

Dysfonction endothéliale au niveau de différents territoires vasculaires en cas de polyarthrite rhumatoïde : physiopathologie et perspectives thérapeutiques

Romain Bordy

▶ **To cite this version:**

Romain Bordy. Dysfonction endothéliale au niveau de différents territoires vasculaires en cas de polyarthrite rhumatoïde : physiopathologie et perspectives thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT : 2019UBFCE009 . tel-02464644

HAL Id: tel-02464644
https://theses.hal.science/tel-02464644

Submitted on 3 Feb 2020

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PREPAREE A UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE SCIENCES DE LA SANTE

Ecole doctorale n°554

Ecole Doctorale Environnement-Santé

Doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Monsieur BORDY Romain

Dysfonction endothéliale au niveau de différents territoires vasculaires en cas de polyarthrite rhumatoïde : physiopathologie et perspectives thérapeutiques

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 25 octobre 2019

Composition du Jury :

Madame LEBLAIS Véronique	PU, Univrsité de Paris Sud	Rapporteur
Madame NIEDERHOFFER Nathalie	MCU-HDR, Université de Strasbourg	Rapporteur
Monsieur CLERE Nicolas	MCU, Université d'Angers	Examinateur
Madame DEMOUGEOT Céline	PU, Université de Bourgogne Franche-Comté	Directrice de thèse
Monsieur WENDLING Daniel	PU-PH, Université de Bourgogne Franche-Comté	Codirecteur de thèse
Madame TOTOSON Perle	MCU, Université de Bourgogne Franche-Comté	Codirectrice de thèse

Remerciements

Ce manuscrit de thèse est le résultat de 3 années de travail menées au sein du laboratoire de physiologie-pharmacologie de l'équipe EA4267 PEPITE de l'UFR Sciences de la Santé de Besançon. Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes qui m'ont encouragé à oser travailler dans le domaine de la recherche, et qui m'ont encadré, soutenu, supporté et qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

A ma directice de thèse, Professeur Céline Demougeot. Je vous remercie très sincèrement pour votre confiance et votre encadrement depuis mon Master 2 et durant tout ce projet de thèse. J'ai énormément apprécié travailler à vos côtés, et vous exprime toute ma reconnaissance pour votre savoir, votre dynamisme, votre rigueur et vos conseils qui ont permis de mener à bien ce projet et qui m'ont énormément apporté tant sur les plans professionnel que personnel. Grâce à vous, ma passion va devenir ma profession, et je vous en remercie.

A ma co-directrice de thèse, Docteur Perle Totoson. Je te remercie pour ce co-encadrement qui t'aura demandé beaucoup de temps et de patience. Merci pour tout le savoir théorique et pratique que tu m'as transmis pour mener à bien ce travail, pour toutes ces heures passées à résoudre les difficultés techniques et tous ces petits moments de joie quand nous arrivions à une solution ou un résultat satisfaisant. Je t'exprime toute ma gratitude pour ta disponibilité, ton aide sans faille, ta rigueur et ton sourire indélébile.

A mon co-directeur de thèse, Professeur Daniel Wendling. Je vous remercie pour votre soutien et votre disponibilité en toute circonstance durant tout ce projet. Vos remarques et vos conseils m'ont permis de toujours aller plus loin dans ma réflexion et de mieux appréhender les retombées cliniques de ce travail expérimental.

A mes membres de jury, Professeur Veronique Leblais, Docteur Nathalie Niederhoffer, Docteur Nicolas Clere. Je vous exprime ma reconnaissance d'accepter de faire partie de mon jury en tant que rapporteur et examaminateur malgré vos impératifs.

Je témoigne toute ma gratitude pour leur soutien et leur collaboration **à l'équipe INSERM U1180 de Chatenay-Malabry** pour l'apprentissage de la technique des coronaires isolées ; **à l'équipe EA3452 CITHEFOR de Nancy** pour l'apprentissage de la technique des artères cérébrales isolées ; **à l'équipe INSERM U1093 de Dijon** pour les manipulations d'immunohistochimie ; **à l'équipe de rhumatologie du CHRU Jean Minjoz de Besançon** pour la réalisation des radiographies X.

A tout le laboratoire de physiologie-pharmacologie. Sylvie Devaux, Johnny Moretto je vous remercie pour votre accompagnement et votre aide durant ce projet pour la réalisation des manipulations et le traitement des résultats, mais également pour votre confiance sur mes heures d'enseignement. Maude Tournier-Nappey, je te remercie pour tout le soutien que tu m'apporté tant par les paroles, que l'aide dans les manipulations, mais aussi dans nos fous rires. Sandrine Geloso, pour le café le matin et pour tous ces moments de discussion qui ont rendu agréables le quotidien au laboratoire et qui permettent de s'aérer la tête.

Je dédie cette thèse,

A mes parents. Vous êtes toujours là, battants, prêts à tout pour m'aider et m'accompagner. Moi non plus je ne pensais pas aller si loin sans catapulte, et pourtant nous sommes à la deuxième

soutenance. Merci pour tout ce que vous avez fait et ce que vous ferez encore pour moi. Je vous aime.

A mon petit frère. Thibaut, nous avons toujours été là l'un pour l'autre et ce n'est pas fini ! Même à distance on arrivera encore à trouver les pires idées à faire ! Je t'aime petit fère !

A Romain. Tu es encore et toujours là avec moi, à m'aider et à me soutenir. Promis, je serai aussi présent pour tes 3 années qui s'annoncent. Je t'aime.

A mes grands-parents et mon regretté grand-père. Merci pour votre présence et votre aide, votre écoute patiente et votre soutien. Merci de continuer à être là pour moi. Je vous aime.

A mes oncles, tantes, parrain, marraine et cousins. Merci pour votre aide, votre soutien et vos vannes intarissables, et aussi pour tous ces moments en famille. Je vous aime.

A toute l'équipe EA4267 pour votre aide et votre soutien indéfectible. Pour vos reflexions, ces moments de discussion qui permettent d'avancer efficacement dans les manipualtions, l'enseignement mais également de façon générale.

A mes co-doctorants, Raphaël, Ryma, Jason, Danièle, Claire (cherchez l'intrus …). Pour votre soutien, nos discussion qui permettent de sortir la tête de l'eau, pour nos soirées, avec une mention spéciale pour le billard, nos moments de rire et de crainte. Ces années ont été plus faciles à vivre grâce à vous. Merci les amis !

A mes amis de fac, Aurore, Camille, Gwenaëlle, Justine. Même en étant séparés nous avons continué nos délires et nos soirées. Maintenant c'est mon tour de m'éloigner, mais nous continuerons de nous voir pour perpétuer ces bons moments (je vous dois encore une daube, et maintenant vous faire visiter Amiens !)

A mes parrains et marraines, Clémence, Eléonore, Olivier. Merci pour votre présence et votre soutien durant mes études et durant ces années de thèse. Grâce à vous j'ai continué à appréhender les traditions et la coutume et j'espère avoir été à la hauteur de vos attentes durant toutes ces années estudiantines.

A mes fillots et fillotes, Bertille, Nathaël, Benjamin, Diandra, Mélanie, Julie, Julien, Thibaut, Yoni, Maxime, Audrey et Fabien. Je suis toujours aussi surpris d'avoir formé autant de jeunes motivés, et d'avoir cousu autant de capes ! Merci pour ce que vous avez fait pour moi. Bon vent et continuez à perpétuer notre histoire dans la foi des traditions. Je suis extrêmement fier de vous !

A tous les copains. Merci à vous tous, pour tout ce que vous avez pu faire avec moi et pour moi.
Les copains du primaire, du collège et du lycée, les copains de fac, les copains du folklore des autres villes (mention spéciale pour mon parrain David qui a eu la patience de lire tout ce manuscrit), les copains de soirée, les fondateurs du Pharm'in Shape, mes fillots de cœur, ainsi que mes chers étudiants pour votre implication (désolé de ne pas tous vous citer mais j'ai peur d'en oublier et je ne peux pas faire un volume dédié aux remerciements).

Merci à vous tous.

« Nous devons être disposés à renoncer à la vie que nous avons imaginée
afin de vivre celle qui nous attend. »
Joseph Campbell

Table des matières

Table des matières I

Liste des abréviations VII

Liste des figures IX

Liste des tableaux XI

Liste des productions scientifiques liées au projet de thèse XIII

Partie 1 : Revue de littérature 1

1 La polyarthrite rhumatoïde 1

1.1 Définition, épidémiologie et étiologie 1

1.2 Physiopathologie 2

1.3 Diagnostic 5

1.3.1 Diagnostic clinique 5

1.3.2 Diagnostic radiologique 6

1.3.3 Diagnostic biologique 7

1.3.4 Diagnostics différentiels 9

1.4 Symptomatologie et évolution 10

1.4.1 Polyarthrite rhumatoïde précoce 10

1.4.2 Polyarthrite rhumatoïde tardive 11

1.4.2.1 Manifestations articulaires 11

1.4.2.2 Manifestations extra-articulaires 13

1.4.3 Evolution 13

1.5 Suivi de la pathologie 14

1.5.1 Le *Disease Activity Score 28* 14

1.5.2 Le *Simplified Disease Activity Index* 15

1.5.3 Le *Clinical Disease Activity Index* 15

1.5.4 Le *Health Assessment Questionnaire* 16
1.6 Traitements 16
1.6.1 Traitements symptomatiques 17
1.6.2 Traitements de fond 18
1.6.2.1 csDMARDs 18
1.6.2.2 bDMARDs 19
1.6.2.3 tsDMARDs 19
1.6.2.4 Thérapies adjuvantes 19
1.6.3 Recommandations de prise en charge 20
1.6.3.1 Traitement de première ligne 21
1.6.3.2 Traitements de deuxième ligne et plus 21
1.6.3.3 Gestion de la rémission et prise en charge globale 21
2 La polyarthrite rhumatoïde et le risque cardiovasculaire 22
2.1 Prévalence 22
2.2 Atteintes cardiovasculaires 23
2.3 Atteintes cérébrovasculaires 25
2.4 Evaluation et recommandations de prise en charge du risque cardiovasculaire chez le patient et leurs limites 27
2.5 Mécanismes impliqués dans le sur-risque cardiovasculaire 30
2.5.1 Facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels 30
2.5.1.1 Hypertension artérielle 30
2.5.1.2 Dyslipidémie 31
2.5.1.3 Obésité 32
2.5.1.4 Insulinorésistance 32
2.5.1.5 Age 33

