted over time after AIA induction. **B:** Radiographic scores were evaluated at the end of the treatment period. Values are the mean  $\pm$  SEM ( $n=30/\text{group}$ ).

\*\*\* $p<0.001$ , \* $p<0.05$ .



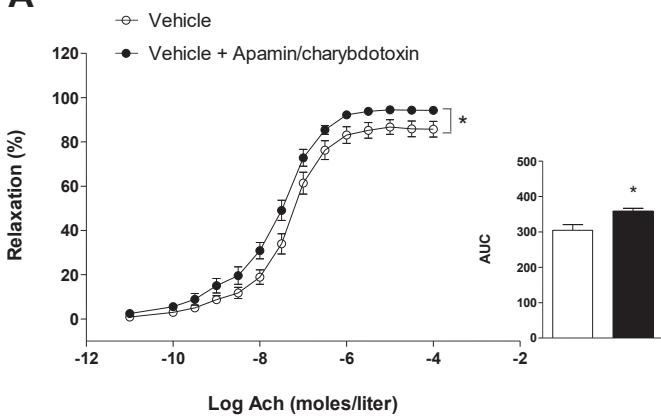
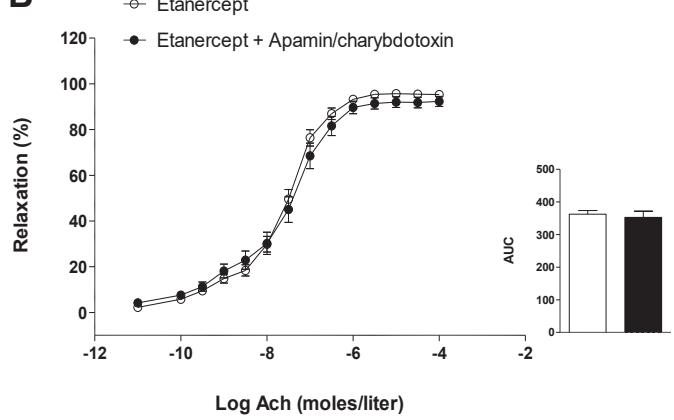
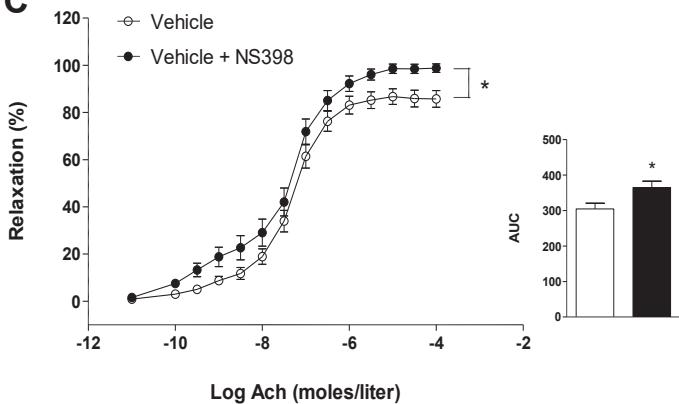
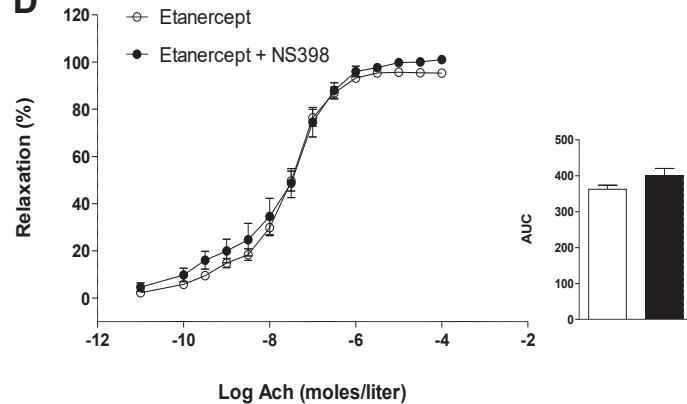
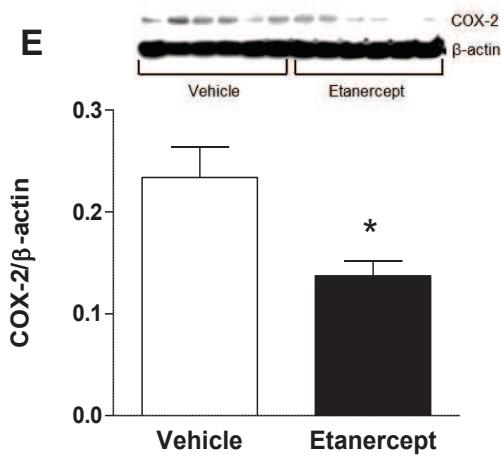
**Figure 2. Vascular reactivity to vasodilators and vasoconstrictive agents.**

Experiments were performed on thoracic aortic rings from Vehicle rats and Etanercept rats at the end of the treatment period (21 days after the onset of arthritis). Concentration-response curve of (A) Ach in endothelium-intact aortic rings preconstricted with PE 10<sup>-6</sup> moles/liter and (B) NE on endothelium-denuded aortic rings, (C) SNP on endothelium-denuded aortic rings preconstricted with PE 10<sup>-6</sup> moles/liter. Values are the mean ± SEM (n = 10-15 aortic rings from 10-15 rats per group). \*\*p<0.01, by 2-way ANOVA for repeated measures.



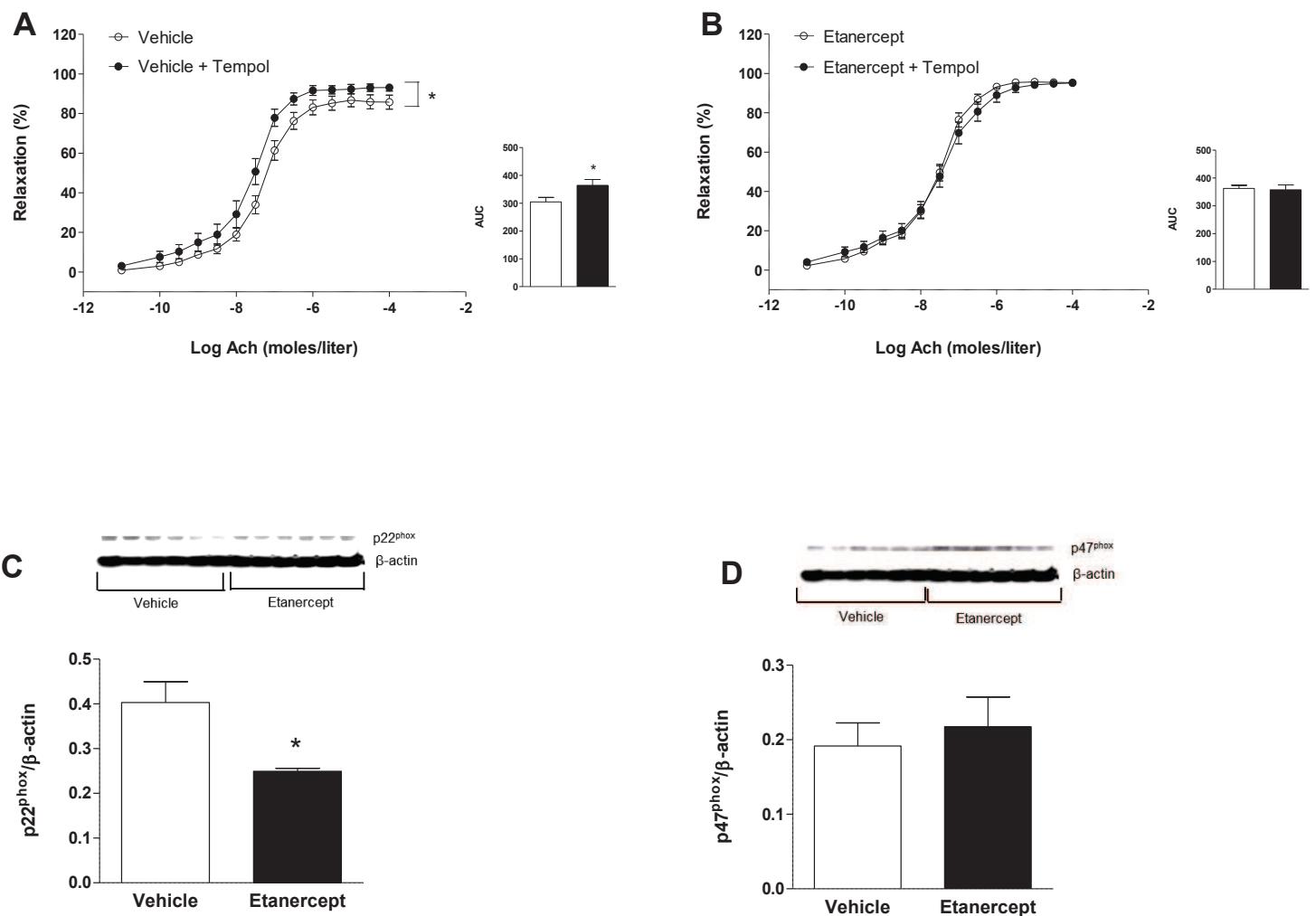
**Figure 3. Effects of Etanercept on the NOS/Arginase pathways**

Experiments were performed on thoracic aortic rings from Vehicle and Etanercept rats at the end of the treatment period (21 days after the onset of arthritis). Cumulative concentration-responses curves of Ach were obtained after incubation or not with L-NAME at  $10^{-4}$  moles/liter (A, B), the NOS cofactor  $\text{BH}_4$  at  $10^{-7}$  moles/liter (E, F) or the arginase inhibitor nor-NOHA at  $10^{-4}$  moles/liter (G, H). Expression of eNOS (C), its phosphorylated form at Serine 1177, P-eNOS (D) and Arginase-2 (I) were evaluated in aortas by western blotting. Values from the concentration-response curves are the mean  $\pm$  SEM ( $n=9-15$  rings from 9-15 rats per group), compared by 2-way ANOVA for repeated measures. Values from immunoblots are the mean  $\pm$  SEM ( $n=6$  rats per group), compared by the Mann-Whitney test. \* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$ .

**A****B****C****D****E**

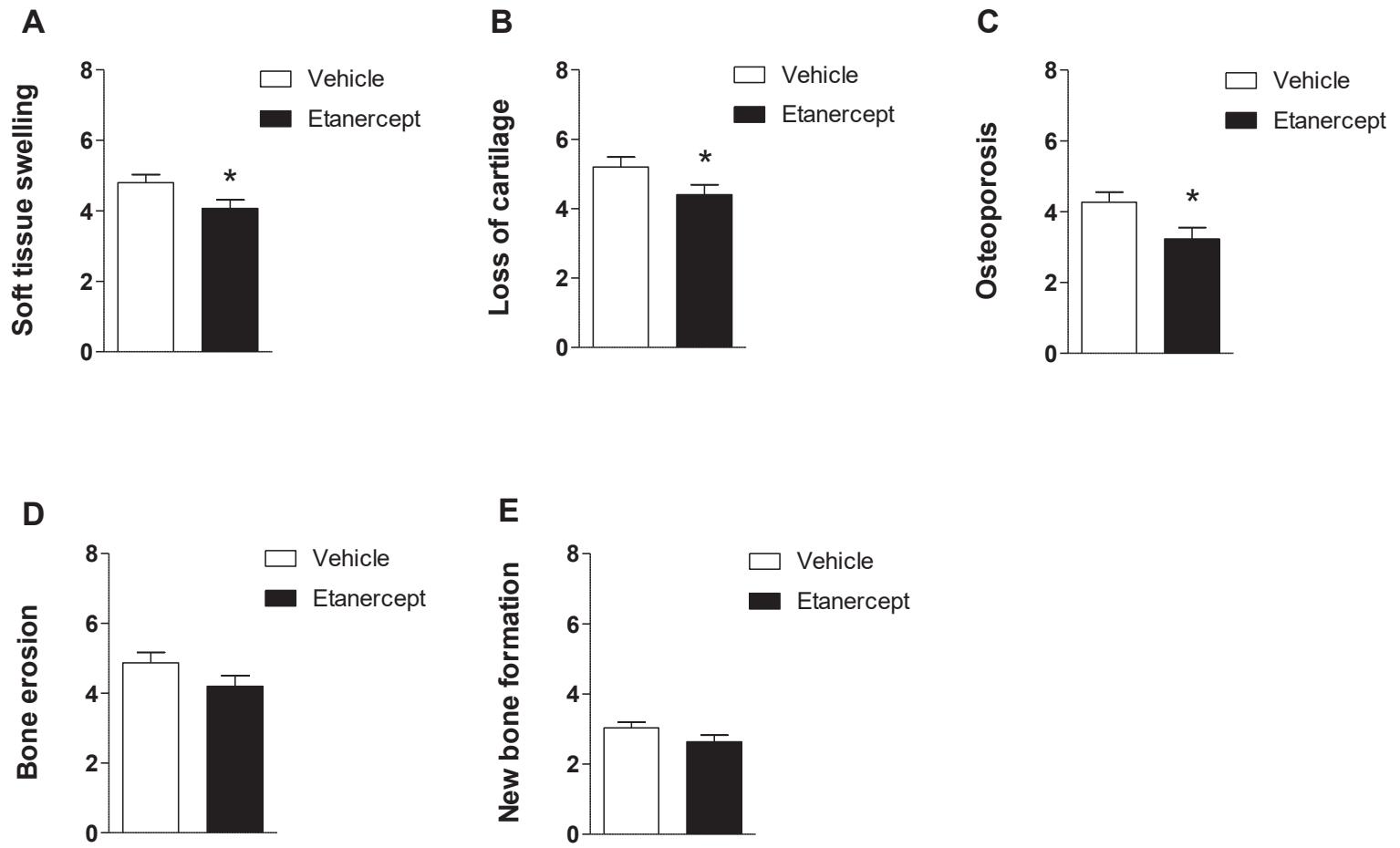
**Figure 4. Effects of Etanercept on COX-2 pathway and EDHF production.**

Experiments were performed on thoracic aortic rings from Vehicle rats and Etanercept rats at the end of treatment period (21 days after the onset of arthritis). Cumulative concentration-responses curves of Ach were obtained after incubation or not with apamin / charybdotoxin at  $10^{-7}$ / $10^{-7}$  moles/liter (A, B) or the COX-2 inhibitor NS-398 at  $10^{-4}$  moles/liter (C, D). COX-2 expression (E) was evaluated in aortas by western blotting. Values from the concentration-response curves are the mean  $\pm$  SEM ( $n=8-15$  rings from 8-15 rats per group), compared by 2-way ANOVA for repeated measures. Data from immunoblots are the mean  $\pm$  SEM ( $n=6$  rats per group), compared by the Mann-Whitney test. \* $p<0.05$ .