2.5.1.6 Tabagisme 33
2.5.2 Athérome et athérosclérose 33
2.5.3 Inflammation 36
2.6 Effet des traitements sur le risque cardiovasculaire 39
2.6.1 csDMARDs 39
2.6.2 bDMARDS 40
2.6.3 tsDMARDs 41
2.6.4 Anti-inflammatoires non stéroïdiens et stéroïdiens 41
2.6.5 Thérapies adjuvantes 42
2.6.6 Prise en charge non-médicamenteuse 43
3 La polyarthrite rhumatoïde et la dysfonction endothéliale 45
3.1 Les différents lits vasculaires 45
3.2 L'endothélium 46
3.2.1 Fonction endothéliale : médiateurs et mécanismes 47
3.2.2 Différences entre lits vasculaires 49
3.2.2.1 Les particularités de la circulation coronarienne 50
1) Régulation humorale 51
2) Régulation métabolique 52
3) Régulation nerveuse 52
4) Régulation mécanique / autorégulation 53
3.2.2.2 Les particularités de la circulation cérébrale 53
1) Régulation humorale 55
2) Régulation métabolique 55
3) Régulation nerveuse 55
4) Régulation mécanique / autorégulation 56

3.3 La dysfonction endothéliale dans la polyarthrite rhumatoïde 56

3.3.1 Dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance 56

3.3.1.1 Méthodes d'exploration de la fonction endothéliale au niveau des artères de conductance 57

1) Chez l'Homme 57

a) Vasodilatation dépendante du flux ou Flow-mediated dilation 57

b) Réactivité des artères coronaires épicardiques 57

2) Chez l'animal : technique de vaisseaux isolés en condition isométrique 57

3.3.1.2 Données cliniques : dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance 59

1) Etat des lieux 59

2) Mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance 61

a) Facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels 62

b) Génétique 62

c) Composant auto-immun 62

d) Inflammation 63

3) Marqueurs circulants de la dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance 63

4) Effet des traitements sur la dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance 64

a) Traitements de la PR 64

a.1 csDMARDs 65

a.2 bDMARDs 65

a.3 tsDMARDs 66

a.4 Glucocorticoïdes 66

a.5 AINS 66

b) Thérapies adjuvantes 66

3.3.1.3 Données expérimentales : dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance 67

1) Les modèles murins de polyarthrite rhumatoïde 67

a) Modèle d'arthrite induite à l'adjuvan 68

b) Le modèle d'arthrite induite au collagène 68

2) Mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance 69

3) Effets des traitements sur la dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance 71

3.3.2 Dysfonction endothéliale au niveau des artères de résistance 72

3.3.2.1 Méthodes d'exploration de la fonction endothéliale des artères de résistance 72

1) Chez l'Homme 72

a) Pléthysmographie de l'artère brachiale ou Forearm perfusion technique 72

b) Venous occlusion plethysmography ou forearm blood flow 72

c) Iontophorèse couplée au Laser Doppler 73

d) Pléthysmographie digitale 73

e) Réserve de flux coronaire ou coronary flow reserve 73

f) Le rapport de viabilité sous-endorcardique ou Sub-endocardial viability ratio . 73

g) Doppler transcrânien 74

2) Chez l'animal 74

a) Technique de vaisseaux isolés en conditions isométriques avec le myographe de Mulvany 74

b) Technique de vaisseaux isolés en conditions isobariques avec l'artériographe de Halpern 75

c) Techniques in vivo 77

3.3.2.2 Dysfonction endothéliale au niveau des artères de résistance et polyarthrite rhumatoïde : état de l'art des données cliniques et expérimentales 78

Partie 2 : Travaux personnels 97

1. Objectifs de la thèse 97

2 Travaux personnels 98

2.1 1ère étude 98

2.1.1 Contexte et objectifs 98

2.1.2 Méthodologie 99

2.1.3 Principaux résultats 100

2.2 2ème étude 109

2.2.1 Contexte et objectifs 109

2.2.2 Méthodologie 110

2.2.3 Principaux résultats 111

2.3 3ème étude 125

2.3.1 Contexte et objectifs 125

2.3.2 Méthodologie 127

2.3.3 Principaux résultats 128

3ème partie : Discussion générale et perspectives 156

1. Effets du méthotrexate sur la dysfonction endothéliale aortique 156

2 Etude de la dysfonction cérébrovasculaire 161

3 Etude de la dysfonction coronaire et cardiaque 165

Biliographie 170

Liste des abréviations

Ac : anticorps
Ach : acétylcholine
ACR : *American college of Rheumatology*
ADMA : diméthylarginine asymétrique
ADP : adenosine diphosphate
AIA : arthrite induite à l'adjuvant
AINS : anti-inflammatoire non-stéroïdien
AIT : accident vasculaire transitoire
Ang II : angiotensine II
AP : activité physique
Apo : apolipoprotéine
ARA II : antagonistes du récepteur à l'angiotensine II
AT_1 : récepteur à l'angiotensine II de type 1
AVC : accident vasculaire cérébral
BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*
BH_2 : dihydrobioptérine
BH_4 : tétrahydrobioptérine
BHE : barrière hémato-encéphalique
BK : bradykinine
BMP-4 : *bone morphogenetic protein 4*
BNP : *brain natriuretic peptide*
CDAI : *clinical disease activité index*
CFR : *coronary flow rserve*
CIA : arthrite induite au collagène
cIMT : *carotid intima-media thickness*
COX : cyclo-oxygénase
CPK : créatine phosphokinase
CRP : protéine C réactive
CT : cholestérol total
CV : cardiovasculaire
DAS28 : *disease activity score 28*
DE : dysfonction endothéliale
DMARD : *disease-modifying anti-rheumatic drug*
DSC : debit sanguine cerebral
EDCF : *endothelium-derived constricting factors*
EDHF : *endothelium-derived hyperpolarizing factors*
EDRF : *endothelium-derived relaxing factors*
ET-1 : endothéline-1
ETP : éducation thérapeutique du patient
EULAR : *European league against rheumatisms*
FBF : *forearm blood flow*
FE : fonction endothéliale
FMD : *flow mediated dilation*
FR : facteur rhumatoïde
FRS : score de Framingham
HAQ : *health assessment questionnaire*
Hcy : homocystéine
HDL : *high density lipoproteins*
HTA : hypertension artérielle
IC : insuffisance cardiaque
ICAM-1 : *intracellular adhesion molecule-1*
IDM : infarctus du myocarde
IEC = inhibiteurs de l'enzyme de conversion
IL : interleukine
INFγ : interféron γ
IRM : imagerie par résonnace magnétique
JAK : Janus kinase
LB : lymphocyte B
LDF : laser doppler associé au flux
LDH : lactate déshydrogénase
LDi : laser doppler de type *imaging*
LDL : *low density lipoproteins*
L-NAME : N_w-nitro-L-arginine methyl ester
LT : lymphocyte T
MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein-1*
MPO : myéloperoxidase
MTX : methotrexate
NADPH : β-nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NO : monoxyde d'azote
Nor-NOHA : N_w-hydroxy-nor-L-arginine
NOS : NO synthase
NOX : NADPH oxydase
$O_2^{-\bullet}$: anion superoxyde
PGI_2 : prostaglandine I_2
PIA : arthrite induite au pristane
PN : polynucléaire
PR : polyarthrite rhumatoïde
PTX3 : pentraxine 3
RHI : *reactive hyperemic index*
ROS : espèces réactives de l'oxygène
SCORE : *systematic coronary risk evaluation*
SDAI : *simplified disease activity index*
SEVR : *sub-endocardial viability ration*
SFR : société française de rhumatologie
SNP : nitroprussiate de sodium
TG : triglycérides
TNFα : *tumor necrosis α*
TTC : chlorure de triphényltétrazolium
TXA_2 : thromboxane A_2
VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule-1*
VOP : vitesse d'onde de pouls
VS : vitesse de sédimentation

Liste des figures

Figure 1 – Mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression de la polyarthrite rhumatoïde 3

Figure 2 – Radiographie de la main droite d'une patiente atteinte de polyarthrite rhumatoïde en phase tardive 7

Figure 3 – Atteinte inflammatoire précoce de la main 10

Figure 4 – Déformations caractéristiques de la main..... 12

Figure 5 – Atteinte d'un pied de patiente souffrant de polyarthrite rhumatoïde 12

Figure 6 – Algorithme de prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde 20

Figure 7 – Evaluation du risque cardiovasculaire par le modèle SCORE 29

Figure 8 – Facteurs impliqués dans le sur-risque cardiovasculaire du pateint polyartrhite rhumtoïde 44

Figure 9 – Schéma des différentes tuniques d'une artère et d'une veine 45

Figure 10 - Schéma représentatif de la proportion NO/EDHF selon les lits vasculaires 50

Figure 11 – Représentation schématique de l'anatomie du lit vasculaire coronaire 51

Figure 12 – Schéma de la circulation cérébrale à la base du cerveau..... 54

Figure 13 – Schéma du montage technique de la réactivité vasculaire sur anneau aortique isolé.. 58

Figure 14 – Schéma des mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale observés chez le rat arthritique 70

Figure 15 – Schéma de montage du myographe de Mulvany..... 75

Figure 16 – Schéma de montage de l'artériographe de Halpern. 76

Figure 17 – Effets sur les différentes voies métaboliques induits par l'inhibition de la dihydrofolate réductase par le méthotrexate..... 160

Figure 18 – Résultats du test de préférence au sucre. 163

Liste des tableaux

Tableau I – Critères ACR/EULAR 2010 de classification de la PR..... 6

Tableau II – Effets de certains *diseases-modifying anti-rheumatic drugs* (DMARDs) sur le risque cardiovasculaire du patient polyarhrite rhumatoïde 39

Tableau III – Différences structurales des vaisseaux sanguins..... 46

Tableau IV- Dysfonction endothéliale (DE) au niveau des artères de conductance évaluée par *flow-mediated dilation* chez des patients polyarthrite rhumatoïde (PR) comparés à la population générale 60

Liste des productions scientifiques liées au projet de thèse

Publications dans des jounaux internationaux à comité de lecture : 3 acceptés, 1 à soumettre

1- Vascular Arginase Is a Relevant Target to Improve Cerebrovascular Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis: Evidence from the Model of Adjuvant-Induced Arthritis
R. Bordy, A. Quirié, C. Marie, D. Wendling, P. Totoson, C. Demougeot
Transl Stroke Res. 2019 Mar 18. doi: 10.1007/s12975-019-00699-7 (IF : 8.266) (à paraître)

2- Microvascular endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis.
R. Bordy, P. Totoson, C. Prati, C. Marie, D. Wendling, C. Demougeot
Nature Review Rheumatology. 2018;14:404-420, doi: 10.1038/s41584-018-0022-8 (IF : 15.661)

3- Methotrexate did not Improve Endothelial Function in Rheumatoid arthritis: A Study in Rats with Adjuvant-Induced Arthritis
R. Bordy F**.** Verhoeven, M**.** Tournier-Nappey, D**.** Wendling, C**.** Demougeot, P**.** Totoson
Clin Exp Rheumatol. 2019;37:81-88. Epub 2018 Jul 18 (IF : 3.201)

4- Adjuvant-induced arthritis is a relevant model to mimic coronary endothelial dysfunction and myocardial impairments in rheumatoid arthritis
R. Bordy, J. Moretto, S. Devaux, D**.** Wendling, K. Moretto-Riedweg, C**.** Demougeot, P**.** Totoson
Soumise à *Arthritis & Rheumatology* (IF: 9.002) en juillet 2019

Communications orales avec acte

1- Effets de la polyarthrite rhumatoïde sur la fonction coronaire et la susceptibilité à l'ischémie myocardique. Etude chez le rat
R. Bordy, J. Moretto, P. Totoson, S. Devaux, M. Hector, B. Manoury, C. Demougeot
Revue du rhumatisme 84S (2017) A73-A158 O.15
Communication orale au congrès de la Société Française de Rhumatologie, décembre 2017, Paris

Communications orales sans acte

1- Dysfonction endothéliale dans la polyarthrite rhumatoïde : quel impact du méthotrexate ? Etude sur le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant.
R. Bordy, P. Totoson, F. Verhoeven, J. Moretto, M. Tournier-Nappey, C. Demougeot
Communication orale à la journée de la Fédération Hospitalo-Universitaire *Integrated Center for Research in Inflammatory Diseases* (FHU INCREASE), 02 mars 2017, Besançon
Second prix de communication orale

2- Dysfonction coronaire et susceptibilité à l'ischémie myocardique chez le rat arthritique
R. Bordy, J. Moretto, P. Totoson, S. Devaux, C. Demougeot
Communication orale à la journée de la Fédération Hospitalo-Universitaire *Integrated Center for Research in Inflammatory Diseases* (FHU INCREASE), 26 avril 2018, Besançon

3- Dysfonction endothéliale coronaire et susceptibilité à l'ischémie myocardique chez le rat arthritique
R. Bordy, J. Moretto, P. Totoson, S. Devaux, M. Hector, C. Demougeot
Communication orale au 24ème Forum des Jeunes Chercheurs, juin 2018, Besançon

Communications affichées internationales avec acte

1- Arthritis Is Associated With Cerebrovascular Endothelial Dysfunction: Mechanistic Insights In The Rat Adjuvant-Induced Arthritis Model.
R. Bordy, P. Totoson, M.-L. Bouressam, F. Dupuis, F. Verhoeven, D. Wendling, C. Demougeot
Annals of the Rheumatic Diseases 78S2 (2019) 1517.3-1518 AB0113
Congrès de *l'European League Against Rheumatisms* (EULAR), juin 2019, Madrid

2- Endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: which effect of methotrexate? A study in adjuvant induced arthritis model.
R. Bordy, P. Totoson, F. Verhoeven, C. Prati, J. Moretto, M. Tournier-Nappey, C. Demougeot
Annals of the Rheumatic Diseases 76S2 (2017) 493-494 FRI0039
Communication affichée au congrès de *l'European League Against Rheumatisms* (EULAR), juin 2017, Madrid

Communications affichées nationales avec acte

1- Effect of a chronic treatment with an arginase inhibitor on cerebrovascular endothelial dysfunction in Adjuvant-Induced Arthritis
R. Bordy, P. Totoson, F. Verhoeven, D. Wendling, C. Demougeot
Fundamental and Clinical Pharmacology, 2019; 33(Suppl.S1):48-90, PS1-019
Communication affichée au congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, juin 2019, Lyon.

2- L'arthrite est associée à une dysfonction endothéliale cérébrovasculaire : aperçu mécanistique dans le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant chez le rat
R. Bordy, P. Totoson, M.-L. Bouressam, F. Dupuis, F. Verhoeven, D. Wendling, C. Demougeot
Revue du rhumatisme 85S1 (2018) A49-A86 PC.01
Communication affichée commentée au 31ème congrès de la Société Française de Rhumatologie, décembre 2018, Paris

3- Effect of cardiac ischemia/reperfusion in adjuvant-induced arthritis in rats
J. Moretto, S. Devaux, M. Hector, **R. Bordy**, C. Demougeot
Fundamental and Clinical Pharmacology 2017;31(Suppl1):21-50
Communication affichée au congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, avril 2017, Rouen.

Communications affichées sans acte

1- Effet du méthotrexate sur la dysfonction endothéliale en cas de polyarthrite rhumatoïde : étude chez le rat induit à l'adjuvant
R. Bordy, P. Totoson, F. Verhoeven, J. Moretto, M. Tournier-Nappey, C. Demougeot
Communication affichée au Forum des Jeunes Chercheurs, juin 2017, Dijon

Partie 1 : Revue de littérature

1 La polyarthrite rhumatoïde

1.1 Définition, épidémiologie et étiologie

Les maladies rhumatologiques sont décrites depuis l'Antiquité par Hippocrate et ses successeurs, mais on ne trouve aucune description précise de la polyarthrite rhumatoïde (PR) [1]. En 1800, Auguste Landré-Beauvais, dans sa thèse de docteur en médecine, décrit une maladie rhumatologique chronique, déformante asthéniante à prédominance féminine, « la goutte asthénique primitive ». C'est la première description connue de la PR, même si cette pathologie n'a aucun rapport avec la goutte. En 1853, Jean-Martin Charcot, dans sa thèse de docteur en médecine, classe la PR dans les rhumatismes inflammatoires chroniques. En 1960, le terme « polyarthrite rhumatoïde » est définitivement utilisé pour désigner cette pathologie : « poly » car plusieurs articulations sont touchées, « arthrite » car le tissu synovial devient inflammatoire et « rhumatoïde » car la prolifération cellulaire est non maligne [2].

La PR est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques [3]. Cette pathologie affectait 300 000 personnes en France en 2013, dont 75 % de femmes, préférentiellement en périménopause. Sa prévalence est estimée entre 0,5 et 1 % de la population adulte [4]. L'âge moyen de survenue est compris entre 35 et 55 ans. 10 % des patients atteints évoluent vers une invalidité grave en moins de 2 ans.

La PR est classée parmi les maladies auto-immunes en raison de la présence d'auto-anticorps (auto-Ac) ciblant les peptides citrullinés [5]. Elle entraine une inflammation de la membrane synoviale conduisant à une destruction articulaire progressive, avec des répercussions fonctionnelles, psychologiques, sociales et professionnelles, parfois graves pour le patient. 50 % des malades ont arrêté leur activité professionnelle moins de 5 ans après le début de la maladie [6]. C'est aussi une pathologie systémique en raison d'atteintes extra-articulaires délétères [5].

L'étiologie de la PR est encore mal comprise, mais comme beaucoup de maladies auto-immunes, il s'agit d'une affection multifactorielle où interviennent des facteurs génétiques, hormonaux et environnementaux. Certains loci du système HLA (HLA-DR1 et DR4 notamment) ont été identifiés comme associés à la pathologie [3,7–9]. La prédominance féminine des patients, la survenue de la pathologie en période ménopausique, les périodes de rémission pendant la grossesse et les

rechutes fréquentes en post-partum souligne une implication hormonale [10]. Les études épidémiologiques placent le tabac comme facteur environnemental principal en lien avec la survenue d'une PR [3,8,11,12].

1.2 Physiopathologie [3,8,9,13–17]

Si l'étiologie de la PR est encore incertaine, les mécanismes physiopathologiques sont maintenant bien décrits. La membrane synoviale, normalement constituée d'un tissu conjonctif avec une monocouche de synoviocytes de type soit fibroblastique (rôle nourricier du cartilage) soit macrophagique (rôle phagocytaire), constitue le siège inflammatoire de la PR. Cette inflammation est liée à une réponse immunitaire anormale impliquant plusieurs acteurs de celle-ci au cours de plusieurs phases schématiques.

Une première **phase d'initiation**, ou phase préclinique, est suggérée plusieurs années avant les premières arthralgies. Durant ce premier évènement, il y a activation d'une réponse immunitaire non spécifique avec accumulation de cellules dendritiques, monocytes, macrophages, polynucléaires (PN) neutrophiles, par chimioattraction exercée par le *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), le *macrophage inflammatory protein-1* (MIP-1), le CCL-5 et l'interleukine (IL) 8. Cette accumulation conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et le *tumor necrosis factor alpha* (TNFα). Des auto-Ac spécifiquement dirigés contre des peptides citrullinés sont également retrouvés dans la circulation générale. Curieusement, ces auto-Ac semblent totalement épargner le tissu synovial au cours de cette phase [18,19] (**Figure 1**).

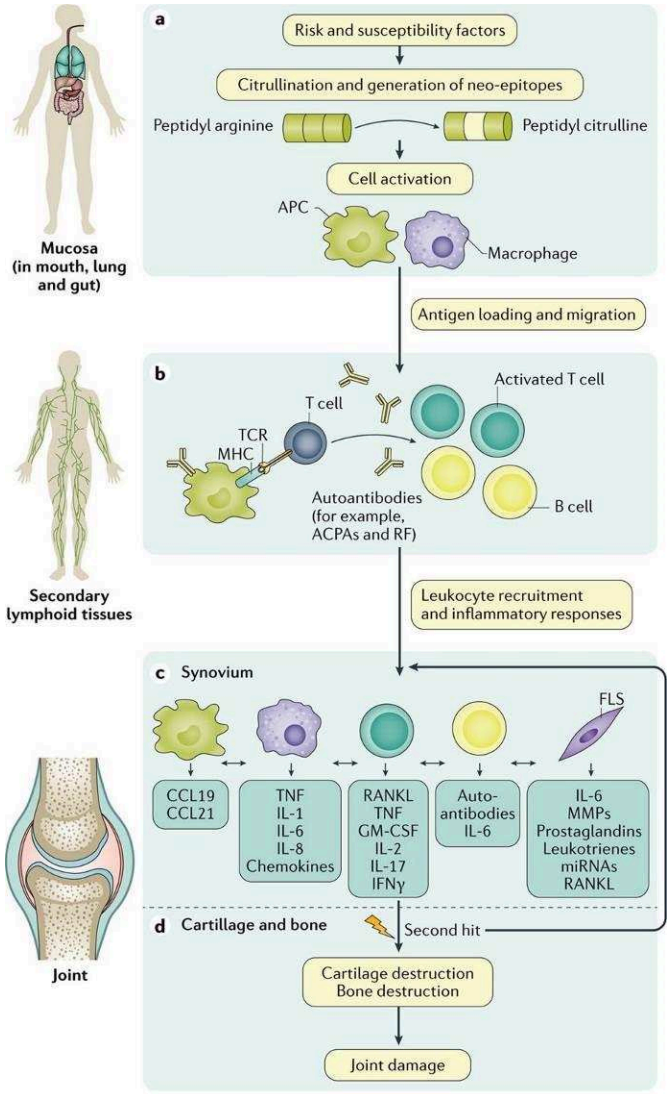


Figure 1 – Mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression de la polyarthrite rhumatoïde [17]
a) **phase d'initiation** où la génération de nouveaux épitopes est capable d'activer une réponse immunitaire non spécifique. b) **phase de recrutement ou d'inflammation** où la présentation des antigènes par les cellules présentatrices des antigènes (APC) sont capables d'activer une réponse immunitaire adaptative. c) au sein de l'articulation les cellules synoviales, macrophages et APC amplifient l'activation immunitaire et la production de cytokines inflammatoires conduisant à la **synovite**. d) **phase de destruction** où la persistance de l'activation immunitaire et l'inflammation locale conduit à des dommages au cartilage et à l'os et à terme à la destruction de l'articulation.
ACPAs : anticorps anti-peptides citrullinés, CCL19 : CC-chemokine ligand 19, CCL21 : CC-chemokine ligand 21, FLS : *fibroblast-like synoviocytes*¸ GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, MHC : complexe majeur d'histocompatibilité, miRNA : microARN, MMP : métalloprotéase matricielle, RANKL : *receptor activator of nuclear factor-κB ligand*, RF : facteur rhumatoïde, TCR : *T cell receptor*, TNF : *tumor necrosis factor*.