**Figure 5. Effects of Etanercept on superoxide anions production and NADPH oxidase expression.**

Experiments were performed on thoracic aortic rings from Vehicle rats and Etanercept rats at the end of treatment period (21 days after the onset of arthritis). Cumulative concentration-responses curves of Ach were obtained after incubation or not with Tempol at  $10^{-4}$  moles/liter (**A, B**). Expression of the subunits of NADPH oxidase p22<sup>phox</sup> (**C**) and p47<sup>phox</sup> (**D**) were evaluated in aortas by western blotting. Values from the concentration-response curves are the mean  $\pm$  SEM (n= 13-15 rings from 13-15 rats per group), compared by 2-way ANOVA for repeated measures. Data from immunoblots are the mean  $\pm$  SEM (n=6 rats per group), compared by the Mann-Whitney test. \*p<0.05.



**Supplemental figure S1. Effect of Etanercept on the different components of the radiographic score.**

For each paw, score used the scale: 0 (normal), 1 (slight), 2 (mild), 3 (moderate), and 4 (severe) abnormalities for each parameter. Values are the mean  $\pm$  SEM from 30 Vehicle rats and 30 Etanercept rats. \* $p<0.05$ .





**3<sup>ème</sup> partie :**

**Discussion générale et perspectives**



## **Discussion générale et perspectives**

L'existence d'un sur-risque CV chez le patient atteint de PR est bien établie, et, compte tenu des importants progrès réalisés dans la prise en charge de l'aspect « rhumatologique » de la maladie, le nombre exponentiel des publications relatives au risque CV des patients révèle qu'un des objectifs majeurs du 21<sup>ème</sup> siècle sera de réduire la mortalité du patient PR, et donc, la survenue des pathologies CV associées à cette maladie. Les collèges américains et européens de rhumatologie insistent sur une évaluation complète et régulière du risque CV, mais beaucoup de recommandations en vigueur actuellement n'ont pas fait l'objet d'une évaluation scientifique de haut niveau de preuve <sup>48, 172, 173</sup>.

Les travaux présentés dans la thèse ont permis d'apporter plusieurs réponses à d'importantes questions posées concernant la physiopathologie, le diagnostic et le traitement de la DE associée à cette pathologie.

*Quelle est la cinétique d'évolution de la DE au cours de l'arthrite ? Y-a-t-il des différences selon les lits vasculaires ?*

Les travaux présentés dans la première étude expérimentale ont montré que la DE est d'apparition précoce dans la maladie, détectable dès les premiers symptômes articulaires. De façon intéressante, elle survient d'abord au niveau de la microcirculation (artères mésentériques) et secondairement au niveau de la macrocirculation (aorte thoracique). Une limite de notre méthodologie est l'utilisation de stimuli différents pour tester la fonction endothéliale dans ces 2 lits vasculaires : le flux pour la microcirculation *versus* un agoniste cholinergique, l'acétylcholine, pour les artères de conductance. Nous avons fait ce choix pour étudier des mécanismes endothéliaux comparables dans les deux lits vasculaires, les 2 stimuli choisis étant reconnus pour stimuler la production endothéliale de NO. Ainsi, dans la première étude qui n'avait pas à dessein d'élucider les mécanismes impliqués dans la DE microvasculaire, il est fort probable que la DE observée soit principalement le reflet d'un déficit en disponibilité vasculaire en NO. Bien que l'étude de la réponse au flux soit plus proche des conditions expérimentales utilisées chez l'Homme, il serait intéressant de déterminer si cette DE est retrouvée de la même manière en utilisant une technique isométrique et différents agonistes endothélium-dépendants. De plus, dans l'idée qu'un traitement adapté et précoce de cette DE microvasculaire puisse réduire les complications CV en cas de PR, la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent cette dysfonction serait souhaitable pour identifier les meilleures cibles thérapeutiques.

De façon intéressante, l'existence d'une altération microvasculaire précoce en l'absence d'une DE macrovasculaire a récemment été mise en évidence dans une autre pathologie inflammatoire chronique auto-immune, la sclérodermie <sup>345</sup>. Ce type de cinétique est également retrouvé dans le diabète. Il est

intéressant de constater que plusieurs éléments sont en faveur d'analogies entre la DE du diabète de type 2 et de la PR. Les études récentes<sup>39-42</sup> ont montré que les patients PR avaient le même risque CV que les diabétiques de type 2. De plus, il est connu qu'il existe un lien entre inflammation et résistance à l'insuline dans le diabète. Ceci suggère qu'il pourrait y avoir des mécanismes physiopathologiques communs à ces 2 pathologies, et donc, peut-être, des stratégies thérapeutiques communes<sup>74</sup>. Cependant, les études ayant évalué l'effet d'un anti-diabétique qui diminue la résistance à l'insuline, la pioglitazone, sur la DE microvasculaire en cas de PR n'ont pas donné de résultats positifs<sup>286, 287</sup>. En revanche, des études expérimentales ont montré que des médicaments de la PR (antagoniste des récepteurs à l'IL-1) sont efficaces sur la DE dans des modèles de diabète<sup>346, 347</sup>. Ainsi il semblerait que l'analogie PR / diabète pour la DE ait ses limites, la PR possédant des traits physiopathologiques particuliers. De plus alors que les FDRCV tiennent un rôle prédominant dans la DE du diabétique, leur impact est modeste en cas de PR.

Nos résultats montrant une dissociation entre la cinétique de la DE micro- et macrovasculaire suggèrent que les mécanismes à l'origine de ces dysfonctions sont différents. L'hypothèse la plus probable est que les cellules endothéliales des différents lits vasculaires répondent différemment à des stimuli identiques. En effet, il est établi que les cellules endothéliales de la micro- et de la macrocirculation présentent des différences métaboliques, comme cela a été montré par exemple en terme de transporteurs de la L-arginine<sup>348</sup>, mais aussi des différences en terme de réponse aux cytokines pro-inflammatoires<sup>321</sup>. Ainsi, une étude a montré que l'incubation de vaisseaux isolés de souris avec du TNF- $\alpha$  entraînait des expressions endothéliales différentes de ICAM, VCAM, P-Selectine, E-Selectine selon que le vaisseau incubé est une aorte, une artère iliaque, une veinule ou une veine<sup>259</sup>. Dans notre modèle, l'étude de l'expression de ces différents marqueurs d'activation endothéliale dans différents lits vasculaires permettrait de mieux comprendre ce qui sous-tend les différences de cinétiques de ces DE. De plus, l'hypothèse d'une réponse différentielle des lits vasculaires aux cytokines suggère que l'inflammation et la réduction de l'inflammation pourraient avoir un impact différent selon le lit vasculaire. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact des traitements visant à réduire la DE sur différents territoires vasculaires en cas de PR.

*Quelles sont les conséquences de la compréhension des mécanismes impliqués dans la DE associée à la PR ?*

Notre étude mécanistique a permis de mieux comprendre la séquence physiopathologique qui conduit à l'apparition de la DE macrovasculaire au stade d'inflammation maximale de la pathologie. Les mécanismes endothéliaux impliqués dans la DE en cas d'arthrite avaient déjà été identifiés au stade aigu<sup>327</sup>, mais la présente étude a permis de mettre l'accent sur l'importance de 3 voies de signalisation dans la DE macrovasculaire associées à l'arthrite : la voie de la NOS/arginase, la voie de la COX-2, la voie des anions superoxydes. Nos travaux ont mis en évidence l'aspect « silencieux » de la maladie

endothéliale dans les phases précoces de la PR, et posent la question des moyens de diagnostic du risque CV dans cette pathologie. Nos données encouragent également à une prise en charge très précoce des altérations endothéliales. En effet, la compréhension des mécanismes impliqués dans la DE, à savoir une hyperactivité COX-2 et une surproduction d'anions superoxydes initialement compensées par une suractivité NOS, permet d'envisager des traitements précoces du patient PR. Il serait par exemple possible d'envisager une prise en charge nutritionnelle « probabiliste », mise en place dès le diagnostic de la PR, à base de compléments visant soit à maintenir une activité NOS (supplémentation en citrulline, en L-arginase, extraits de plantes), soit à diminuer le stress oxydant<sup>349</sup> (Sésamine, Vitamines C, E), soit les 2 (extraits de plantes riches en polyphénols, qui pourraient combiner des effets anti-oxydants à des effets potentialisateurs de la voie de la eNOS et inhibiteurs d'arginase<sup>350</sup>.

Des études cliniques devraient être conduites sur le sujet. De la même manière, nos données encouragent à étudier l'impact endothérial de molécules de type « AINS-donneur de NO »<sup>351</sup>. Il serait également intéressant de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la compensation initiale de la DE, qui pourraient aider à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

### *Quel est le lien entre DE et inflammation ?*

Comme évoqué dans la partie données bibliographiques de la thèse, bien qu'un fort soupçon pèse sur l'implication de l'inflammation systémique comme un élément physiopathologique de la DE dans la PR, les données issues des études cliniques sont relativement controversées, et laissent supposer une certaine complexité dans cette relation. Nos résultats confirment la complexité de cette relation puisque nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre CRP, VCAM-1, ICAM-1 et fonction endothéliale. Nous avons fait le choix d'étudier cette corrélation sur l'ensemble des stades arthritiques dans le modèle AIA et non stade par stade pour une meilleure transposabilité clinique et afin de rechercher un marqueur utilisable quels que soient la sévérité et le stade de l'arthrite. Nos résultats de la deuxième étude permettent d'apporter de nouvelles pistes, en identifiant la mesure des taux d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et de MIP-1 $\alpha$  comme des marqueurs potentiels, du moins de la fonction endothéliale macrovasculaire. Une limite de notre étude est de n'avoir pas focalisé notre attention sur l'IL-6, autre cytokine pro-inflammatoire importante. La raison est que le modèle AIA est peu IL-6-dépendant, et que les taux circulants de cette cytokine sont très variables, parfois non détectables dans ce modèle. Pour cette raison, une confirmation de nos résultats, en incluant l'IL-6, sur un autre modèle d'arthrite, tel que le modèle mCIA, serait intéressante. De la même manière, une autre limite de notre modèle AIA est son caractère « monophasique » (une seule période de forte inflammation), qui mime mal l'aspect rémittent des poussées qui caractérisent la PR. De plus, nos données sur la relation cytokines – fonction endothéliale devront être confirmées chez des patients PR, au cours d'études qui devront

idéalement combiner une mesure de fonction endothéliale par FMD avec une méthode explorant la fonction microvasculaire (type EndoPAT).

L'élément non résolu pour l'instant par notre travail est de savoir si ces cytokines sont des *marqueurs* ou des *acteurs* de la DE. Cependant, d'autres acteurs probables de la DE méritent d'être étudiés, en particulier les auto-anticorps tels que le FR et les ACPA. En effet, leur présence est généralement associée à unmoins bon statut CV, mais jouent-ils un rôle dans la DE et ses complications ? Le développement d'un modèle comme le modèle d'arthrite induite par le pristane, considéré comme un modèle d'arthrite chronique, avec production de facteur rhumatoïde, serait à cet égard intéressant. Une étude récente de *Gómez-Puerta et al.*<sup>352</sup> a montré que, parmi des patients qui avaient le même statut clinique et inflammatoire systémique (VS, CRP), ceux qui étaient positifs aux ACPA avaient des taux synoviaux de cytokines (IL-17, IL-1 $\beta$  et IL-10 mais pas IL-6 et TNF- $\alpha$ ) supérieurs aux patients ACPA négatifs. Est-ce-que ces différences observées au niveau synovial sont également présentes au niveau sanguin, et au niveau vasculaire ? Concernant l'utilisation des cytokines comme marqueurs de DE comme suggéré par nos travaux expérimentaux, il faut cependant garder à l'esprit que, dans la PR, l'endothélium *synovial* est par définition inflammé, et libère donc dans la circulation générale des marqueurs d'inflammation/activation endothéliale qui constituent une « pollution » systémique et donc un biais pour refléter la DE *systémique*.