Après initiation, une **phase de recrutement et d'inflammation** se met en place. Le processus inflammatoire initié par les macrophages permet le recrutement non spécifique des lymphocytes T (LT) et des PN sanguins grâce à l'action de cytokines à activité chimiotactique et à l'augmentation

de l'expression des molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales sous l'action du TNFα. Au niveau synovial, les macrophages interagissent *in situ* avec les LT en leur présentant des peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. Ceci conduit à l'activation de LT CD4+ et CD8+ cytotoxiques amplifiant l'activation cellulaire en cascade, la production accrue de cytokines et de molécules effectrices. Des lymphocytes B (LB) sont activés localement par les LT CD4+. Ils se multiplient et se différencient en plasmocytes qui produisent des immunoglobulines (Ig) polyclonales et du facteur rhumatoïde (FR). Ceux-ci participent au mécanisme lésionnel de la PR. Les FR à la surface des LB présentent de façon efficace des peptides antigéniques au LT, accentuant l'activation de cette population cellulaire (**Figure 1**).

Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle pathogénique clé sur les processus d'inflammation, de prolifération synoviale et de destruction du cartilage. Il existe dans l'articulation rhumatoïde un déséquilibre entre les cytokines à action pro-inflammatoire (comme le TNFα, l'IL-1 et l'IL-6, présents en excès) et les cytokines à action anti-inflammatoire (IL-10, IL-4, IL-13, récepteurs solubles du TNFα et antagoniste du récepteur de l'IL-1) présentes en quantité insuffisante et ne peuvant bloquer l'action des premières. Des cytokines favorisant la néo-angiogenèse et la prolifération cellulaire synoviale sont également présentes : TGFβ (*Transforming Growth Factor* β), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et FGF-1 et 2 (*Fibroblast Growth Factors* 1 et 2). Cette angiogenèse est indispensable au recrutement des lymphocytes, macrophages et PN neutrophiles sanguins induisant une large infiltration de ces cellules immunitaires au niveau synovial. Ceci provoque une forte production de cytokines inflammatoires dans l'articulation, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), d'eicosanoïdes et d'enzymes dégradant la matrice articulaire, les métalloprotéases. Ces cytokines, associées aux facteurs de stimulation des colonies macrophagique et granulocytaire, entretiennent l'inflammation locale. Progressivement, la synoviale devient inflammatoire, c'est la synovite. Les synoviocytes soumises à l'inflammation vont également changer de phénotype et se multiplier, conduisant à une hyperplasie synoviale, aussi appelée pannus synovial **(Figure 1)**.

L'activation et la réponse immunitaire au niveau de l'articulation vont conduire à la troisième phase qui correspond à la **destruction articulaire**. La perte de continuité de la synoviale et une diminution de production de liquide synovial, le liquide de lubrification articulaire, engendrent des

dommages physiques au cartilage sous-jacent. Sous l'action de l'IL-1, les chondrocytes articulaires vont basculer dans un profil catabolique par une synthèse de métalloprotéases, participant également à la destruction de la matrice cartilagineuse. Les chondrocytes vont également produire de l'IL-1, IL-6, IL-17, IL-18 et TNFα qui vont accélérer la destruction cartilagineuse par promotion et rétrocontrôle positif sur le catabolisme osseux. Par ailleurs, l'IL-1 et l'IL-17 avec les ROS vont avoir un effet synergique pro-apoptogène sur les chondrocytes. La destruction de ces surfaces va se traduire par une détérioration rapide des structures minérales sous-jacentes à cette matrice cartilagineuse. A cette destruction mécanique de la matrice osseuse s'ajoute l'action des ostéoclastes, suractivés par les cytokines inflammatoires, notamment l'IL-1. Une phase de réparation, responsable d'une fibrose articulaire, a lieu parallèlement à cette phase de destruction, mais ne compense pas le processus destructif. Elle fait participer des facteurs de croissance et le TGFβ (**Figure 1**).

1.3 Diagnostic

Le diagnostic de PR peut être difficile en raison du développement lent, progressif et premièrement silencieux de la pathologie [5]. Il repose sur des arguments cliniques, biologiques, d'imagerie et nécessite d'éliminer d'autres affections. Une arthrite touchant au moins deux articulations avec gonflement articulaire, douleurs, raideur matinale, ténosynovite doit faire penser au diagnostic de PR.

Ce diagnostic doit être le plus précoce possible car la prise en charge sera plus efficace au début de la pathologie, quand il n'y a pas encore de lésion irréversible [20,21].

1.3.1 Diagnostic clinique [5,13,20,22,23]

Le diagnostic précoce de PR est fondamental : il est recommandé de confier le patient à un rhumatologue s'il y a présence d'au moins un des signes suivants :

- au moins trois articulations gonflées ;
- une douleur à la compression latérale des métatarsophalangiennes ou des métacarpophalangiennes ;
- une raideur matinale de plus de 30 minutes.

Le rhumatologue peut utiliser les nouveaux critères de diagnostic/classification de la PR de 2010 établis conjointement entre les collèges de rhumatologues américains (ACR) et européens (EULAR). Dans un premier temps, il doit y avoir confirmation d'au moins une synovite qui doit, dans un second temps, ne pas être expliquée par une autre pathologie. Si ces deux conditions sont respectées, le médecin va utiliser les nouveaux critères de classification (**Tableau I**) pour poser le diagnostic de PR. Un score final ≥ 6 pose définitivement le diagnostic de PR. Un score < 6 ne pose pas le diagnostic de PR mais ne l'exclut pas pour autant : une autre évaluation ultérieure est nécessaire.

Tableau I – Critères ACR/EULAR 2010 de classification de la PR [20]

Atteinte articulaire (0-5)	
1 grosse articulation*	0
2-10 grosses articulations	1
1-3 petites articulations** (grosses articulations non comptées)	2
4-10 petites articulations (grosses articulations non comptées)	3
10 articulations (au moins 1 petite articulation)	5
Sérologie (0-3)	
FR négatif et ACPA négatif	0
FR faiblement positif (1 à 3 fois la normale) ou ACPA faiblement positif (1 à 3 fois la normale)	2
FR fortement positif (> 3 fois la normale) ou ACPA fortement positif (> 3 fois la normale)	3
Durée des symptômes (0-1)	
< 6 semaines	0
≥ 6 semaines	1
Biologie inflammatoire (0-1)	
CRP normale et vitesse de sédimentation normale	0
CRP anormale et vitesse de sédimentation anormale	1

* « Grosse articulation » se réfère aux épaules, coudes, hanches, genoux et chevilles
** « Petite articulation » se réfère aux articulations métacarpophalangiennes, interphalangiennes proximales, 2ème ou 3ème métatarsophalangiennes, interphalangienne du pouce, poignets
FR = facteur rhumatoïde, ACPA = anticorps anti-peptides citrullinés, CRP = protéine C réactive

Après l'interrogatoire et l'examen clinique, on peut dans la plupart des cas évoquer le diagnostic de PR débutante. Cependant, quelques explorations complémentaires sont utiles.

1.3.2 Diagnostic radiologique [13,23]

Le diagnostic radiologique permet de visualiser les érosions osseuses à des stades tardifs, permettant de confirmer le diagnotic clinique (**Figure 2**). La constatation d'une érosion radiographique osseuse sur 3 articulations des mains, des poignets ou des pieds est considérée comme hautement spécifique d'une PR [24]. Ces examens radiographiques sont réalisés dans le but

d'éliminer d'autres diagnostics (adénopathies thoraciques pouvant évoquer une sarcoïdose, liseré chondrocalcinose, …), de rechercher la présence d'érosions caractéristiques des articulations des mains et des pieds (elles sont exceptionnelles aux phases débutantes, leur présence étant de mauvais pronostic) et de servir de référence pour la surveillance de l'évolution ultérieure. La radiographie standard est le plus souvent normale. Il est également possible d'utiliser les techniques d'échographie, pour le suivi des synovites [25], et d'imagerie par résonnance magnétique (IRM), pour détecter précocement et suivre de l'évolution des articulations inflammées [26]. Toutefois l'utilisation de ces dernières techniques est soumise à controverses en raison du manque de spécificité et du coût [21].



Figure 2 – Radiographie de la main droite d'une patiente atteinte de polyarthrite rhumatoïde en phase tardive [27]

1 : radius, 2 : ulna, 3, 4 et 5 : érosion osseuse métacarpophalangienne, 6 : érosion osseuse interphalangienne proximale, 7 : érosion du compartiment ulno-radial

1.3.3 Diagnostic biologique [13,23]

Une biologie usuelle est nécessaire avec :

- une vitesse de sédimentation (VS), un dosage de la protéine C réactive (CRP) à la recherche d'un syndrome inflammatoire : 90 % des PR débutent par un syndrome inflammatoire non spécifique ;
- une numération formule sanguine à la recherche d'une anémie d'origine inflammatoire ;

- un bilan hépatobiliaire pour évaluer une atteinte hépatique ;
- une créatininémie pour évaluer une atteinte rénale ;
- une bandelette urinaire à la recherche d'une protéinurie ou d'une hématurie.

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 PN neutrophiles. Parfois, la formule est à prédominance lymphocytaire. Le dosage du complément ou des Ac dans le liquide articulaire n'est pas utile en pratique courante. Une biopsie synoviale peut être envisageable pour éliminer une origine infectieuse dans les monoarthrites.

De façon spécifique, la biologie explore également les auto-Ac avec le FR et les ACPA. Le FR est une Ig de type IgM le plus souvent, mais peut également être de type IgA, IgG ou IgD. Cette Ig a une activité anticorps (Ac) dirigée contre les IgG. Il est recherché par néphélométrie laser ou technique ELISA, qui est la plus répandue et la plus sensible (seuil : 20 $UI.mL^{-1}$). Au début de la PR, la recherche de FR est positive dans 50 à 60 % des cas environ. La présence d'un taux élevé de FR dès le début de la maladie est un élément de mauvais pronostic. Mais le FR n'est ni indispensable ni suffisant pour affirmer le diagnostic : sa spécificité est de 75 à 85 % et sa sensibilité de 70 à 80 %. Il est en effet retrouvé dans d'autres affections comme le lupus érythémateux disséminé, la leishmaniose, l'endocardite bactérienne ou la cirrhose. Le FR n'a pas de rôle direct dans le développement de la synovite rhumatoïde comme l'atteste le développement de polyarthrites très érosives chez des patients n'ayant pas de FR. A l'inverse, le FR est impliqué dans certaines complications extra-articulaires, en particulier dans la vascularite où il se dépose dans la paroi des vaisseaux et forme des complexes immuns de taille intermédiaire activant le complément et induisant l'inflammation vasculaire.