Aussi, il serait préférable d'identifier d'autres marqueurs circulants de DE que les marqueurs d'activation endothéliale. Récemment, l'étude de *Klimek*<sup>256</sup> en 2014 a bien illustré la complexité de trouver un marqueur circulant de DE utilisable dans la PR. Comparativement aux sujets non-PR, les taux circulants de VCAM-1, de vWF, de pentraxine-3 sont significativement plus élevés chez les sujets atteints de PR et cela indépendamment de la sévérité de la maladie. Par contre d'autres facteurs comme l'ADMA, l'E-sélectine soluble, le MCP-1 et l'ostéoprotégérine sont augmentés uniquement chez les patients PR ayant une activité élevée de la maladie. L'utilisation d'une approche protéomique dans les modèles animaux de PR qui permettrait de comparer l'expression protéique au niveau de l'endothélium articulaire *versus* systémique pourrait peut-être apporter des éléments nouveaux.

#### *Quelle méthode utiliser pour mesurer la fonction endothéliale en cas de PR ?*

La difficulté d'identifier un ou des marqueurs circulants de la DE en cas de PR encourage l'utilisation de méthodes plus directes d'évaluation de la DE. Comme présenté dans les données bibliographiques, plusieurs techniques de mesure de DE existent chez l'Homme, et qui sont parfois remplacées par des techniques de mesure de paramètres morphologiques (IMT) ou biomécaniques (rigidité) artérielles. Nos résultats ont montré qu'il existait une différence entre anomalies de la fonction endothéliale, de la rigidité microvasculaire et du remodelage microvasculaire. La DE microvasculaire est précoce et pérenne, la DE macrovasculaire et la diminution de compliance artérielle sont transitoires, et il n'y a

pas de remodelage microvasculaire dans le modèle AIA. Aussi, ces données soulignent l'importance d'utiliser des outils diagnostiques adaptés à chaque caractéristique vasculaire que l'on souhaite étudier. Nos données obtenues chez le rat AIA corroborent les résultats d'études cliniques. Dans l'étude de *Marder et al.*<sup>287</sup>, la pioglitazone n'a pas eu d'effet sur la DE micro- ou macrovasculaire mais a diminué la rigidité aortique, la CRP et l'activité de la maladie. Dans une étude transversale incluant 201 patients à PR modérée mais dont la durée de la maladie n'est pas précisée, la FMD n'est pas reliée à l'EIM carotidienne<sup>353</sup>. Cependant, certaines rapportent une altération concomitante de ces paramètres chez un même patient<sup>97, 249</sup>. En conclusion, les évaluations fonctionnelles et morphologiques des artères de conductance doivent être interprétées l'une indépendamment de l'autre car elles représentent des étapes distinctes et indépendantes du processus complexe d'athérosclérose<sup>241</sup>.

L'aspect diagnostique du risque CV chez le patient PR se heurte à l'absence d'échelles validées dans la pathologie. Comme récemment évoqué dans une excellente revue<sup>172</sup>, les algorithmes de calculs du risque CV (SCORE, SCORE modifié selon les recommandations EULAR (mSCORE), Framingham) et même le score de Reynolds qui pourtant tient compte du taux de CRP, sous-estiment le risque CV en cas de PR<sup>64, 169</sup>. Une étude récente a conclu que 1/3 des femmes atteintes de PR qui ont une faible valeur SCORE (c'est-à-dire un risque faible d'avoir un événement CV fatal dans les 10 ans) ont en fait des plaques d'athérome carotidiennes<sup>109</sup>. De la même manière, une autre étude a considéré que 63% des patients PR classés à risque CV modéré selon mSCORE pouvaient en fait être classés à haut risque CV sur la base de la présence de plaques d'athérome carotidiennes<sup>108</sup>. D'autres scores comme le QRISK2 quant à lui, surestimaient le risque<sup>172</sup>. Des groupes de travail ont été mis en place pour tenter de résoudre cette question. Nos travaux qui suggèrent un rôle central de la fonction endothéliale encouragent une mesure de la fonction endothéliale de façon précoce et un suivi chez le patient PR. A cet égard, l'arrivée sur le marché d'un appareillage automatisé tel que le système EndoPAT devrait permettre de simplifier cette mesure. Alors qu'il est communément admis que la fonction endothéliale ne peut pas être mesurée en routine, ce type d'appareillage qui permet une mesure en 15 minutes de la fonction endothéliale microvasculaire (digitale), par un personnel médical ou non, pourrait rendre faisable une vraie mesure de fonction endothéliale dans la pratique courante. La faisabilité de cette mesure est attestée par la décision du Japon d'approuver le remboursement de cette mesure de fonction endothéliale pour le dépistage du risque CV.

#### *Les traitements de la PR peuvent-ils améliorer la DE ?*

L'aspect thérapeutique de la DE est crucial pour la prise en charge du patient PR. En effet, plusieurs questions importantes sont pour l'instant sans réponse : l'amélioration clinique du patient PR suffit-

elle à réduire la DE ? Faut-il associer aux DMARDs des traitements non rhumatologiques ciblant spécifiquement le système CV ? Est-ce que tous les DMARDs sont équivalents sur le plan CV ?

Nos résultats obtenus avec Etanercept sont rassurants puisqu'ils montrent qu'un anti-TNF- $\alpha$  suffit à lui seul à améliorer la fonction endothéiale chez le rat AIA. L'absence de corrélation avec le score arthritique suggère que le bénéfice de l'anti-TNF $\alpha$  provient probablement d'un effet vasculaire direct plutôt que d'une réduction de la sévérité de l'arthrite. Il serait important de compléter notre étude par la mesure des cytokines pro-inflammatoires circulantes pour déterminer si son effet est secondaire à la réduction de l'inflammation. L'aspect pléiotropique des effets d'Etanercept au niveau endothéial suppose qu'il agit sur un effecteur commun à toutes les voies de signalisation. La sérine/thréonine kinase p38 pourrait être cet effecteur. En effet, la voie MAPK p38 est une cible des cytokines pro-inflammatoires et est activée en cas d'activité augmentée de la p22<sup>phox</sup> lors d'un stress oxydant<sup>354</sup>, est capable de réguler la eNOS<sup>355</sup>, l'arginase<sup>356</sup> et l'expression génique de la COX-2 dans les cellules endothéliales<sup>357</sup>. Des inhibiteurs de p38 MAP Kinase sont en cours de développement et pourraient être intéressants à tester sur notre modèle<sup>358</sup>.

Dans la mesure où environ 40% des patients PR ne répondent pas correctement aux anti-TNF- $\alpha$ , l'évaluation des autres traitements de fond de la PR, sur les modèles animaux et chez les patients, est nécessaire<sup>7</sup>. Compte tenu de nos résultats qui montrent une différence de cinétique de DE entre les lits vasculaires, il conviendra d'étudier l'impact des traitements sur les différents lits vasculaires, en incluant idéalement la circulation coronaire pour plus de prédictivité clinique. Ceci est d'autant plus important que quelques études cliniques ont montré que l'effet des traitements de la PR pouvait être différent selon le territoire considéré. Dans une étude longitudinale, seule la DE microvasculaire (LDI) mais pas la DE macrovasculaire a été améliorée par 2 semaines de traitement avec des anti-TNF- $\alpha$ <sup>276</sup>, et ce, sans lien avec les paramètres d'inflammation systémique (CRP). Une autre étude a montré que le traitement par anti-TNF- $\alpha$  ne modifiait pas le risque de syndrome coronaire aigu<sup>359</sup>. Le MTX diminuerait le risque CV global mais pas le risque d'AVC<sup>140</sup>. Les AINS, quant à eux, augmenteraient le risque CV global, le risque d'AVC mais pas le risque coronaire.

En conclusion, notre travail de thèse conduit sur le modèle AIA chez le rat, a apporté de nouvelles informations sur la physiopathologie de la DE en cas de PR. Nos données suggèrent que le composant vasculaire et le composant articulaire, bien qu'interconnectés, évoluent de façon différente en cas d'arthrite. Nos résultats obtenus sur le modèle AIA devront être confirmés sur d'autres modèles animaux de PR, et idéalement, sur des modèles combinant arthrite et athérosclérose. Un point important devra être résolu pour mieux préciser le rôle de la DE dans le risque CV au cours de la PR : est-ce-que la mesure précoce de la DE, micro et/ou macrovasculaire, est prédictive de la morbidité et de la mortalité CV dans cette maladie? Ces points sont cruciaux, pour améliorer la prise en charge CV des patients PR, autant sur le plan diagnostic que thérapeutique.

## **Références bibliographiques**

1. Firestein GS. Rheumatoid arthritis in a mouse? *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2009;5(1):1.
2. <http://www.rhumatologie.asso.fr>. Société Française de Rhumatologie.
3. Haute Autorité de Santé. 2007.
4. Young A, Koduri G, Batley M, Kulinskaya E, Gough A, Norton S, Dixey J. Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. *Rheumatology (Oxford).* 2007;46(2):350-357.
5. Collège Français des Enseignants en Rhumatologie (COFER) : support de cours. 2011.
6. Prati C. (*Thèse*) : Rôle de l'arginase dans l'atteinte vasculaire associée à l'arthrite chez le rat. Université de Franche-Comté "Ecole doctorale Homme, Environnement, Santé", Besançon; 2012.
7. Astry B, Venkatesha SH, Moudgil KD. Temporal cytokine expression and the target organ attributes unravel novel aspects of autoimmune arthritis. *Indian J Med Res.* 2013;138(5):717-731.
8. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2010;376(9746):1094-1108.
9. Combe B. Cours : « De l'immunopathologie aux traitements de la polyarthrite rhumatoïde », Immuno-Rhumatologie, Hôpital Laheyronie, CHU de Montpellier - Université Montpellier I. 2008.
10. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2001;344(12):907-916.
11. Combe B. Cours sur la Polyarthrite rhumatoïde: "clinique et diagnostic". 2009.
12. Jantti J, Aho K, Kaarela K, Kautiainen H. Work disability in an inception cohort of patients with seropositive rheumatoid arthritis: a 20 year study. *Rheumatology (Oxford).* 1999;38(11):1138-1141.
13. Combe B, Cantagrel A, Goupille P, Bozonnat MC, Sibilia J, Eliaou JF, Meyer O, Sany J, Dubois A, Daures JP, Dougados M. Predictive factors of 5-year health assessment questionnaire disability in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2003;30(11):2344-2349.
14. Arend WP, Firestein GS. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(10):573-586.
15. Scott DL. A simple index to assess disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1993;20(3):582-584.
16. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38(1):44-48.
17. Baker JF, Pullman-Moor S, Ibrahim S. Management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53(10):1721-1722.

18. Gaujoux-Viala C, Gossec L, Cantagrel A, Dougados M, Fautrel B, Mariette X, Nataf H, Saraux A, Trope S, Combe B. Recommendations of the French Society for Rheumatology for managing rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2014;81(4):287-297.
19. Koller MD. Targeted therapy in rheumatoid arthritis. *Wien Med Wochenschr*. 2006;156(1-2):53-60.
20. Koller MD. Targeted therapy in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Drug Discov*. 2008;3(3):329-342.
21. Singh JA, Cameron C, Noorbaloochi S, Cullis T, Tucker M, Christensen R, Ghogomu ET, Coyle D, Clifford T, Tugwell P, Wells GA. Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2015;386(9990):258-265.
22. Atzeni F, Gianturco L, Talotta R, Varisco V, Ditto MC, Turiel M, Sarzi-Puttini P. Investigating the potential side effects of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis: cause for concern? *Immunotherapy*. 2015;7(4):353-361.
23. Schipper LG, Vermeer M, Kuper HH, Hoekstra MO, Haagsma CJ, Den Broeder AA, van Riel P, Fransen J, van de Laar MA. A tight control treatment strategy aiming for remission in early rheumatoid arthritis is more effective than usual care treatment in daily clinical practice: a study of two cohorts in the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring registry. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(6):845-850.
24. Stoffer MA, Schoels MM, Smolen JS, Aletaha D, Breedveld FC, Burmester G, Bykerk V, Dougados M, Emery P, Haraoui B, Gomez-Reino J, Kvien TK, Nash P, Navarro-Compan V, Scholte-Voshaar M, van Vollenhoven R, van der Heijde D, Stamm TA. Evidence for treating rheumatoid arthritis to target: results of a systematic literature search update. *Ann Rheum Dis*. 2015.
25. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Spitz PW, Haga M, Kleinheksel SM, Cathey MA. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1994;37(4):481-494.
26. 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;46(8):2010-2019.
27. Humphreys JH, Warner A, Chipping J, Marshall T, Lunt M, Symmons DP, Verstappen SM. Mortality trends in patients with early rheumatoid arthritis over 20 years: results from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2014;66(9):1296-1301.
28. Kroot EJ, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH, Prevoo ML, Van 't Hof MA, van De Putte LB, van Riel PL. No increased mortality in patients with rheumatoid arthritis: up to 10 years of follow up from disease onset. *Ann Rheum Dis*. 2000;59(12):954-958.
29. Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JE, Stampfer MJ, Curhan GC. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2003;107(9):1303-1307.
30. Navarro-Cano G, Del Rincon I, Pogosian S, Roldan JF, Escalante A. Association of mortality with disease severity in rheumatoid arthritis, independent of comorbidity. *Arthritis Rheum*. 2003;48(9):2425-2433.

31. del Rincon ID, 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(12):2737-2745.
32. Wolfe F, Michaud K, Gefeller O, Choi HK. Predicting mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(6):1530-1542.
33. Humphreys JH, van Nies JA, Chipping J, Marshall T, van der Helm-van Mil AH, Symmons DP, Verstappen SM. Rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibody positivity, but not level, are associated with increased mortality in patients with rheumatoid arthritis: results from two large independent cohorts. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(6):483.
34. Listing J, Kekow J, Manger B, Burmester GR, Pattloch D, Zink A, Strangfeld A. Mortality in rheumatoid arthritis: the impact of disease activity, treatment with glucocorticoids, TNFalpha inhibitors and rituximab. *Ann Rheum Dis.* 74(2):415-421.
35. Kao AH, Krishnaswami S, Cunningham A, Edmundowicz D, Morel PA, Kuller LH, Wasko MC. Subclinical coronary artery calcification and relationship to disease duration in women with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2008;35(1):61-69.
36. Arts EE, Fransen J, den Broeder AA, Popa CD, van Riel PL. The effect of disease duration and disease activity on the risk of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(6):998-1003.
37. Avina-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D. Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis Rheum.* 2008;59(12):1690-1697.
38. Meune C, Touze E, Trinquet L, Allanore Y. Trends in cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis over 50 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48(10):1309-1313.
39. van Halm VP, Peters MJ, Voskuyl AE, Boers M, Lems WF, Visser M, Stehouwer CD, Spijkerman AM, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Smulders YM, Dijkmans BA, Nurmohamed MT. Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease: a cross-sectional study, the CARRE Investigation. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(9):1395-1400.
40. 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;61(11):1571-1579.
41. Lindhardsen J, Ahlehoff O, Gislason GH, Madsen OR, Olesen JB, Torp-Pedersen C, Hansen PR. The risk of myocardial infarction in rheumatoid arthritis and diabetes mellitus: a Danish nationwide cohort study. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(6):929-934.
42. Nurmohamed MT, Kitas G. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis and diabetes: how does it compare and when does it start? *Ann Rheum Dis.* 2011;70(6):881-883.
43. Sodergren A, Karp K, Boman K, Eriksson C, Lundstrom E, Smedby T, Soderlund L, Rantapaa-Dahlqvist S, Wallberg-Jonsson S. Atherosclerosis in early rheumatoid arthritis: very early endothelial activation and rapid progression of intima media thickness. *Arthritis Res Ther.* 12(4):R158.
44. Holmqvist ME, Wedren S, Jacobsson LT, Klareskog L, Nyberg F, Rantapaa-Dahlqvist S, Alfredsson L, Askling J. Rapid increase in myocardial infarction risk following diagnosis of

rheumatoid arthritis amongst patients diagnosed between 1995 and 2006. *J Intern Med.* 2010;268(6):578-585.

45. Maradit-Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, Gabriel SE. Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis Rheum.* 2005;52(2):402-411.
46. Kerola AM, Kauppi MJ, Kerola T, Nieminen TV. How early in the course of rheumatoid arthritis does the excess cardiovascular risk appear? *Ann Rheum Dis.* 2012;71(10):1606-1615.
47. van den Oever IA, van Sijl AM, Nurmohamed MT. Management of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: evidence and expert opinion. *Ther Adv Musculoskeletal Dis.* 2015;5(4):166-181.
48. 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, Kitas 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;69(2):325-331.
49. Nurmohamed MT. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: when does it really start? *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2011;9(4):429-432.
50. Onat A, Direskeneli H. Excess cardiovascular risk in inflammatory rheumatic diseases: pathophysiology and targeted therapy. *Curr Pharm Des.* 2012;18(11):1465-1477.
51. Mason JC, Libby P. Cardiovascular disease in patients with chronic inflammation: mechanisms underlying premature cardiovascular events in rheumatologic conditions. *Eur Heart J.* 2015;36(8):482-489c.
52. Pieringer H, Hoppe UC. [Why rheumatoid arthritis needs cardiologists]. *Z Rheumatol.* 2013;72(4):361-369; quiz 370-361.
53. Levy L, Fautrel B, Barnetche T, Schaeverbeke 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(4):673-679.
54. Meune C, Touze E, Trinquart L, Allanore Y. High risk of clinical cardiovascular events in rheumatoid arthritis: Levels of associations of myocardial infarction and stroke through a systematic review and meta-analysis. *Arch Cardiovasc Dis.* 2010;103(4):253-261.
55. Nurmohamed MT. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2009;8(8):663-667.
56. Ntusi NA, Piechnik SK, Francis JM, Ferreira VM, Matthews PM, Robson MD, Wordsworth PB, Neubauer S, Karamitsos TD. Diffuse Myocardial Fibrosis and Inflammation in Rheumatoid Arthritis: Insights From CMR T1 Mapping. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2015;8(5):526-536.
57. Holmqvist ME, Neovius M, Eriksson J, Mantel A, Wallberg-Jonsson S, Jacobsson LT, Askling J. Risk of venous thromboembolism in patients with rheumatoid arthritis and association with disease duration and hospitalization. *JAMA.* 2012;308(13):1350-1356.
58. Liang KP, Liang KV, Matteson EL, McClelland RL, Christianson TJ, Turesson C. Incidence of noncardiac vascular disease in rheumatoid arthritis and relationship to extraarticular disease manifestations. *Arthritis Rheum.* 2006;54(2):642-648.

- 59.** Bacani AK, Gabriel SE, Crowson CS, Heit JA, Matteson EL. Noncardiac vascular disease in rheumatoid arthritis: increase in venous thromboembolic events? *Arthritis Rheum.* 2012;64(1):53-61.
- 60.** Pieringer H, Pichler M. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with rheumatoid arthritis: vascular alterations and possible clinical implications. *QJM.* 2011;104(1):13-26.
- 61.** Boyer JF, Gourraud PA, Cantagrel A, Davignon JL, Constantin A. Traditional cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Joint Bone Spine.* 2011;78(2):179-183.
- 62.** Pieringer H, Stuby U, Pohanka E, Biesenbach G. Arterial stiffness in a muscular artery in women with longstanding rheumatoid arthritis compared with healthy controls and patients with traditional cardiovascular risk factors. *Rheumatol Int.* 2010;30(10):1335-1339.
- 63.** Chung CP, Oeser A, Avalos I, Gebretsadik T, Shintani A, Raggi P, Sokka T, Pincus T, Stein CM. Utility of the Framingham risk score to predict the presence of coronary atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(6):R186.
- 64.** Crowson CS, Matteson EL, Roger VL, Therneau TM, Gabriel SE. Usefulness of risk scores to estimate the risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Am J Cardiol.* 2012;110(3):420-424.
- 65.** Gonzalez A, Maradit Kremers H, Crowson CS, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, O'Fallon WM, Gabriel SE. Do cardiovascular risk factors confer the same risk for cardiovascular outcomes in rheumatoid arthritis patients as in non-rheumatoid arthritis patients? *Ann Rheum Dis.* 2008;67(1):64-69.
- 66.** Kramer HR, Giles JT. Cardiovascular disease risk in rheumatoid arthritis: progress, debate, and opportunity. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011;63(4):484-499.
- 67.** Panoulas VF, Douglas KM, Milionis HJ, Stavropoulos-Kalinglou A, Nightingale P, Kita MD, Tselios AL, Metsios GS, Elisaf MS, Kitas GD. Prevalence and associations of hypertension and its control in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2007;46(9):1477-1482.
- 68.** Metsios GS, Stavropoulos-Kalinoglou A, Veldhuijzen van Zanten JJ, Treharne GJ, Panoulas VF, Douglas KM, Koutedakis Y, Kitas GD. Rheumatoid arthritis, cardiovascular disease and physical exercise: a systematic review. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47(3):239-248.
- 69.** Panoulas VF, Metsios GS, Pace AV, John H, Treharne GJ, Banks MJ, Kitas GD. Hypertension in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47(9):1286-1298.
- 70.** Dessein PH, Joffe BI, Veller MG, Stevens BA, Tobias M, Reddi K, Stanwix AE. Traditional and nontraditional cardiovascular risk factors are associated with atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2005;32(3):435-442.
- 71.** Kitas GD, Gabriel SE. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: state of the art and future perspectives. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(1):8-14.
- 72.** Manavathongchai S, Bian A, Rho YH, Oeser A, Solus JF, Gebretsadik T, Shintani A, Stein CM. Inflammation and hypertension in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2013;40(11):1806-1811.
- 73.** van Halm VP, Nielen MM, Nurmohamed MT, van Schaardenburg D, Reesink HW, Voskuyl AE, Twisk JW, van de Stadt RJ, de Koning MH, Habibuw MR, van der Horst-Bruinsma IE, Dijkmans BA. Lipids and inflammation: serial measurements of the lipid profile of blood donors who later developed rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(2):184-188.

74. van den Oever IA, van Sijl AM, Nurmohamed MT. Management of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: evidence and expert opinion. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2013;5(4):166-181.
75. Toms TE, Panoulas VF, Douglas KM, Griffiths H, Sattar N, Smith JP, Symmons DP, Nightingale P, Metsios GS, Kitas GD. Statin use in rheumatoid arthritis in relation to actual cardiovascular risk: evidence for substantial undertreatment of lipid-associated cardiovascular risk? *Ann Rheum Dis.* 2010;69(4):683-688.
76. Crowson CS, Liao KP, Davis JM, 3rd, Solomon DH, Matteson EL, Knutson KL, Hlatky MA, Gabriel SE. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease. *Am Heart J.* 2013;166(4):622-628 e621.
77. Garcia-Gomez C, Bianchi M, de la Fuente D, Badimon L, Padro T, Corbella E, Pinto X. Inflammation, lipid metabolism and cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: A qualitative relationship? *World J Orthop.* 2014;5(3):304-311.
78. Toms TE, Panoulas VF, Kitas GD. Dyslipidaemia in rheumatological autoimmune diseases. *Open Cardiovasc Med J.* 2011;5:64-75.
79. Toms TE, Panoulas VF, Douglas KM, Nightingale P, Smith JP, Griffiths H, Sattar N, Symmons DP, Kitas GD. Are lipid ratios less susceptible to change with systemic inflammation than individual lipid components in patients with rheumatoid arthritis? *Angiology.* 2011;62(2):167-175.
80. Liao KP, Liu J, Lu B, Solomon DH, Kim SC. The association between lipid levels and major adverse cardiovascular events in rheumatoid arthritis compared to non-RA. *Arthritis Rheumatol.* 2015.
81. Liao KP, Solomon DH. Editorial: inflammation, disease-modifying antirheumatic drugs, lipids, and cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(2):327-329.
82. Rao VU, Pavlov A, Klearman M, Musselman D, Giles JT, Bathon JM, Sattar N, Lee JS. An evaluation of risk factors for major adverse cardiovascular events during tocilizumab therapy. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(2):372-380.
83. Navarro-Millan I, Charles-Schoeman C, Yang S, Bathon JM, Bridges SL, Jr., Chen L, Cofield SS, Dell'Italia LJ, Moreland LW, O'Dell JR, Paulus HE, Curtis JR. Changes in lipoproteins associated with methotrexate or combination therapy in early rheumatoid arthritis: results from the treatment of early rheumatoid arthritis trial. *Arthritis Rheum.* 2013;65(6):1430-1438.
84. Liao KP, Playford MP, Frits M, Coblyn JS, Iannaccone C, Weinblatt ME, Shadick NS, Mehta NN. The association between reduction in inflammation and changes in lipoprotein levels and HDL cholesterol efflux capacity in rheumatoid arthritis. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(2).
85. Desai RJ, Eddings W, Liao KP, Solomon DH, Kim SC. Disease-modifying antirheumatic drug use and the risk of incident hyperlipidemia in patients with early rheumatoid arthritis: a retrospective cohort study. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2015;67(4):457-466.
86. Ronda N, Greco D, Adorni MP, Zimetti F, Favari E, Hjeltnes G, Mikkelsen K, Borghi MO, Favalli EG, Gatti R, Hollan I, Meroni PL, Bernini F. Newly identified antiatherosclerotic activity of methotrexate and adalimumab: complementary effects on lipoprotein function and macrophage cholesterol metabolism. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(5):1155-1164.
87. Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Mechanisms of premature atherosclerosis in rheumatoid arthritis and lupus. *Annu Rev Med.* 2013;64:249-263.

88. Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus J, Asanuma Y, Sokka T, Pincus T, Raggi P, Gebretsadik T, Shintani A, Stein CM. Inflammatory mediators and premature coronary atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;61(11):1580-1585.
89. Dessein PH, Joffe BI, Stanwix AE, Christian BF, Veller M. Glucocorticoids and insulin sensitivity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2004;31(5):867-874.
90. del Rincon I, Freeman GL, Haas RW, O'Leary DH, Escalante A. Relative contribution of cardiovascular risk factors and rheumatoid arthritis clinical manifestations to atherosclerosis. *Arthritis Rheum.* 2005;52(11):3413-3423.
91. 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;196(2):756-763.
92. Hannawi S, Haluska B, Marwick TH, Thomas R. Atherosclerotic disease is increased in recent-onset rheumatoid arthritis: a critical role for inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(6):R116.
93. Stamatelopoulos KS, Kitas GD, Papamichael CM, Chryssohoou E, Kyrkou K, Georgopoulos G, Protoporou A, Panoulas VF, Sandoo A, Tentolouris N, Mavrikakis M, Sfikakis PP. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis versus diabetes: a comparative study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(10):1702-1708.
94. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C. Implication of new atherosclerotic carotid plaques in the cardiovascular outcome of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(2):105.
95. Giles JT, Post WS, Blumenthal RS, Polak J, Petri M, Gelber AC, Szklo M, Bathon JM. Longitudinal predictors of progression of carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(11):3216-3225.
96. Ambrosino P, Lupoli R, Di Minno A, Tasso M, Peluso R, Di Minno MN. Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. A meta-analysis of literature studies. *Thromb Haemost.* 2015;113(5):916-930.
97. 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(5):669-675.
98. Hannawi S, Marwick TH, Thomas R. Inflammation predicts accelerated brachial arterial wall changes in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(2):R51.
99. Sodergren A, Karp K, Boman K, Eriksson C, Lundstrom E, Smedby T, Soderlund L, Rantapaa-Dahlqvist S, Wallberg-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.
100. Dehghan P, Rajaei A, Moeineddin R, Alizadeh AM. Prevalence of atherosclerosis in patients with inactive rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2015;34(8):1363-1366.
101. Del Rincón I, O'Leary DH, Freeman GL, A E. Acceleration of atherosclerosis during the course of rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis.* 2007;195(2):354-360.
102. Park YB, Ahn CW, Choi HK, Lee SH, In BH, Lee HC, Nam CM, Lee SK. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: morphologic evidence obtained by carotid ultrasound. *Arthritis Rheum.* 2002;46(7):1714-1719.