Les ACPA sont des Ac très intéressants pour le diagnostic précoce des PR. Lorsque ce dosage est positif, il permet de prédire avec une spécificité supérieure à 95 % le diagnostic de PR mais il peut cependant être retrouvé positif dans d'autres maladies inflammatoires. De plus, la présence d'ACPA est prédictive d'une maladie persistante et érosive. On sait maintenant que ces Ac reconnaissent des peptides citrullinés, dont la fibrine modifiée présente dans l'articulation rhumatoïde. Le titre des ACPA s'élève 2 à 4 ans avant les premiers signes cliniques, de même que

le répertoire des peptides reconnus (3 à 5 peptides sont reconnus, dont les plus fréquents sont l'α-énolase, la chaine α de la fibrine, la vimentine, le fibrinogène, la kératine et les histones) [8,9].

1.3.4 Diagnostics différentiels [13,23]

Selon les nouveaux critères de diagnostic/classification mis au point par l'ACR/EULAR, la classification de l'inflammation articulaire ne peut se faire que si la synovite du patient ne s'explique pas par une autre affection rhumatismale. Il convient d'éliminer d'autres formes de rhumatismes inflammatoires. On retrouve :

- **Les polyarthrites d'origine bactérienne ou virale**. Ce diagnostic est posé après examen cytobactériologique du liquide synovial ou d'une biopsie synoviale. On retrouve parmi les plus fréquentes les polyarthrites gonococciques, les bactériémies à streptocoque ou staphylocoque, la maladie de Lyme, la syphilis, l'hépatite A ou B, la rubéole, les infections à parvovirus B19.
- **Les spondylarthropathies**. Ce sont les rhumatismes inflammatoires les plus fréquents après la PR et représentent l'un des diagnostics différentiels principaux. On retrouve l'arthrite réactionnelle, la spondylarthrite ankylosante, le rhumatisme psoriasique, le rhumatisme des entérocolopathies chroniques, les spondylarthropathies indifférenciées. Il s'agit habituellement d'un tableau d'oligoarthrite ou plus rarement de polyarthrite prédominant sur les grosses articulations, notamment le bassin, et de distribution asymétrique. Il faut rechercher à l'interrogatoire, à l'examen clinique mais également dans les antécédents, les autres signes évocateurs de spondylarthropathie et proposer des radiographies des articulations sacro-iliaques.
- **La pseudo-polyarthrite rhizomélique**. Il s'agit du rhumatisme inflammatoire le plus fréquent du sujet âgé chez qui elle représente le diagnostic différentiel principal de la PR. L'association de myalgies, l'absence de signes articulaires distaux, l'absence d'anomalies immunologiques, l'amélioration spectaculaire des symptômes sous l'effet d'une faible corticothérapie orientent vers cette pathologie.
- **Les connectivites**. La plupart de ces pathologies comportent des manifestations articulaires inflammatoires. On retrouve parmi les plus fréquentes la maladie lupique, le syndrome de Gourgerot-Sjögren primitif, la sclérodermie systémique.
- **Les arthropathies métaboliques** avec la goutte polyarticulaire ou la chondrocalcinose.

1.4 Symptomatologie et évolution [13,23]

1.4.1 Polyarthrite rhumatoïde précoce

La PR est une polyarthrite bilatérale, le plus souvent symétrique et « nue » (c'est-à-dire sans signe extra-articulaire ou axial associé dans la PR débutante) dans 70 % des cas. Elle touche les poignets et une ou plusieurs articulations métacarpophalangiennes ou interphalangiennes proximales. Elle respecte classiquement les interphalangiennes distales. Les articulations atteintes sont douloureuses, partiellement enraidies et légèrement enflées. Au niveau des doigts, on note un aspect caractéristique de « fuseau » (**Figure 3**) et au niveau des poignets une tuméfaction avec parfois une ténosynovite cubitale. Le rythme des douleurs est caractéristique d'un rhumatisme inflammatoire : nocturnes réveillant les patients, elles sont maximales le matin au réveil, entraînant un enraidissement articulaire qui cède dans la matinée. L'examen clinique peut montrer une douleur à la compression latérale des métatarsophalangiennes ou des métacarpophalangiennes qui est assez évocatrice du diagnostic de PR débutante.

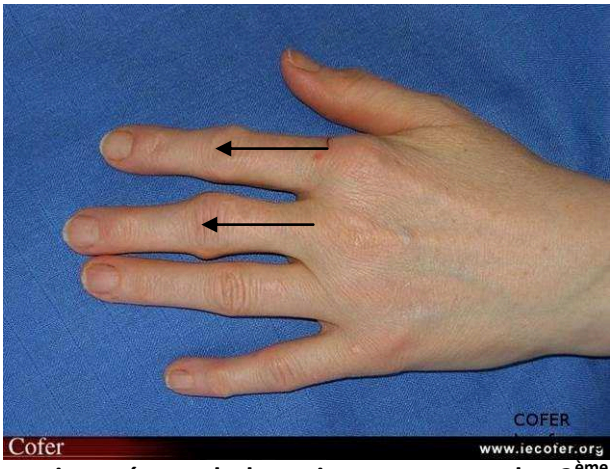


Figure 3 – Atteinte inflammatoire précoce de la main avec aspect des 2ème et 3ème interphalangiennes proximales (flèches) « en fuseau » dans une polyarthrite rhumatoïde débutante (Image issue de la diapothèque du Collège Français des Enseignants en Rhumatologie (COFER) [28]).

Des signes généraux, tels qu'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, il s'agit d'une polyarthrite aiguë fébrile avec altération de l'état général et fièvre supérieure à 38,5° C.

Rarement (10 % des cas), d'autres manifestations peuvent être rencontrées, comme 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.

1.4.2 Polyarthrite rhumatoïde tardive

La PR, une fois installée, tend à s'aggraver et à s'étendre. Cette extension se fait le plus souvent à l'occasion de poussées évolutives au cours desquelles les articulations indemnes sont atteintes. Ces poussées sont classiquement entrecoupées d'accalmies relatives, voire de rémissions vraies.

1.4.2.1 Manifestations articulaires

On retrouve des déformations caractéristiques :

- la déformation cubitale des doigts en « coup de vent » (**Figure 4A**) ;
- la déformation en « col de cygne » (**Figure 4B**) ;
- la déformation en « boutonnière », retrouvée chez 50 % des patients (**Figure 4C**) ;
- la déformation « en maillet » ou « en marteau » (**Figure 4D**) ;
- l'atteinte du pouce en « Z », liée à une arthrite métacarpophalangienne, particulièrement fréquente et invalidante (**Figure 4E**).

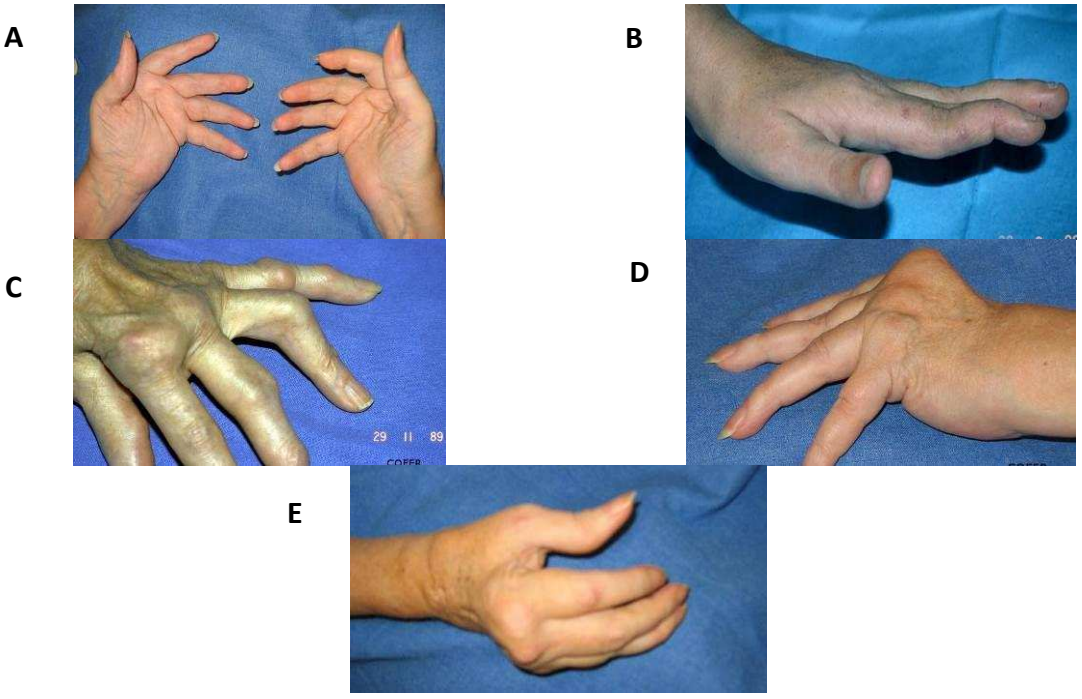


Figure 4 – Déformations caractéristiques de la main « en coup de vent » (A), « en col de cygne » (B), « en boutonnière » (C), « en maillet » ou « en marteau » (D), « en Z » (E) (Images issues de la diapothèque du COFER [28]).

L'atteinte des poignets se caractérise par une érosion précoce de l'articulation radio-ulnaire inférieure, une luxation de la styloïde cubitale et une arthrite radiocarpienne entraînant une aggravation « du coup de vent ».

L'atteinte des pieds est très invalidante et survient dans 90 % des cas. Il s'agit le plus souvent d'une atteinte métatarsophalangienne, aboutissant rapidement à un avant-pied plat, puis rond, avec luxation plantaire des métatarsiens (**Figure 5**). Il s'y associe un pied plat valgus. Les déformations du pied peuvent être très sévères avec risque d'hyperkératose, de durillons plantaires, de fistule avec risque infectieux.



Figure 5 – Atteinte d'un pied de patiente souffrant de polyarthrite rhumatoïde (Image issue de la diapothèque du COFER [29]).

L'atteinte des épaules est fréquente mais souvent méconnue. Les coudes sont touchés dans 40 % des cas, aboutissant rapidement à une attitude vicieuse de flessum. La coxite rhumatoïde (inflammation de l'articulation de la hanche) doit être systématiquement recherchée. Elle est présente chez environ 15 % des patients et aggrave particulièrement le pronostic fonctionnel. L'atteinte du rachis cervical est caractérisée par une atteinte érosive de la charnière cervico-occipitale avec arthrite occipito-atloïdienne et atloïdo-axoïdienne avec risque d'impression basilaire. Cette lésion, surtout si elle est instable, peut entrainer une compression médullaire cervicale haute. En revanche, les rachis thoracique, lombaire et sacro-iliaque ne sont que rarement touchés.