103. Kobayashi H, Giles JT, Polak JF, Blumenthal RS, Leffell MS, Szklo M, Petri M, Gelber AC, Post W, Bathon JM. Increased prevalence of carotid artery atherosclerosis in rheumatoid arthritis is artery-specific. *J Rheumatol.* 2010;37(4):730-739.
104. Stamatelopoulos KS, Kitas GD, Papamichael CM, Kyrkou K, Zampeli E, Fragiadaki K, Panoulas VF, Mavrikakis M, Sfikakis PP. Subclinical peripheral arterial disease in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis.* 2010;212(1):305-309.
105. Aubry MC, Maradit-Kremers H, Reinalda MS, Crowson CS, Edwards WD, Gabriel SE. Differences in atherosclerotic coronary heart disease between subjects with and without rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2007;34(5):937-942.
106. Stevens RJ, Douglas KM, Saratzis AN, Kitas GD. Inflammation and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Expert Rev Mol Med.* 2005;7(7):1-24.
107. Libby P. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *Am J Med.* 2008;121(10 Suppl 1):S21-31.
108. Corrales A, Gonzalez-Juanatey C, Peiro ME, Blanco R, Llorca J, Gonzalez-Gay MA. Carotid ultrasound is useful for the cardiovascular risk stratification of patients with rheumatoid arthritis: results of a population-based study. *Ann Rheum Dis.* 2013;73(4):722-727.
109. Corrales A, Dessein PH, Tsang L, Pina T, Blanco R, Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Gonzalez-Gay MA. Carotid artery plaque in women with rheumatoid arthritis and low estimated cardiovascular disease risk: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:55.
110. Polak JF, Pencina MJ, Pencina KM, O'Donnell CJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Sr. Carotid-wall intima-media thickness and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2011;365(3):213-221.
111. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Jr., Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation.* 2003;107(3):499-511.
112. Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation.* 2003;108(24):2957-2963.
113. Shen J, Shang Q, Li EK, Leung YY, Kun EW, Kwok LW, Li M, Li TK, Zhu TY, Yu CM, Tam LS. Cumulative inflammatory burden is independently associated with increased arterial stiffness in patients with psoriatic arthritis: a prospective study. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:75.
114. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105(9):1135-1143.
115. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-126.
116. Hahn BH, Grossman J, Chen W, McMahon M. The pathogenesis of atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases: roles of inflammation and dyslipidemia. *J Autoimmun.* 2007;28(2-3):69-75.
117. Choy E, Ganeshalingam K, Semb AG, Szekanecz Z, Nurmohamed M. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: recent advances in the understanding of the pivotal role of inflammation, risk predictors and the impact of treatment. *Rheumatology (Oxford).* 2014;53(12):2143-2154.

- 118.** Bouzerda A, Sabry M, Benyas A, Moustaghfir A, Zbir E, Boukili A M. Le risque cardiovasculaire dans la polyarthrite rhumatoïde cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Rev Mar Rhum* 2013;25:3-7.
- 119.** Fan F, Galvin A, Fang L, White DA, Moore XL, Sparrow M, Cicuttini F, Dart AM. Comparison of inflammation, arterial stiffness and traditional cardiovascular risk factors between rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease. *J Inflamm (Lond)*. 2014;11(1):29.
- 120.** Im CH, Kim NR, Kang JW, Kim JH, Kang JY, Bae GB, Nam EJ, YM. K. Inflammatory burden interacts with conventional cardiovascular risk factors for carotid plaque formation in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(5):808-815.
- 121.** Nurmohamed MT. Editorial: treat to target in rheumatoid arthritis: good for the joints as well as the heart? *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(6):1412-1415.
- 122.** Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum*. 2005;52(3):722-732.
- 123.** Goodson NJ, Symmons DP, Scott DG, Bunn D, Lunt M, Silman AJ. Baseline levels of C-reactive protein and prediction of death from cardiovascular disease in patients with inflammatory polyarthritis: a ten-year followup study of a primary care-based inception cohort. *Arthritis Rheum*. 2005;52(8):2293-2299.
- 124.** Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2004;350(14):1387-1397.
- 125.** Zhang J, Chen L, Delzell E, Muntner P, Hillegass WB, Safford MM, Millan IY, Crowson CS, Curtis JR. The association between inflammatory markers, serum lipids and the risk of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(7):1301-1308.
- 126.** Navarro-Millan I, Yang S, DuVall SL, Chen L, Baddley J, Cannon GW, Delzell ES, Zhang J, Safford MM, Patkar NM, Mikuls TR, Singh JA, Curtis JR. Association of hyperlipidaemia, inflammation and serological status and coronary heart disease among patients with rheumatoid arthritis: data from the National Veterans Health Administration. *Ann Rheum Dis*. 2015.
- 127.** Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Miranda-Filloy JA, Garcia-Porrua C, Llorca J, Martin J. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother*. 2006;60(10):673-677.
- 128.** Book C, Saxne T, Jacobsson LT. Prediction of mortality in rheumatoid arthritis based on disease activity markers. *J Rheumatol*. 2005;32(3):430-434.
- 129.** Myasoedova E, Chandran A, Ilhan B, Major BT, Michet CJ, Matteson EL, Crowson CS. The role of rheumatoid arthritis (RA) flare and cumulative burden of RA severity in the risk of cardiovascular disease. *Ann Rheum Dis*. 2015.
- 130.** Arts EE, Fransen J, den Broeder AA, Popa CD, van Riel PL. The effect of disease duration and disease activity on the risk of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis*. 2004;74(6):998-1003.
- 131.** Jacobsson LT, Turesson C, Gulfe A, Kapetanovic MC, Petersson IF, Saxne T, Geborek P. Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first

cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2005;32(7):1213-1218.

132. Askling J, Fored CM, Geborek P, Jacobsson LT, van Vollenhoven R, Feltelius N, Lindblad S, Klareskog L. Swedish registers to examine drug safety and clinical issues in RA. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(6):707-712.
133. Choi HK, Hernan MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet.* 2002;359(9313):1173-1177.
134. Dixon WG, Watson KD, Lunt M, Hyrich KL, Silman AJ, Symmons DP. 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;56(9):2905-2912.
135. Avouac J, Allanore Y. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: effects of anti-TNF drugs. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9(7):1121-1128.
136. 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;14(3):R117.
137. Foster W, Carruthers D, Lip GY, Blann AD. Relationships between endothelial, inflammatory and angiogenesis markers in rheumatoid arthritis: implications for cardiovascular pathophysiology. *Thromb Res.* 2009;123(4):659-664.
138. Barnabe C, Martin BJ, Ghali WA. Systematic review and meta-analysis: anti-tumor necrosis factor alpha therapy and cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011;63(4):522-529.
139. Skeoch S, Bruce IN. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation? *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(7):390-400.
140. Roubille C, Richer V, Starnino T, McCourt C, McFarlane A, Fleming P, Siu S, Kraft J, Lynde C, Pope J, Gulliver W, Keeling S, Dutz J, Bessette L, Bissonnette R, Haraoui B. The effects of tumour necrosis factor inhibitors, methotrexate, non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids on cardiovascular events in rheumatoid arthritis, psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(3):480-489.
141. Boers M, Nurmohamed MT, Doelman CJ, Lard LR, Verhoeven AC, Voskuyl AE, Huizinga TW, van de Stadt RJ, Dijkmans BA, van der Linden S. Influence of glucocorticoids and disease activity on total and high density lipoprotein cholesterol in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(9):842-845.
142. Wei L, MacDonald TM, Walker BR. Taking glucocorticoids by prescription is associated with subsequent cardiovascular disease. *Ann Intern Med.* 2004;141(10):764-770.
143. Panoulas VF, Douglas KM, Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios GS, Nightingale P, Kita MD, Elisaf MS, Kitas GD. Long-term exposure to medium-dose glucocorticoid therapy associates with hypertension in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47(1):72-75.
144. Davis JM, 3rd, Maradit Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Therneau TM, Roger VL, Gabriel SE. Glucocorticoids and cardiovascular events in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis Rheum.* 2007;56(3):820-830.

145. Gaujoux-Viala C, Gossec L. When and for how long should glucocorticoids be used in rheumatoid arthritis? International guidelines and recommendations. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1318:32-40.
146. 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;33(9):1740-1746.
147. Ajeganova S, Svensson B, Hafstrom I. Low-dose prednisolone treatment of early rheumatoid arthritis and late cardiovascular outcome and survival: 10-year follow-up of a 2-year randomised trial. *BMJ Open.* 2014;4(4):e004259.
148. Bolten WW. Problem of the atherothrombotic potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(1):7-13.
149. Morrison A, Ramey DR, van Adelsberg J, Watson DJ. Systematic review of trials of the effect of continued use of oral non-selective NSAIDs on blood pressure and hypertension. *Curr Med Res Opin.* 2007;23(10):2395-2404.
150. Crilly MA, Mangoni AA. Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) related inhibition of aldosterone glucuronidation and arterial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional clinical study. *BMJ Open.* 2011;1(1):e000076.
151. Trelle S, Reichenbach S, Wandel S, Hildebrand P, Tschannen B, Villiger PM, Egger M, Juni P. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ.* 2011;342:c7086.
152. 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.
153. Micha R, Imamura F, Wyler von Ballmoos M, Solomon DH, Hernan MA, Ridker PM, Mozaffarian D. Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2011;108(9):1362-1370.
154. Westlake SL, Colebatch AN, Baird J, Kiely P, Quinn M, Choy E, Ostör AJ, Edwards CJ. The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49(2):295-307.
155. Hornung N, Ellingsen T, Stengaard-Pedersen K, Poulsen JH. Folate, homocysteine, and cobalamin status in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate, and the effect of low dose folic acid supplement. *J Rheumatol.* 2004;31(12):2374-2381.
156. Rozman B, Praprotnik S, Logar D, Tomsic M, Hojnik M, Kos-Golja M, Accetto R, Dolenc P. Leflunomide and hypertension. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(6):567-569.
157. Ogdie A, Yu Y, Haynes K, Love TJ, Maliha S, Jiang Y, Troxel AB, Hennessy S, Kimmel SE, Margolis DJ, Choi H, Mehta NN, Gelfand JM. Risk of major cardiovascular events in patients with psoriatic arthritis, psoriasis and rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(2):326-332.
158. Wasko MC, Hubert HB, Lingala VB, Elliott JR, Luggen ME, Fries JF, Ward MM. Hydroxychloroquine and risk of diabetes in patients with rheumatoid arthritis. *JAMA.* 2007;298(2):187-193.
159. Shen J, Shang Q, Tam LS. Targeting inflammation in the prevention of cardiovascular disease in patients with inflammatory arthritis. *Transl Res.* 2015.

160. 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;50(3):518-531.
161. Van Doornum S, McColl G, Wicks IP. Atorvastatin reduces arterial stiffness in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(12):1571-1575.
162. Hermann F, Forster A, Chenevard R, Enseleit F, Hurlimann D, Corti R, Spieker LE, Frey D, Hermann M, Riesen W, Neidhart M, Michel BA, Hellermann JP, Gay RE, Luscher TF, Gay S, Noll G, Ruschitzka F. Simvastatin improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(3):461-464.
163. Danninger K, Hoppe UC, Pieringer H. Do statins reduce the cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis? *Int J Rheum Dis*. 2014;17(6):606-611.
164. De Vera MA, Choi H, Abrahamowicz M, Kopec J, Goycochea-Robles MV, Lacaille D. Statin discontinuation and risk of acute myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(6):1020-1024.
165. Arts EE, Jansen TL, Den Broeder A, Vonkeman HE, Dutmer E, Van de Laar MA, Van Riel PL, Fransen J. Statins inhibit the antirheumatic effects of rituximab in rheumatoid arthritis: results from the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring (DREAM) registry. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(5):877-878.
166. Winiarska M, Bil J, Wilczek E, Wilczynski GM, Lekka M, Engelberts PJ, Mackus WJ, Gorska E, Bojarski L, Stoklosa T, Nowis D, Kurzaj Z, Makowski M, Glodkowska E, Issat T, Mrowka P, Lasek W, Dabrowska-Iwanicka A, Basak GW, Wasik M, Warzocha K, Sinski M, Gaciong Z, Jakobisiak M, Parren PW, Golab J. Statins impair antitumor effects of rituximab by inducing conformational changes of CD20. *PLoS Med*. 2008;5(3):e64.
167. Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose. <http://www.nsfa.asso.fr/chercheurs/ressources-medicales/aide-medicale-dans-la-demarche-decisionnelle/le-risque-cardio>.
168. Martin-Martinez MA, Gonzalez-Juanatey C, Castaneda S, Llorca J, Ferraz-Amaro I, Fernandez-Gutierrez B, Diaz-Gonzalez F, Gonzalez-Gay MA. Recommendations for the management of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: scientific evidence and expert opinion. *Semin Arthritis Rheum*. 2014;44(1):1-8.
169. Arts EE, Popa CD, Den Broeder AA, Donders R, Sandoo A, Toms T, Rollefstad S, Ikdahl E, Semb AG, Kitas GD, Van Riel PL, Fransen J. Prediction of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: performance of original and adapted SCORE algorithms. *Ann Rheum Dis*. 2015.
170. Castaneda S, Martin-Martinez MA, Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Garcia-Yebenes MJ, Perez-Vicente S, Sanchez-Costa JT, Diaz-Gonzalez F, Gonzalez-Gay MA. Cardiovascular morbidity and associated risk factors in Spanish patients with chronic inflammatory rheumatic diseases attending rheumatology clinics: Baseline data of the CARMA Project. *Semin Arthritis Rheum*. 2015;44(6):618-626.
171. Solomon DH, Reed GW, Kremer JM, Curtis JR, Farkouh ME, Harrold LR, Hochberg MC, Tsao P, Greenberg JD. Disease activity in rheumatoid arthritis and the risk of cardiovascular events. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(6):1449-1455.
172. Hollan I, Dessein PH, Ronda N, Wasko MC, Svenungsson E, Agewall S, Cohen-Tervaert JW, Maki-Petaja K, Grundtvig M, Karpouzas GA, Meroni PL. Prevention of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2015.

173. Loza E, Lajas C, Andreu JL, Balsa A, Gonzalez-Alvaro I, Illera O, Jover JA, Mateo I, Orte J, Rivera J, Rodriguez Heredia JM, Romero F, Martinez-Lopez JA, Ortiz AM, Toledano E, Villaverde V, Carmona L, Castaneda S. Consensus statement on a framework for the management of comorbidity and extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2015;35(3):445-458.
174. Provan SA, Semb AG, Hisdal J, Stranden E, Agewall S, Dagfinrud H, Angel K, Atar D, Kvien TK. Remission is the goal for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional comparative study. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(5):812-817.
175. Al-Aly Z, Pan H, Zeringue A, Xian H, McDonald JR, El-Achkar TM, Eisen S. Tumor necrosis factor-alpha blockade, cardiovascular outcomes, and survival in rheumatoid arthritis. *Transl Res.* 2011;157(1):10-18.
176. van Breukelen-van der Stoep DF, Zijlmans J, van Zeven D, Klop B, van de Geijn G, van der Meulen N, Hazes M, Birnie E, Cabezas MC. Adherence to cardiovascular prevention strategies in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2015;1-6.
177. Martin-Martinez MA, Castaneda S, Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Diaz-Gonzalez F, Gonzalez-Gay MA. Cardiovascular risk assessment in rheumatoid arthritis: What goals should be achieved? *Semin Arthritis Rheum.* 2015;44(6):e20-21.
178. Nurmohamed MT, Heslinga M, Kitas GD. Cardiovascular comorbidity in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2015.
179. Bouras G, Deftereos S. Editorial (hot topic: cardiovascular disease biomarkers: from tradition to modernity). *Curr Top Med Chem.* 2013;13(2):79-81.
180. Ghitescu L, Robert M. Diversity in unity: the biochemical composition of the endothelial cell surface varies between the vascular beds. *Microsc Res Tech.* 2002;57(5):381-389.
181. Serne EH, de Jongh RT, Eringa EC, RG IJ, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome. *Hypertension.* 2007;50(1):204-211.
182. Sandoo A. *Endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: the role of inflammation and classical cardiovascular disease risk factors on the microvasculature and the macrovasculature.* College of Life and Environmental Sciences: School of Sport and Exercises Sciences, University of Birmingham; 2010.
183. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004;93(1):105-113.
184. Tyagi A, Sethi AK, Girotra G, Mohta M. The microcirculation in sepsis. *Indian J Anaesth.* 2009;53(3):281-293.
185. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation.* 2004;109(21 Suppl 1):II27-33.
186. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007;100(2):158-173.
187. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res.* 2007;100(2):174-190.
188. Hill CE, Phillips JK, Sandow SL. Heterogeneous control of blood flow amongst different vascular beds. *Med Res Rev.* 2001;21(1):1-60.

189. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation*. 2005;111(3):363-368.
190. Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL. Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(9):1631-1674.
191. DAL-ROS S. *Dysfonction endothéliale et pathologies cardiovasculaires: rôle du stress oxydant et effets protecteurs des polyphénols végétaux*: Ecole doctorale: Science de la Vie et de la Santé, Université de Strasbourg; 2009.
192. Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr*. 2012;23(4):222-231.
193. Schini VB, Vanhoutte PM. Role of the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle. *Eur Heart J*. 1993;14 Suppl I:16-21.
194. Schini-Kerth VB. Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis. *Transfus Clin Biol*. 1999;6(6):355-363.
195. Ferrer M, Encabo A, Conde MV, Marin J, Balfagon G. Heterogeneity of endothelium-dependent mechanisms in different rabbit arteries. *J Vasc Res*. 1995;32(5):339-346.
196. Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):932-943.
197. Musa MG, Torrens C, Clough GF. The microvasculature: a target for nutritional programming and later risk of cardio-metabolic disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014;210(1):31-45.
198. Struijker-Boudier HA, Rosei AE, Bruneval P, Camici PG, Christ F, Henrion D, Levy BI, Pries A, Vanoverschelde JL. Evaluation of the microcirculation in hypertension and cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2007;28(23):2834-2840.
199. Poredos P, Jezovnik MK. Testing endothelial function and its clinical relevance. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(1):1-8.
200. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, Hamburg NM, Luscher TF, Shechter M, Taddei S, Vita JA, Lerman A. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation*. 2012;126(6):753-767.
201. Soltesz P, Kerekes G, Der H, Szucs G, Szanto S, Kiss E, Bodolay E, Zeher M, Timar O, Szodoray P, Szegedi G, Szekanecz Z. Comparative assessment of vascular function in autoimmune rheumatic diseases: considerations of prevention and treatment. *Autoimmun Rev*. 2011;10(7):416-425.
202. Kerekes G, Soltesz P, Nurmohamed MT, Gonzalez-Gay MA, Turiel M, Vegh E, Shoenfeld Y, McInnes I, Szekanecz Z. Validated methods for assessment of subclinical atherosclerosis in rheumatology. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(4):224-234.
203. Tousoulis D, Simopoulou C, Papageorgiou N, Oikonomou E, Hatzis G, Siasos G, Tsiamis E, Stefanidis C. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacol Ther*. 2014;144(3):253-267.
204. Benhamou Y, Bellien J, Armengol G, Gomez E, Richard V, Levesque H, Joannides R. [Assessment of endothelial function in autoimmune diseases]. *Rev Med Interne*. 2014;35(8):512-523.

- 205.** Anderson TJ, Phillips SA. Assessment and prognosis of peripheral artery measures of vascular function. *Prog Cardiovasc Dis*. 2015;57(5):497-509.
- 206.** Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315(17):1046-1051.
- 207.** Barac A, Campia U, Panza JA. Methods for evaluating endothelial function in humans. *Hypertension*. 2007;49(4):748-760.
- 208.** Turner J, Belch JJ, Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends Cardiovasc Med*. 2008;18(4):109-116.
- 209.** Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancia G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S, Webb DJ. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005;23(1):7-17.
- 210.** Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002;105(5):546-549.
- 211.** Yan RT, Anderson TJ, Charbonneau F, Title L, Verma S, Lonn E. Relationship between carotid artery intima-media thickness and brachial artery flow-mediated dilation in middle-aged healthy men. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(12):1980-1986.
- 212.** Vlahos AP, Theocharis P, Bechlioulis A, Naka KK, Vakalis K, Papamichael ND, Alfantaki S, Gartzonika K, Mavridis A, Michalis LK, Siamopoulou A. Changes in vascular function and structure in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63(12):1736-1744.
- 213.** Boger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr*. 2004;134(10 Suppl):2842S-2847S; discussion 2853S.
- 214.** Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(2):168-175.
- 215.** Nichols WW. Clinical measurement of arterial stiffness obtained from noninvasive pressure waveforms. *Am J Hypertens*. 2005;18(1 Pt 2):3S-10S.
- 216.** Hirsch L, Shechter A, Feinberg MS, Koren-Morag N, Shechter M. The impact of early compared to late morning hours on brachial endothelial function and long-term cardiovascular events in healthy subjects with no apparent coronary heart disease. *Int J Cardiol*. 2010;151(3):342-347.
- 217.** Shechter M, Issachar A, Marai I, Koren-Morag N, Freinark D, Shahar Y, Shechter A, Feinberg MS. Long-term association of brachial artery flow-mediated vasodilation and cardiovascular events in middle-aged subjects with no apparent heart disease. *Int J Cardiol*. 2009;134(1):52-58.
- 218.** Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, Lima JA, Crouse JR, Herrington DM. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*. 2009;120(6):502-509.

- 219.** Bergholm R, Leirisalo-Repo M, Vehkavaara S, Makimattila S, Taskinen MR, Yki-Jarvinen H. Impaired responsiveness to NO in newly diagnosed patients with rheumatoid arthritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(10):1637-1641.
- 220.** 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(11):2125-2139.
- 221.** 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;63(1):31-35.
- 222.** Komai N, Morita Y, Sakuta T, Kuwabara A, Kashihara N. Anti-tumor necrosis factor therapy increases serum adiponectin levels with the improvement of endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2007;17(5):385-390.
- 223.** Chatterjee Adhikari M, Guin A, Chakraborty S, Sinhamahapatra P, A. G. 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(5):669-675.
- 224.** Wong M, Toh L, Wilson A, Rowley K, Karschimkus C, Prior D, Romas E, Clemens L, Dragicevic G, Harianto H, Wicks I, McColl G, Best J, Jenkins A. Reduced arterial elasticity in rheumatoid arthritis and the relationship to vascular disease risk factors and inflammation. *Arthritis Rheum.* 2003;48(1):81-89.
- 225.** 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;48(1):72-80.
- 226.** Soltesz P, Der H, Kerekes G, Szodoray P, Szucs G, Danko K, Shoenfeld Y, Szegedi G, Szekanecz Z. A comparative study of arterial stiffness, flow-mediated vasodilation of the brachial artery, and the thickness of the carotid artery intima-media in patients with systemic autoimmune diseases. *Clin Rheumatol.* 2009;28(6):655-662.
- 227.** Daoussis D, Panoulas VF, Antonopoulos I, John H, Toms TE, Wong P, Nightingale P, Douglas KM, Kitas GD. Cardiovascular risk factors and not disease activity, severity or therapy associate with renal dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(3):517-521.
- 228.** Foster W, Lip GY, Raza K, Carruthers D, Blann AD. An observational study of endothelial function in early arthritis. *Eur J Clin Invest.* 2012;42(5):510-516.
- 229.** 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;28(5):e53-64.
- 230.** Hansel S, Lassig G, Pistrosch F, Passauer J. Endothelial dysfunction in young patients with long-term rheumatoid arthritis and low disease activity. *Atherosclerosis.* 2003;170(1):177-180.
- 231.** van Eijk IC, Serné EH, Dijkmans BA, Smulders Y, M. N. Microvascular function is preserved in newly diagnosed rheumatoid arthritis and low systemic inflammatory activity. *Clin Rheumatol.* 2011;30(8):1113-1118.

- 232.** Prati C, Demougeot C, Guillot X, Godfrin-Valnet M, Wendling D. Endothelial dysfunction in joint disease. *Joint Bone Spine*. 2014;81(5):386-391.
- 233.** Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Gonzalez-Gay MA. Correlation between endothelial function and carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis patients with long-standing disease. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(3):R101.
- 234.** Yki-Jarvinen H, Bergholm R, Leirisalo-Repo M. Increased inflammatory activity parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in vivo in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(7):630-634.
- 235.** Maki-Petaja KM, Cherian J, Booth AD, Hall FC, Brown J, Wallace SM, Ashby MJ, McEnery 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(3):399-405.
- 236.** Arosio E, De Marchi S, Rigoni A, Prior M, Delva P, Lechi A. Forearm haemodynamics, arterial stiffness and microcirculatory reactivity in rheumatoid arthritis. *J Hypertens*. 2007;25(6):1273-1278.
- 237.** Meyer MF, Schmidt O, Hellmich B, Schatz H, Klein HH, Braun J. Microvascular dysfunction in rheumatoid arthritis assessed by laser Doppler anemometry: relationship to soluble adhesion molecules and extraarticular manifestations. *Rheumatol Int*. 2007;28(2):145-152.
- 238.** Datta D, Ferrell WR, Sturrock RD, Jadhav ST, Sattar N. Inflammatory suppression rapidly attenuates microvascular dysfunction in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis*. 2007;192(2):391-395.
- 239.** Foster W, Carruthers D, Lip GY, Blann AD. Inflammation and microvascular and macrovascular endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: effect of treatment. *J Rheumatol*. 2010;37(4):711-716.
- 240.** 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;13(3):R99.
- 241.** Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C. Inflammation, endothelial function and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(4):122.
- 242.** Steyers CM, 3rd, Miller FJ, Jr. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *Int J Mol Sci*. 2014;15(7):11324-11349.
- 243.** 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;45(16-17):1399-1403.
- 244.** Sandoo A, Protogerou AD, Hodson J, Smith JP, Zampeli E, Sfikakis PP, Kitas GD. The role of inflammation, the autonomic nervous system and classical cardiovascular disease risk factors on subendocardial viability ratio in patients with RA: a cross-sectional and longitudinal study. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):R258.
- 245.** de Groot L, Jager NA, Westra J, Smit AJ, Kallenberg CG, Posthumus MD, Bijl M. Does reduction of disease activity improve early markers of cardiovascular disease in newly diagnosed rheumatoid arthritis patients? *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(7):1257-1261.