1.4.2.2 Manifestations extra-articulaires

Les manifestations extra-articulaires de la PR traduisent le caractère systémique de la maladie rhumatoïde. Parmi ces manifestations, il est principalement retrouvé une asthénie, un amaigrissement, des nodules rhumatoïdes, des adénopathies, des vascularites rhumatoïdes, des atteintes cardiovasculaires, une amylose, une fibrose pulmonaire interstitielle diffuse, des atteintes oculaires, une anémie, des névrites. Ces atteintes mettent parfois en jeu le pronostic vital du patient et contribuent à augmenter la mortalité.

1.4.3 Evolution

L'évolution de la PR est très hétérogène avec des formes d'emblées sévères pouvant comporter des manifestations viscérales engageant le pronostic vital et pouvant engendrer des destructions articulaires rapides, source de handicap majeur (10 à 20 % des cas). A l'opposé, il existe des PR bénignes entraînant peu ou pas de gêne fonctionnelle et peu ou pas de lésions radiographiques et de déformations. La majorité des formes sont de sévérité intermédiaire où les patients développent des dommages radiologiques progressifs durant les cinq premières années et perdraient 10 % de leurs activités initiales.

Les causes de mortalité de la PR sont dues aux atteintes extra-articulaires de la pathologie :

- causes cardiovasculaires ;
- causes infectieuses ;

- affections néoplasiques (fréquence augmentée de lymphomes malins non hodgkiniens) ;
- causes iatrogènes (complications des anti-inflammatoires non stéroïdiens, de la corticothérapie ou des traitements de fond) ;
- vascularite rhumatoïde, amylose, atteintes neurologiques avec l'atteinte C1-C2.

1.5 Suivi de la pathologie

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 [5,13,21]. Parmi eux, le DAS28, le SDAI, le CDAI et le HAQ sont les plus utilisés.

1.5.1 Le *Disease Activity Score 28* (DAS28) [30,31]

Définition et principe

Le DAS28 est un score d'activité de la PR élaboré en 1996 par l'EULAR qui tient compte de l'évaluation de la douleur et du nombre d'arthrites sur 28 sites articulaires, de la VS et de l'appréciation globale du patient sur une échelle visuelle analogique (EVA) de 100 millimètres. 28 sites articulaires sont évalués par mobilisation (épaules, coudes, poignets, genoux) ou par pression (coudes, métacarpophalangiennes, interphalangiennes proximales). L'indice articulaire est égal à la somme de l'ensemble des scores obtenus pour les 28 sites articulaires. Pour chacun des sites articulaires, l'intensité de la douleur est évaluée sur une échelle allant de 0 à 3 :

- 0 = absence de douleur ;
- 1 = douleur à la pression ;
- 2 = douleur et grimace ;
- 3 = douleur, grimace et retrait du membre.

Calcul

DAS28 = 0,55 x (nombre d'articulations douloureuses [de 0 à 28]) + 0,284 x (nombre d'articulations gonflées [de 0 à 28]) + 0,33 x log(VS [en mm]) + 0,0142 x (appréciation globale du patient [de 0 à 100])

Interprétation

Le DAS28 va de 0 à 9,4. Il permet d'évaluer l'activité de la maladie au moment du diagnostic, de suivre son évolution et d'évaluer l'efficacité des traitements :

- DAS28 ≤ 2,6 : rémission
- 2,6 < DAS28 ≤ 3,2 : faible activité
- 3,2 < DAS28 ≤ 5,1 : activité modérée
- DAS28 > 5,1 : forte activité

1.5.2 Le *Simplified Disease Activity Index* (SDAI) [31,32]

Définition et principe

Ce score prend en compte la somme du nombre d'articulations douloureuses, du nombre d'articulations gonflées (les mêmes 28 articulations que le DAS28), du taux plasmatique de la CPR et de l'activité de la maladie jugée par le patient et par le médecin (selon une échelle visuelle analogique de 0 à 10).

Calcul

SDAI = nombre d'articulations douloureuses (de 0 à 28) + nombre d'articulations gonflées (de 0 à 28) + CRP plasmatique ($mg.dL^{-1}$ [de 0 à 10]) + appréciation du patient (de 0 à 10) + appréciation du médecin (de 0 à 10)

Interprétation

Le total du SDAI va de 0 à 86. A l'instar du DAS28, il permet d'évaluer l'activité de la maladie et de suivre son évolution et l'efficacité du traitement :

- SDAI ≤ 3,3 : en rémission
- 3,3 < SDAI ≤ 11 : faible activité
- 11 < SDAI ≤ 26 : activité modérée
- SDAI > 26 : forte activité

1.5.3 Le *Clinical Disease Activity Index* (CDAI) [31,33]

Définition et principe

Le CDAI reprend les mêmes paramètres que le SDAI mais sans tenir compte de la CRP. Ainsi, ce score est un critère d'activité basé uniquement sur des données cliniques.

Calcul

CDAI = nombre d'articulations douloureuses (de 0 à 28) + nombre d'articulations gonflées (de 0 à 28) + appréciation du patient (de 0 à 10) + appréciation du médecin (de 0 à 10)

Interprétation

Le total du CDAI va de 0 à 76 :

- CDAI ≤ 2,8 : en rémission
- 2,8 < CDAI ≤ 10 : faible activité
- 10 < CDAI ≤ 22 : activité modérée
- CDAI > 22 : forte activité

1.5.4 Le *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) [34]

Le HAQ est un questionnaire d'évaluation de l'incapacité fonctionnelle du patient PR. Il prend en compte huit domaines de la vie courante, divisés en plusieurs questions (habillement, repas, toilette et hygiène, préhension, …) auxquelles le patient attribue une note :

- 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, moins en cas de données totalement manquantes pour un domaine particulier). Le score ainsi obtenu est compris entre 0 et 3.

Il n'y a pas de seuil discriminant une bonne ou une mauvaise capacité fonctionnelle. Ce score sert uniquement au suivi de la situation du patient.

1.6 Traitements [21,35–38]

La PR nécessite une prise en charge précoce, idéalement dans les 3 premiers mois suivants le diagnostic de la pathologie, et pluridisciplinaire associée à une éducation thérapeutique du patient (ETP) [5,39]. L'objectif prioritaire de la mise en place d'un traitement est d'obtenir une rémission ou une faible activité de la maladie le plus rapidement possible, dans le but de prévenir et limiter les lésions ostéo-articulaires pouvant être irréversibles [21,40]. La rémission de la pathologie est estimée

atteinte chez 8 à 42,6 % des patients selon les études [41,42]. Une prise en charge précoce dans l'année des premiers symptômes conduit à de meilleurs résultats radiographiques durant 3 ans [43] et retarde les érosions osseuses [24]. L'arsenal thérapeutique disponible dans le traitement de fond de la PR s'est agrandi depuis une quinzaine d'années grâce à l'avènement des biothérapies et les connaissances plus approfondies des mécanismes physiopathologiques. Ces dernières années ont vu l'augmentation des thérapies ciblées (anti-TNFα, anti-IL-1, anti-IL-6, anti-IL-17, inhibiteur des Janus-kinase (JAK)) qui sont venues prendre leur position dans l'arsenal thérapeutique en plus des traitements de fond anti-rhumatoïdes conventionnels.

L'ETP est recommandée pour tout patient atteint de PR [44]. Dans le cadre de cette pathologie, l'ETP est complémentaire de la prise en charge médicale, réalisée si possible par une équipe pluridisciplinaire en accord avec le médecin spécialisé en rhumatologie et le médecin traitant.

Il n'existe aucun traitement curateur de la PR. Les traitements actuels permettent de réduire la douleur et l'inflammation, maintenir la mobilité articulaire et limiter la perte d'autonomie.

1.6.1 Traitements symptomatiques

L'un des plus gros symptômes handicapant dans la PR est la douleur articulaire. Sa prise en charge est primordiale pour assurer une qualité de vie optimale au patient. L'utilisation des traitements symptomatiques dépend de l'intensité de la douleur, et la tolérance du patient face aux effets secondaires. Parmi eux on retrouve :

- les antalgiques de palier I et II : paracétamol, codéine, tramadol. L'utilisation des antalgiques de palier III est exceptionnelle.
- les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS). Ils sont utilisés à dose anti-inflammatoire et sont utilisés en première intention dans les douleurs de la PR. Toutefois, leur toxicité digestive, cardiovasculaire et rénale demande une surveillance étroite du patient.
- les anti-inflammatoire stéroïdiens (ou glucocorticoïdes, GC) : ces anti-inflammatoires sont à utiliser uniquement en cas d'alternative (*i.e.* efficacité insuffisante des AINS) lors de la mise en place du traitement de fond ou en cas de poussée sévère. La corticothérapie est mise en place à la plus faible dose possible (idéalement 0,15 mg/kg/j) et sur la période la plus courte possible (maximum 6 mois). En raison des nombreux effets indésirables, une surveillance étroite du patient doit être faite (hypertension artérielle, diabète, ulcère, …).

- les traitements locaux. Il est possible d'utiliser des ponctions évacuatrices, des infiltrations péri- ou intra-articulaires de glucocorticoïdes en cas de synovites persistantes [13]. Si malgré une ou plusieurs infiltrations cortisoniques l'articulation reste inflammatoire, il est possible de réaliser une synoviorthèse isotopique (injection intra-articulaire de produit isotopique capable de dégrader le pannus synovial).

1.6.2 Traitements de fond

Les traitements de fond, ou DMARDs (*disease-modifying anti-rheumatic drugs)*, visent à réduire la fréquence, la durée, l'intensité des poussées, à réduire la progression radiologique et à réduire globalement l'activité du rhumatisme au mieux jusqu'à l'obtention d'une rémission clinique [13]. 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.

On distingue trois types de DMARD : les DMARDs « conventionnels synthétiques » (csDMARDs), les DMARDs « biologiques » (bDMARDs) et les DMARDs « synthétiques ciblés » (tsDMARDs). Les csDMARDs sont prescrits en première intention et sont représentés par le méthotrexate, le léflunomide et la sulfasalazine. Le recours à la biothérapie ou aux thérapies ciblées se fait en deuxième intention si la PR est réfractaire ou en présence de facteurs de mauvais pronostic.

1.6.2.1 csDMARDs

Ces DMARDs ont été mis en place depuis les années 1960 dans le traitement de la PR de façon empirique. Plusieurs molécules sont utilisées :

- le **méthotrexate** (MTX) : traitement de première intention en raison de son faible coût, sa bonne efficacité et sa faible toxicité.
- le **léflunomide**, la **sulfasalazine** et les **antipaludéens de synthèse** (chloroquine et hydroxychloroquine) sont utilisés en seconde intention, en alternative ou en association au MTX en cas de non-réponse, intolérance ou contre-indication à celui-ci.
- les immunosuppresseurs : **ciclosporine** et **l'azathioprine**, maintenant prescrits hors-AMM, ne sont presque plus utilisés en raison de leur mauvaise balance bénéfice/risque.

1.6.2.2 bDMARDs

Depuis les années 2000, avec l'avancée des connaissances sur la physiopathologie de la PR, plusieurs DMARDs biologiques ont été développés, créant une nouvelle ère dans le traitement de la PR. On retrouve différents types de bDMARDs :

- des **anti-TNFα** avec l'étanercept, le golimumab, l'infliximab, l'adalimumab et le certolizumab-pégol ;
- un **anti-IL-1** avec l'anakinra ;
- des **anti-récepteur à l'IL-6** (R-IL-6) avec le tocilizumab et le sarilumab ;
- un **anti-CD20** avec le rituximab ;
- un **analogue du CTLA-4** avec l'abatacept

Ces médicaments sont utilisés en seconde intention, en alternative ou en association au MTX en cas de non-réponse, intolérance ou contre-indication à celui-ci.

1.6.2.3 tsDMARDs

En 2017 sont arrivés sur le marché français des thérapies ciblées visant spécifiquement des enzymes impliquées dans la transduction du signal intracellulaire provoquées par des cytokines : les JAK. Actuellement, le **tofacitinib** et le **baricitinib** sont indiqués dans la PR, en association avec le MTX.

1.6.2.4 Thérapies adjuvantes

Associés aux traitements de fond et symptomatiques, des thérapies adjuvantes peuvent être mises en place pour diminuer les comorbidités associées à la PR, notamment des hypolipémiants avec les **statines** [45–47], et des antihypertenseurs avec les **inhibiteurs de l'enzyme de conversion** (IEC) [48] et les **antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II** (ARA II ou sartans) [49,50].

On retrouve également des prises en charge non médicamenteuses indiquées dans l'amélioration de la qualité de vie, la prise en charge de la douleur et la prévention des destructions articulaires [44]. On retrouve l'aromathérapie et la phytothérapie, l'équilibre diététique, la kinésithérapie, la balnéothérapie, la cryothérapie, la psychothérapie et les activités physiques adaptées. Cette dernière pratique est particulièrement intéressante car elle permet de soulager la

douleur, la perte osseuse, la fatigue, l'estime de soi, et améliore la fonction cardiovasculaire et le profil métabolique du patient [51–53].

1.6.3 Recommandations de prise en charge [54,55]

Ces recommandations sont élaborées par l'ACR en 2015 [55] et l'EULAR en 2016 [54], reprises et validées par la Société Française de Rhumatologie (SFR) en 2018 [21]. Elles mettent en avant l'importance d'une prise de décision partagée entre le rhumatologue et le patient ayant acquis des connaissances 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 (par le DAS28, SDAI ou CDAI, tous les 1 à 3 mois) menant à des adaptations thérapeutiques rapides si besoin. Le traitement doit être instauré dès que le diagnostic de PR est posé.

Les différentes lignes de traitement sont détaillées dans le schéma ci-dessous (**Figure 6**).

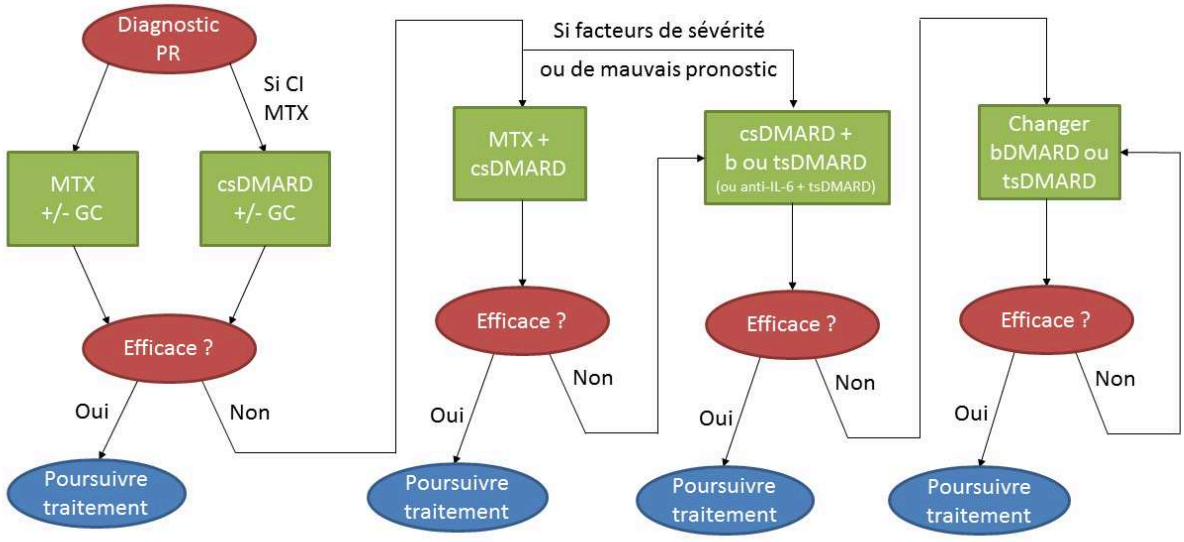


Figure 6 – Algorithme de prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde adapté d'après les recommandations de l'ACR 2015 [55], de l'EULAR 2016 [54] et de la SFR 2018 [21] (Romain Bordy, laboratoire EA4267, Besançon).
CI = contre-indication, bDMARD = DMARD « biologique », csDMARD = DMARD « conventionnel synthétique », tsDMARD = « DMARD ciblés synthétiques », GC = glucocorticoïdes, MTX = méthotrexate, PR = polyarthrite rhumatoïde.

1.6.3.1 Traitement de première ligne

Le MTX est le traitement de fond de première ligne chez les patients ayant une PR active (**Figure 6**). La SFR recommande de débuter le traitement à au moins 10 mg par semaine [21]. La dose optimale, comprise entre 15 et 25 mg par semaine, doit être atteinte au maximum en 4 à 8 semaines. En cas de contre-indication ou d'intolérance au MTX, le léflunomide ou la sulfasalazine peuvent être envisagés. 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.

1.6.3.2 Traitements de deuxième ligne et plus

Si l'objectif thérapeutique n'est pas atteint avec la première ligne thérapeutique, et en présence de facteurs de mauvais pronostic, l'association d'un bDMARD ou d'un tsDMARD doit être considérée (**Figure 6**). La pratique courante consiste à associer un bDMARD. Les bDMARDs et les tsDMARDs doivent être associées à un csDMARD. Si le patient ne peut pas prendre de csDMARD, un anti-R-IL-6 associé à un tsDMARD présente certains avantages par rapport aux autres bDMARDs. Après un échec d'un traitement par un bDMARD ou un tsDMARD, un autre bDMARD ou un autre tsDMARD doivent être considérés ; après échec d'un traitement par anti-TNFα, les patients peuvent recevoir un autre anti-TNFα ou un agent présentant un autre mode d'action.

1.6.3.3 Gestion de la rémission et prise en charge globale

Si un patient présente une rémission persistante après avoir diminué les glucocorticoïdes, il est possible d'envisage la réduction du bDMARD, surtout si le traitement est combiné avec un csDMARD. Si un patient présente une rémission persistante, la réduction du csDMARD peut être considérée.

Bien que les connaissances sur la physiopathologie de la PR aient progressé et que les traitements sont de plus en plus ciblés sur les mécanismes de la pathologie, les données épidémiologiques indiquent une mortalité prématurée des patients PR. En effet cette pathologie rhumatismale

présente des manifestations extra-articulaires, notamment cardiovasculaires, conduisant à des complications pouvant mettre en jeu le pronostic vital du patient.

2 La polyarthrite rhumatoïde et le risque cardiovasculaire

2.1 Prévalence

Bien qu'une mortalité cardiovasculaire (CV) élevée est notifiée dès le début des années 1950, [56] jusque dans les années 2000, cet aspect de la pathologie ne faisait pas l'objet de beaucoup d'attention (87 publications dans Pubmed avant 2000 *vs* 2 751 publications depuis 2000). Pourtant, il est bien connu et démontré aujourd'hui que le patient PR présente une augmentation du risque CV de 48 % par rapport à la population générale, conduisant à une augmentation de la morbi-mortalité CV de 50 à 60 % et à une réduction de l'espérance de vie de 3 à 10 ans, voire plus [22,57–60]. Il a été démontré que le risque CV du patient PR est équivalent à celui du patient diabétique de type 2, connu pour avoir une très importante mortalité CV [61–63]. Toutefois ces données sont soumises à controverses. Une méta-analyse de 2018 ayant duré 4 ans et portant sur 920 772 sujets (PR, diabétiques ou les deux) montre que les patients diabétiques présentent statistiquement un plus fort risque CV que les patients PR [64]. A l'inverse, une autre étude longitudinale ayant duré 15 ans et portant sur 326 patients PR comparés à 1 869 patients « référence » à risque CV traditionnel (dont 206 patients insulinorésistants et 162 patients diabétiques de type 2) montre que, comparativement à la cohorte contrôle non diabétique, les patients PR ont un risque CV plus important que les diabétiques [65]. Il est néanmoins sûr que la présence des facteurs de risque CV traditionnels ne peuvent pas expliquer à eux seuls l'augmentation du risque CV du patient PR [22]. C'est pourquoi, depuis 2010, la PR est reconnue comme étant un facteur de risque CV indépendant [22].

Il a été montré que l'augmentation du risque CV du patient commence au moins deux ans avant le diagnostic de PR et jusqu'à un an après au plus tard [66–68], ce qui n'est toutefois pas démontré dans toutes les études [69]. Ces résultats controversés peuvent s'expliquer par la présence de facteurs de gravité propres à la maladie : les patients séropositifs en FR et ACPA de moins de 55 ans au diagnostic présentent un risque CV plus important et plus précoce que les patients séronégatifs [66]. Dans tous les cas, il est montré que le risque CV continue d'augmenter avec l'ancienneté de la PR [68], mais il semblerait que ce ne soit pas la durée mais l'activité de la maladie qui contribue à

cette augmentation [70], puisque le nombre de poussées inflammatoires et leurs intensités semblent contribuer au risque CV du patient [70,71]. Tous les patients PR présentent un risque CV accru, qu'ils souffrent d'une pathologie avec une faible (2,6<DAS28≤3,2), une moyenne (3,2<DAS28≤5,1) ou une forte activité (DAS28>5,1) [72]. Toutefois, une PR de forte activité mal contrôlée semble plus contribuer à l'aggravation du risque CV [70]. De façon rassurante, une très importante méta-analyse datant de 2013 portant sur 11 études (représentant 51 819 patients) réparties sur les cinquante dernières années a montré une diminution de la mortalité CV au cours de ces 5 décennies passées, bien qu'elle reste supérieure à la population générale [58]. Ceci peut s'expliquer par un diagnostic plus précoce et une meilleure prise en charge avec les bDMARDs. Cette hypothèse est confirmée par une étude de 2017 portant sur 24 914 patients PR vs 24 914 individus « contrôles » répartis en deux cohortes, la première allant de 1996 à 2000 et la deuxième de 2001 à 2006 [73]. Les patients de la première cohorte présentent une mortalité CV plus importante que ceux de la deuxième, montrant bien que la mortalité CV du patient PR est mieux contrôlée, sans pourtant être abaissée au niveau de la population générale. De plus, contrairement aux patients avec une PR active, les patients en rémission (DAS28≤2,6) présentent un risque CV fortement diminué [41,72,74].