- 246.** 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;47(12):1780-1784.
- 247.** 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;37(3):521-528.
- 248.** Hjeltnes G, Hollan I, Forre O, Wiik A, Mikkelsen K, Agewall S. Anti-CCP and RF IgM: predictors of impaired endothelial function in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol*. 2011;40(6):422-427.
- 249.** Kerekes G, Szekanecz Z, Der H, Sandor Z, Lakos G, Muszbek L, Csipo I, Sipka S, Seres I, Paragh G, Kappelmayer J, Szomjak E, Veres K, Szegedi G, Shoenfeld Y, Soltesz 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(3):398-406.
- 250.** Dessein PH, Joffe BI, Singh S. Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(3):R634-643.
- 251.** Rollet-Labelle E, Vaillancourt M, Marois L, Newkirk MM, Poubelle PE, Naccache PH. Cross-linking of IgGs bound on circulating neutrophils leads to an activation of endothelial cells: possible role of rheumatoid factors in rheumatoid arthritis-associated vascular dysfunction. *J Inflamm (Lond)*. 2013;10(1):27.
- 252.** Sandoo A, Chanchani N, Hodson J, Smith JP, Douglas KM, Kitas GD. Classical cardiovascular disease risk factors associate with vascular function and morphology in rheumatoid arthritis: a six-year prospective study. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(6):R203.
- 253.** del Rincon I, Polak JF, O'Leary DH, Battafarano DF, Erikson JM, Restrepo JF, Molina E, Escalante A. Systemic inflammation and cardiovascular risk factors predict rapid progression of atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(6):1118-1123.
- 254.** Santos MJ, Carmona-Fernandes D, Canhao H, Canas da Silva J, Fonseca JE, Gil V. Early vascular alterations in SLE and RA patients--a step towards understanding the associated cardiovascular risk. *PLoS One*. 2012;7(9):e44668.
- 255.** Arida A, Zampeli E, Konstantonis G, Fragiadaki K, Kitas GD, Protoplerou AD, Sfikakis PP. Rheumatoid arthritis is sufficient to cause atheromatosis but not arterial stiffness or hypertrophy in the absence of classical cardiovascular risk factors. *Clin Rheumatol*. 2015;34(5):853-859.
- 256.** Klimek E, Skalska A, Kwasny-Krochin B, Surdacki A, Sulicka J, Korkosz M, Fedak D, Kierzkowska I, Wizner B, Grodzicki TK. Differential associations of inflammatory and endothelial biomarkers with disease activity in rheumatoid arthritis of short duration. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:681635.
- 257.** Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J, Dellasperger KC, Zhang C. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116(3):219-230.
- 258.** Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation*. 1997;96(9):3042-3047.
- 259.** Eriksson EE, Karlof E, Lundmark K, Rotzijus P, Hedin U, Xie X. Powerful inflammatory properties of large vein endothelium in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(4):723-728.

- 260.** Wyble CW, Hynes KL, Kuchibhotla J, Marcus BC, Hallahan D, Gewertz BL. TNF-alpha and IL-1 upregulate membrane-bound and soluble E-selectin through a common pathway. *J Surg Res.* 1997;73(2):107-112.
- 261.** Littler AJ, Buckley CD, Wordsworth P, Collins I, Martinson J, Simmons DL. A distinct profile of six soluble adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-selectin and P-selectin) in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1997;36(2):164-169.
- 262.** Sidiropoulos PI, Siakka P, Pagonidis K, Raptopoulou A, Kritikos H, Tsetis D, Boumpas DT. Sustained improvement of vascular endothelial function during anti-TNFalpha treatment in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol.* 2009;38(1):6-10.
- 263.** Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Sanchez-Andrade A, Garcia-Porrúa C, Martín J, Gonzalez-Gay MA. Short-term adalimumab therapy improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis refractory to infliximab. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24(3):309-312.
- 264.** Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martín J. Inflammation and endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24(2):115-117.
- 265.** Wallberg-Jonsson S, Cvetkovic JT, Sundqvist KG, Lefvert AK, Rantapaa-Dahlqvist S. Activation of the immune system and inflammatory activity in relation to markers of atherothrombotic disease and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002;29(5):875-882.
- 266.** Huang LW, Chang KL, Chen CJ, Liu HW. Arginase levels are increased in patients with rheumatoid arthritis. *Kaohsiung J Med Sci.* 2001;17(7):358-363.
- 267.** Antoniades C, Demosthenous M, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Vlachopoulos C, Toutouza M, Marinou K, Bakogiannis C, Mavragani K, Lazaros G, Koumallos N, Triantafyllou C, Lympériadis D, Koutsilieris M, Stefanadis C. Role of asymmetrical dimethylarginine in inflammation-induced endothelial dysfunction in human atherosclerosis. *Hypertension.* 2011;58(1):93-98.
- 268.** Dimitroulas T, Sandoo A, Kitas GD. Asymmetric dimethylarginine as a surrogate marker of endothelial dysfunction and cardiovascular risk in patients with systemic rheumatic diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13(10):12315-12335.
- 269.** Dimitroulas T, Hodson J, Sandoo A, Smith J, Kitas GD. Symmetric dimethylarginine (SDMA) serum levels in rheumatoid arthritis: correlations with insulin resistance and disease activity scores. *Amino Acids.* 2015.
- 270.** Foster W, Shantsila E, Carruthers D, Lip GY, Blann AD. Circulating endothelial cells and rheumatoid arthritis: relationship with plasma markers of endothelial damage/dysfunction. *Rheumatology (Oxford).* 2009;48(3):285-288.
- 271.** Foster W, Lip GY, Raza K, Carruthers D, Blann AD. An observational study of endothelial function in early arthritis. *Eur J Clin Invest.* 2011;42(5):510-516.
- 272.** Herbrig K, Haensel S, Oelschlaegel U, Pistrosch F, Foerster S, Passauer J. Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with a reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(2):157-163.
- 273.** Murdaca G, Spano F, Cagnati P, Puppo F. Free radicals and endothelial dysfunction: potential positive effects of TNF-alpha inhibitors. *Redox Rep.* 2013;18(3):95-99.
- 274.** Dulai R, Perry M, Twycross-Lewis R, Morrissey D, Atzeni F, Greenwald S. The effect of tumor necrosis factor-alpha antagonists on arterial stiffness in rheumatoid arthritis: a literature review. *Semin Arthritis Rheum.* 2012;42(1):1-8.

- 275.** Mathieu S, Couderc M, Pereira B, Soubrier M. The effects of TNF-alpha inhibitor therapy on arterial stiffness and endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum.* 2013;43(3):e1-2.
- 276.** Sandoo A, van Zanten JJ, Toms TE, Carroll D, Kitas GD. Anti-TNFalpha therapy transiently improves high density lipoprotein cholesterol levels and microvascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012;13:127.
- 277.** Hsue PY, Scherzer R, Grunfeld C, Imboden J, Wu Y, Del Puerto G, Nitta E, Shigenaga J, Schnell Heringer A, Ganz P, Graf J. Depletion of B-cells with rituximab improves endothelial function and reduces inflammation among individuals with rheumatoid arthritis. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(5):e001267.
- 278.** 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;36(4):265-269.
- 279.** Hafstrom I, Rohani M, Deneberg S, Wornert M, Jogestrand T, Frostegard 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;34(9):1810-1816.
- 280.** del Rincon I, O'Leary DH, Haas RW, Escalante A. Effect of glucocorticoids on the arteries in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12):3813-3822.
- 281.** 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;38(2):229-235.
- 282.** Maki-Petaja KM, Booth AD, Hall FC, Wallace SM, Brown J, McEnery 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;50(9):852-858.
- 283.** Flammer AJ, Sudano I, Hermann F, Gay S, Forster A, Neidhart M, Kunzler P, Enseleit F, Periat 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(17):2262-2269.
- 284.** Metsios GS, Stavropoulos-Kalinoglou A, Sandoo A, van Zanten JJ, Toms TE, John H, Kitas GD. Vascular function and inflammation in rheumatoid arthritis: the role of physical activity. *Open Cardiovasc Med J.* 2010;4:89-96.
- 285.** Ranganathan P, Khalatbari S, Yalavarthi S, Marder W, Brook R, Kaplan MJ. Vitamin D deficiency, interleukin 17, and vascular function in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2013;40(9):1529-1534.
- 286.** Ormseth MJ, Oeser AM, Cunningham A, Bian A, Shintani A, Solus J, Tanner SB, Stein CM. Reversing vascular dysfunction in rheumatoid arthritis: improved augmentation index but not endothelial function with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist therapy. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(9):2331-2338.
- 287.** Marder W, Khalatbari S, Myles JD, Hench R, Lustig S, Yalavarthi S, Parameswaran A, Brook RD, Kaplan MJ. The peroxisome proliferator activated receptor-gamma pioglitazone improves vascular function and decreases disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(6):e000441.

- 288.** Bolon B, Stolina M, King C, Middleton S, Gasser J, Zack D, Feige U. Rodent preclinical models for developing novel antiarthritic molecules: comparative biology and preferred methods for evaluating efficacy. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:569068.
- 289.** 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(11):1505-1515.
- 290.** Henderson B, Pettipher ER. Comparison of the in vivo inflammatory activities after intra-articular injection of natural and recombinant IL-1 alpha and IL-1 beta in the rabbit. *Biochem Pharmacol*. 1988;37(21):4171-4176.
- 291.** Feige U, Karbowski A, Rordorf-Adam C, Pataki A. Arthritis induced by continuous infusion of hr-interleukin-1 alpha into the rabbit knee-joint. *Int J Tissue React*. 1989;11(5):225-238.
- 292.** Hart BA, Bank RA, De Roos JA, Brok H, Jonker M, Theuns HM, Hakimi J, Te Koppele JM. Collagen-induced arthritis in rhesus monkeys: evaluation of markers for inflammation and joint degradation. *Br J Rheumatol*. 1998;37(3):314-323.
- 293.** Hart BA, Bontrop RE. The relevance of arthritis research in non-human primates. *Br J Rheumatol*. 1998;37(3):239-242.
- 294.** Vierboom MP, Jonker M, Bontrop RE, t Hart B. Modeling human arthritic diseases in nonhuman primates. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):145-154.
- 295.** Vierboom MP, Zavodny PJ, Chou CC, Tagat JR, Pugliese-Sivo C, Strizki J, Steensma RW, McCombie SW, Celebi-Paul L, Remarque E, Jonker M, Narula SK, Hart B. Inhibition of the development of collagen-induced arthritis in rhesus monkeys by a small molecular weight antagonist of CCR5. *Arthritis Rheum*. 2005;52(2):627-636.
- 296.** Bianchi C. Antibody-induced foot oedema, hyperalgesia and monoarticular arthritis in rats, guinea-pigs and rabbits for testing anti-inflammatory, antiarthritic agents. *Agents Actions*. 1981;11(6-7):750-761.
- 297.** Pearson CM. Development of arthritis, periarthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956;91(1):95-101.
- 298.** Chaudhari SG, Shendkar AK, Chaudhari HR, Duvvuri PL. Rheumatoid Arthritis Pathology, animal models and herbal potential in its treatment : a comprehensive overview. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2014.
- 299.** Philippe L, Gegout-Pottie P, Guingamp C, Bordji K, terlain B, Netter P, Gillet P. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1997.
- 300.** 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(2):140-147.
- 301.** Rainsford KD. Adjuvant polyarthritis in rats: is this a satisfactory model for screening anti-arthritic drugs? *Agents Actions*. 1982;12(4):452-458.
- 302.** Mossiat C, Laroche D, Prati C, Pozzo T, Demougeot C, Marie C. Association between arthritis score at the onset of the disease and long-term locomotor outcome in adjuvant-induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:184.
- 303.** Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1269-1275.

- 304.** Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum.* 2010;62(8):2192-2205.
- 305.** Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 2003;25(1):3-18.
- 306.** Abdalmula A, Washington EA, House JV, Dooley LM, Blacklaws BA, Ghosh P, Bailey SR, Kimpton WG. Clinical and histopathological characterization of a large animal (ovine) model of collagen-induced arthritis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014;159(1-2):83-90.
- 307.** Brand DD. Rodent models of rheumatoid arthritis. *Comp Med.* 2005;55(2):114-122.
- 308.** Holmdahl R, Lorentzen JC, Lu S, Olofsson P, Wester L, Holmberg J, Pettersson U. Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2001;184:184-202.
- 309.** Brahn E. Animal models of rheumatoid arthritis. Clues to etiology and treatment. *Clin Orthop Relat Res.* 1991(265):42-53.
- 310.** Anna-Karin B Lindqvist RB, Asa CM Johansson, Kutty S Nandakumar, Martina Johannesson and Rikard Holmdahl. Mouse models for rheumatoid arthritis. *Trends in Genetics.* 2002;18:S7-S13.
- 311.** van den Berg WB. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(5):250.
- 312.** Schubert R. Isolated vessels. *Practical Methods in Cardiovascular Research.* 2005: 198-211.
- 313.** Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.* 1977;41(1):19-26.
- 314.** Angus JA, Wright CE. Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000;44(2):395-407.
- 315.** Totoson P, Maguin-Gate K, Nappey M, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Microvascular abnormalities in adjuvant-induced arthritis: relationship to macrovascular endothelial function and markers of endothelial activation. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(5):1203-1213.
- 316.** Lu X, Kassab GS. Assessment of endothelial function of large, medium, and small vessels: a unified myograph. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(1):H94-H100.
- 317.** Doughty JM, Plane F, Langton PD. Charybdotoxin and apamin block EDHF in rat mesenteric artery if selectively applied to the endothelium. *Am J Physiol.* 1999;276(3 Pt 2):H1107-1112.
- 318.** Laurant P, Touyz RM, Schiffrin EL. Effect of pressurization on mechanical properties of mesenteric small arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res.* 1997;34(2):117-125.
- 319.** Adrian M, Laurant P, Berthelot A. Effect of magnesium on mechanical properties of pressurized mesenteric small arteries from old and adult rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31(5-6):306-313.
- 320.** Uchida E, Bohr DF, Hoobler SW. A method for studying isolated resistance vessels from rabbit mesentery and brain and their responses to drugs. *Circ Res.* 1967;21(4):525-536.
- 321.** Geiger M, Stone A, Mason SN, Oldham KT, Guice KS. Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 1997;273(1 Pt 1):L275-281.

322. Takamura Y, Shimokawa H, Zhao H, Igarashi H, Egashira K, Takeshita A. Important role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in shear stress--induced endothelium-dependent relaxations in the rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;34(3):381-387.
323. Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2009;202(2):330-344.
324. Heiss C, Sievers RE, Amabile N, Momma TY, Chen Q, Natarajan S, Yeghiazarians Y, Springer ML. In vivo measurement of flow-mediated vasodilation in living rats using high-resolution ultrasound. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(2):H1086-1093.
325. Konishi C, Naito Y, Saito Y, Ohara N, Ono H. Age-related differences and roles of endothelial nitric oxide and prostanoids in angiotensin II responses of isolated, perfused mesenteric arteries and veins of rats. *Eur J Pharmacol.* 1997;320(2-3):175-181.
326. Warner TD. Simultaneous perfusion of rat isolated superior mesenteric arterial and venous beds: comparison of their vasoconstrictor and vasodilator responses to agonists. *Br J Pharmacol.* 1990;99(2):427-433.
327. Totoson P, Maguin-Gate K, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Mechanisms of endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(1):202.
328. Dooley LM, Washington EA, Abdalmula A, Tudor EM, Kimpton WG, Bailey SR. Endothelial dysfunction in an ovine model of collagen-induced arthritis. *J Vasc Res.* 2014;51(2):90-101.
329. Bollmann F, Wu Z, Oelze M, Siuda D, Xia N, Henke J, Daiber A, Li H, Stumpo DJ, Blackshear PJ, Kleinert H, Pautz A. Endothelial dysfunction in tristetraprolin-deficient mice is not caused by enhanced tumor necrosis factor-alpha expression. *J Biol Chem.* 2014;289(22):15653-15665.
330. Mackenzie A, Dunning L, Ferrell WR, Lockhart JC. Angiotensin II Type 1 receptor blockade protects endothelium-derived hyperpolarising factor-mediated relaxation in a rat model of monoarthritis. *Life Sci.* 2013;92(23):1131-1137.
331. Listing J, Kekow J, Manger B, Burmester GR, Pattloch D, Zink A, Strangfeld A. Mortality in rheumatoid arthritis: the impact of disease activity, treatment with glucocorticoids, TNFalpha inhibitors and rituximab. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(2):415-421.
332. 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(8):2309-2317.
333. Krentz AJ, Clough G, Byrne CD. Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: pathophysiology and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab.* 2007;9(6):781-791.
334. Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta.* 2006;368(1-2):33-47.
335. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, Sakihamama 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(6965):454-460.
336. Szekanecz Z, Halloran MM, Volin MV, Woods JM, Strieter RM, Kenneth Haines G, 3rd, Kunkel SL, Burdick MD, Koch AE. Temporal expression of inflammatory cytokines and chemokines in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(6):1266-1277.

- 337.** Carter JL, Lubahn C, Lorton D, Osredkar T, Der TC, Schaller J, Evelsizer S, Flowers S, Ruff N, Reese B, Bellinger DL. Adjuvant-induced arthritis induces c-Fos chronically in neurons in the hippocampus. *J Neuroimmunol.* 2011;230(1-2):85-94.
- 338.** Ackerman NR, Rooks WH, 2nd, Shott L, Genant H, Maloney P, West E. Effects of naproxen on connective tissue changes in the adjuvant arthritic rat. *Arthritis Rheum.* 1979;22(12):1365-1374.
- 339.** Haruna Y, Morita Y, Yada T, Satoh M, Fox DA, Kashihara N. Fluvastatin reverses endothelial dysfunction and increased vascular oxidative stress in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(6):1827-1835.
- 340.** Haruna Y, Morita Y, Komai N, Yada T, Sakuta T, Tomita N, Fox DA, Kashihara 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(6):1847-1855.
- 341.** 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(5):1319-1328.
- 342.** Can C, Cinar MG, 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(4):401-410.
- 343.** Cinar MG, Can C, Ulker S, Gok S, Coker C, Soykan N, Kosay S, Evinc A. Effect of vitamin E on vascular responses of thoracic aorta in rat experimental arthritis. *Gen Pharmacol.* 1998;31(1):149-153.
- 344.** Kolluru GK, Siamwala JH, Chatterjee S. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie.* 2010;92(9):1186-1198.
- 345.** Domsic RT, Dezfulian C, Shoushtari A, Ivanco D, Kenny E, Kwok CK, Medsger TA, Jr., Champion HC. Endothelial dysfunction is present only in the microvasculature and microcirculation of early diffuse systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2014;32(6 Suppl 86):S-154-160.
- 346.** Lacraz G, Giroix MH, Kassis N, Coulaud J, Galinier A, Noll C, Cornut M, Schmidlin F, Paul JL, Janel N, Irminger JC, Kergoat M, Portha B, Donath MY, Ehses JA, Homo-Delarche F. Islet endothelial activation and oxidative stress gene expression is reduced by IL-1Ra treatment in the type 2 diabetic GK rat. *PLoS One.* 2009;4(9):e6963.
- 347.** Vallejo S, Palacios E, Romacho T, Villalobos L, Peiro C, Sanchez-Ferrer CF. The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13:158.
- 348.** Guzman-Gutierrez E, Arroyo P, Salsoso R, Fuenzalida B, Saez T, Leiva A, Pardo F, Sobrevia L. Role of insulin and adenosine in the human placenta microvascular and macrovascular endothelial cell dysfunction in gestational diabetes mellitus. *Microcirculation.* 2014;21(1):26-37.
- 349.** Helli B, Mowla K, Mohammadshahi M, Jalali MT. Effect of Sesamin Supplementation on Cardiovascular Risk Factors in Women with Rheumatoid Arthritis. *J Am Coll Nutr.* 2015;1-8.
- 350.** Girard-Thernier C, Pham TN, Demougeot C. The Promise of Plant-Derived Substances as Inhibitors of Arginase. *Mini Rev Med Chem.* 2015;15(10):798-808.

351. Koc, Kucukguzel SG. Medicinal chemistry and anti-inflammatory activity of nitric oxide-releasing NSAID drugs. *Mini Rev Med Chem.* 2009;9(5):611-619.
352. Gomez-Puerta JA, Celis R, Hernandez MV, Ruiz-Esquide V, Ramirez J, Haro I, Canete JD, Sanmarti R. Differences in synovial fluid cytokine levels but not in synovial tissue cell infiltrate between anti-citrullinated peptide/protein antibody-positive and -negative rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(6):R182.
353. Sandoo A, Hodson J, Douglas KM, Smith JP, Kitas GD. The association between functional and morphological assessments of endothelial function in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R107.
354. Kassan M, Choi SK, Galan M, Lee YH, Trebak M, Matrougui K. Enhanced p22phox expression impairs vascular function through p38 and ERK1/2 MAP kinase-dependent mechanisms in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;306(7):H972-980.
355. Anter E, Thomas SR, Schulz E, Shapira OM, Vita JA, Keaney JF, Jr. Activation of endothelial nitric-oxide synthase by the p38 MAPK in response to black tea polyphenols. *J Biol Chem.* 2004;279(45):46637-46643.
356. 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(5):C1181-1192.
357. Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, James MJ. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol.* 2001;167(5):2831-2838.
358. Guarnieri F. Designing an orally available nontoxic p38 inhibitor with a fragment-based strategy. *Methods Mol Biol.* 2015;1289:211-226.
359. Ljung L, Simard JF, Jacobsson L, Rantapaa-Dahlqvist S, Askling J. Treatment with tumor necrosis factor inhibitors and the risk of acute coronary syndromes in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(1):42-52.

## **Titre : « Dysfonction endothéliale et polyarthrite rhumatoïde : cinétique d'évolution, mécanismes et traitements. Étude chez le rat ».**

### **Résumé**

La polyarthrite rhumatoïde (PR) représente le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. En plus d'une atteinte ostéo-articulaire responsable de l'invalidité fonctionnelle, la PR est associée à une surmortalité d'origine cardiovasculaire (CV). Les données récentes de la littérature identifient la dysfonction endothéliale (DE) comme la pierre angulaire du processus athéromateux et des complications CV au cours de la PR. Cependant, la physiopathologie et les possibilités thérapeutiques de cette DE sont mal connues. L'objectif de mon travail a été d'étudier la cinétique de la DE au cours de la PR, la différence de sa survenue entre les lits macrovasculaire et microvasculaire, le lien entre la DE et des marqueurs circulants d'inflammation ou d'activation endothéliale, et l'impact de l'Etanercept, un anti-TNF $\alpha$  utilisé comme traitement de fond de la PR, sur la DE. Les expériences ont été réalisées sur le modèle d'Arthrite Induite à l'Adjuvant (AIA) chez le rat Lewis, la fonction endothéliale étant étudiée sur des anneaux aortiques isolés (macrocirculation) ou des artères mésentériques isolées (microcirculation).

Dans la première étude, nous avons montré que la DE microvasculaire est d'apparition plus précoce que la DE macrovasculaire (premiers symptômes d'arthrite versus inflammation maximale), et plus durable. Les taux circulants de CRP, ICAM-1 et VCAM-1 ne peuvent pas être utilisés comme marqueurs de DE dans l'arthrite.

Dans la deuxième étude, nos résultats ont montré que, malgré l'absence de DE aortique au stade précoce de l'arthrite (premiers symptômes d'arthrite), les anomalies endothéliales sont déjà présentes mais initialement compensées par une augmentation de l'activité de la NOS. Nous avons identifié l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et le MIP-1 $\alpha$  plasmatiques comme des marqueurs circulants potentiels de la DE macrovasculaire dans la PR.

Notre troisième étude a démontré la capacité d'un traitement curatif par Etanercept : un anti TNF- $\alpha$ , à améliorer la fonction endothéliale dans le modèle AIA, indépendamment de son impact sur les facteurs traditionnels de risque CV et sur la sévérité de la maladie.

En conclusion, nos travaux ont permis de mieux comprendre la DE en cas d'arthrite, et ont apporté des éléments qui ouvrent des perspectives diagnostiques et thérapeutiques pour une meilleure prise en charge du risque CV du patient PR.

### **Mots-clés**

- |                                   |                        |
|-----------------------------------|------------------------|
| <b>1 Polyarthrite rhumatoïde</b>  | <b>5 Modèle animal</b> |
| <b>2 Dysfonction endothéliale</b> | <b>6 Etanercept</b>    |
| <b>3 Inflammation</b>             | <b>7 Thérapeutique</b> |
| <b>4 Cardiovasculaire</b>         | <b>8 Diagnostic</b>    |

## **Title: “Endothelial dysfunction and Rheumatoid arthritis: time-course, mechanisms and treatment. Study in adjuvant-induced arthritis rat model”.**

### **Abstract**

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common systemic autoimmune disease which is associated with excessive cardiovascular (CV) mortality and morbidity. Endothelial dysfunction (ED) has been identified as a key element in the development of atherosclerosis and CV complications in RA. However, both pathophysiology and therapeutic options of ED are still ill-defined. In this work we aimed to determine the time-course of ED in RA, the differences of ED between macro- and microvasculature, the link between ED and circulating markers of inflammation or endothelial activation, and the effect of an anti-TNF $\alpha$  agent, Etanercept, for reversing ED. Experiments have been conducted on the model of adjuvant-induced arthritis (AIA) in Lewis rats. Endothelial function was assessed in isolated aortic rings (macrovasculature) and in isolated mesenteric arteries (microvasculature).

In a first study, we showed that ED occurred earlier in microvascular bed (first symptoms of arthritis) than in macrovascular bed (at maximal inflammation), and is more sustainable. Circulating levels of CRP, ICAM-1 and VCAM-1 cannot be used as markers of ED in arthritis.

In a second study, we characterized the mechanisms involved in ED in AIA rats. Our results showed that despite the absence of aortic ED in the early stage of arthritis (first symptoms of arthritis), endothelial abnormalities are already present but initially compensated by an increase in NOS activity. We identified plasma levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  as potential circulating markers of macrovascular ED in RA.

Our third study demonstrated the ability of a curative treatment with Etanercept, an anti-TNF $\alpha$ , to improve endothelial function in the AIA model, regardless its impact on traditional CV risk factors and on the severity of the disease.

In conclusion, our results led to improve the understanding of ED in case of arthritis. They provide diagnostic and therapeutic perspectives to enhance the management of CV risk in RA patients.

### **Keywords**

- 1   Rheumatoid arthritis**
- 2   Endothelial dysfunction**
- 3   Inflammation**
- 4   Cardiovascular**

- 5   Animal model**
- 6   Etanercept**
- 7   Therapeutic**
- 8   Diagnosis**