2.2 Atteintes cardiovasculaires

Une importante méta-analyse de 2012 incluant 41 490 patients PR a montré que la première cause de mortalité CV du patient PR est l'ischémie cardiaque [75]. En comparaison à la population générale, le risque de pathologies coronariennes tend à doubler voire à tripler chez le patient PR [76], et le risque d'infarctus du myocarde (IDM) est augmenté entre 50 et 70 % selon les auteurs [61,64,75,77–81]. De façon intéressante il a été montré que le risque d'IDM du patient PR est équivalent au risque du patient non-PR 10 ans plus âgé [61]. De plus, il a été rapporté que les patients PR présentent majoritairement une ischémie myocardique « atypique », c'est-à-dire en l'absence de plaque d'athérome au niveau des coronaires par rapport à la population générale, suggérant plutôt la présence d'une dysfonction coronarienne à l'étage microvasculaire [78].

Le moment d'apparition du sur-risque d'IDM est controversé. En effet, certaines études montrent une augmentation du risque avant même l'apparition de la PR [68], alors que d'autres ne trouvent pas d'augmentation du risque d'ischémie cardiaque au début de la PR [82]. Toutefois les études s'accordent à montrer une augmentation rapide du risque CV dans l'année qui suit le diagnostic [68,83]. En accord avec ces données, il a été montré une forte incidence d'IDM, mais aussi

de décès coronariens et d'artériopathies périphériques, chez les patients récemment diagnostiqués (moins de 1 an), suivie d'une diminution de cette incidence dans les 2 à 9 ans suivant le diagnostic, avant une nouvelle augmentation de l'incidence au-delà de 10 ans [84]. De plus, une étude cas-contrôle suédoise montre qu'une forte activité de la maladie est associée à une augmentation du risque de syndrome coronarien [85]. Contrairement au risque CV toutes causes confondues, l'augmentation du risque d'IDM n'est pas différente entre les patients séropositifs FR et les patients séronégatifs [82,83].

Il est également démontré une augmentation du risque d'insuffisance cardiaque (IC) congestive de 87 % en cas de PR par rapport à la population générale [75,81]. En accord avec ces observations, il est retrouvé des taux augmentés de *brain natriuretic peptide* (BNP) chez les patients PR, témoin de l'insuffisance cardiaque [86]. Le risque d'IC semble augmenter dès les premiers signes de la PR [87,88], voire même avant le diagnostic, et reste plus important comparé à la population générale durant les 46 années de suivi menées par Nicola *et al.* [87]. Une très récente étude s'est intéressée aux atteintes cardiaques sur un modèle de primate non-humain développant spontanément une PR [89]. Ce travail a montré que les singes PR, comparés à des singes contrôles, présentent des atteintes cardiaques (infiltration de cellules de l'inflammation, apoptose et fibrose) bien avant que des dysfonctions cardiaques ne soient détectables cliniquement, indiquant que les atteintes cardiaques sont précoces dans la PR. De façon intéressante, les patients PR séropositifs FR présentent un risque d'IC plus important que les patients séronégatifs [87]. Il est à noter que l'IC avec une fraction d'éjection préservée est plus prévalente mais plus mortelle chez le patient PR par rapport au patient insuffisant cardiaque non-PR [90]. Il est fréquemment retrouvé chez le patient une dysfonction systolique et/ou diastolique gauche [86,91], un remodelage [92], une augmentation de l'épaisseur [93,94] et de l'index de masse du ventricule gauche, c'est-à-dire une hypertrophie ventriculaire [86,91,93]. Paradoxalement, il a également été montré une diminution de l'index de masse du ventricule gauche [92] voire une absence de modification fonctionnelle et morphologique de ce ventricule [95]. Il est retrouvé chez le patient PR une inflammation du myocarde (dans environ 30 % des cas, corrélant avec l'activité de la PR [95]) et une fibrose provoquant une dysfonction myocardique, conduisant à l'IC [96]. L'activité de la PR (évaluée par SDAI, CDAI ou DAS28) semble associée à l'épaisseur de la paroi du ventricule gauche et à la fonction systolique gauche, mais pas à la masse du ventricule gauche [93,94]. Cette activité est aussi associée à la fibrose myocardique [79,96].

De façon intéressante, le taux de pro-BNP et la fonction ventriculaire gauche sont corrélés avec la VS et à la durée de la PR [97]. Aucune association n'a été retrouvée entre la durée de la PR et la masse ou l'épaisseur du ventricule gauche [93]. Le lien entre la dysfonction diastolique avec la durée et/ou la sévérité de la PR est pour l'instant controversé [86,91,98].

Le risque d'arrêt cardiaque est doublé voire triplé dans la PR [76,80,84]. La cause de ce sur-risque provient vraisemblablement d'une augmentation du risque d'arythmie cardiaque avec une augmentation du risque de fibrillation atriale de 40 % par rapport à la population générale [61,81], en lien avec une augmentation de l'intervalle QT observée dans la PR [97,99]. Il est également montré chez le patient PR une baisse de la variabilité de la fréquence cardiaque (évaluée durant les 10 minutes suivant un léger stress), en raison d'une altération de la fonction parasympathique cardiaque, concourant à l'augmentation du risque CV (augmentation du risque d'arythmies, de mort subite ou d'IDM), ainsi qu'une baisse de la sensibilité du baroréflexe [81,100]. Une corrélation négative a été montrée entre l'activité de la pathologie et la variabilité de la fréquence cardiaque [81]. Enfin, il a été rapporté des endocardites et des péricardites (prévalence de 30 à 50 %), des valvulopathies (40 % des patients) accompagnées de nodules ou de fibrose pouvant entrainer une insuffisance ou un rétrécissement valvulaire avec régurgitations pulmonaire et tricuspide, des cardiomyopathies (secondaires à un infiltrat inflammatoire, à des dépôts amyloïdes ou à l'utilisation des GC), des thromboses veineuses et des hypertensions pulmonaires [79,81,86,91,101].

2.3 Atteintes cérébrovasculaires

L'importante méta-analyse d'Avina-Zubieta *et al.* a montré que l'accident vasculaire cérébral (AVC) est la deuxième cause de mortalité CV du patient PR [75]. Le risque d'AVC est augmenté de 41 % à 90 %, voire doublé selon les auteurs, par rapport à la population générale [61,75,77,80,102,103]. L'équipe de Zöller *et al.* a montré une prévalence plus importante d'AVC hémorragique que d'AVC ischémique [102]. Toutefois, les données de cette étude, qui s'est uniquement intéressée à la population suédoise, ne sont pas confirmées par une importante méta-analyse de 2016 qui n'a pas montré de différence entre les risques d'AVC ischémique et hémorragique chez le patient PR [103]. Quel qu'en soit le type, le risque de développer un AVC est maximal la première année suivant le diagnostic, puis décroit progressivement au cours des années, en restant tout de même supérieur

à la population générale [102]. Il a récemment été démontré que la PR est significativement associée à un risque augmenté de récidive d'AVC ischémique, *a contrario*, ce sur-risque n'a pas été retrouvé pour l'AVC hémorragique [104]. Malgré une amélioration de la prise en charge de la PR et de l'inflammation associée au cours de cette décennie (de 2010 à 2018), par rapport à la dernière décennie (de 2002 à 2010), la prévalence des AVC ischémiques chez le patient PR n'a pas changé entre les deux périodes [105]. En accord avec ces données, l'équipe de Low *et al.* montre que l'utilisation des anti-TNFα n'influence pas l'occurrence des AVC ischémiques chez le patient PR par rapport aux patients PR traités par csDMARDs [106].

Il est connu que, dans la population générale, les causes des troubles cérébrovasculaires (micro-infarctus, microhémorragies) entraînent des dommages au niveau de la structure et de l'intégrité des vaisseaux conduisant à des anomalies de perfusion du cerveau, provoquant un défaut de fonctionnement voire une mort neuronale induisant des atteintes de la fonction cérébrale (troubles cognitifs, dépression, démences, …) [107]. Une récente étude expérimentale réalisée dans le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant chez le rat a montré une baisse des taux cérébraux en *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), un facteur impliqué dans les fonctions cognitives et la plasticité cérébrale, par rapport aux animaux contrôles [108], associée à une dysfonction endothéliale des microvaisseaux cérébraux (indirectement évaluée par l'expression des *nitric oxide synthase* endothéliales) [109]. Ainsi, l'augmentation de l'incidence des troubles cérébrovasculaires dans la PR pourrait expliquer, en partie, une prévalence augmentée des atteintes cognitives chez ces patients.

En accord avec cette hypothèse, une récente revue analysant 15 articles met en évidence la présence de troubles cognitifs chez les patients PR par rapport à la population générale, avec une atteinte de l'attention, de la mémoire, de la fonction verbale et du jugement [110]. Quelques articles ont évalué la prévalence de ces troubles et montrent qu'entre 30 à 60 % des patients en souffrent [111–113]. Il a également été démontré que le risque de démence dans la PR est augmenté de 61 % [114]. Les troubles cognitifs semblent exacerbés par les GC [113], et paradoxalement, le MTX [110]. La recherche de corrélation entre troubles cognitifs et l'activité de la maladie et les troubles cognitifs a été faite, mais les résultats divergent et ne permettent pas de conclure sur un quelconque lien [110,115].

En raison de sa symptomatologie et de la difficulté à la diagnostiquer, la dépression est sous-diagnostiquée et sous-traitée dans la PR [116]. Sa prévalence dans la PR est extrêmement disparate dans la littérature, mais une méta-analyse de 2013 l'estime entre 14,8 % et 38,8 % [117]. La dépression est plus fréquente dans la PR que dans la population générale et est associée à la douleur, la fatigue, la diminution de la qualité de vie, l'augmentation du handicap physique et les coûts de santé, ce qui augmente les comorbidités, le risque CV et d'IDM, les tentatives de suicide, et ce même avec contrôle optimal de l'activité de la pathologie [116,117]. Sa prise en charge est pourtant primordiale : alors que les patients PR ou dépressifs ont un risque augmenté d'AVC de 43 % et de 57 % respectivement par rapport à la population générale, les patients présentant une PR et une dépression présentent un risque doublé de développer un AVC [118]. De façon intéressante , il a été montré une corrélation négative entre l'âge des patients PR et la prévalence de la dépression [117]. Le lien entre activité de la PR et dépression est controversé dans la littérature [116].

Une faible augmentation de la prévalence des troubles bipolaires a également été retrouvée chez les patients PR par rapport à la population générale [119].

2.4 Evaluation et recommandations de prise en charge du risque cardiovasculaire chez le patient et leurs limites

Chez le patient PR, la prise en charge du risque CV constitue une part de sa prise en charge globale, avec une évaluation et un traitement des facteurs de risque CV traditionnels [120]. L'EULAR a émis en 2016 des nouveaux principes de surveillance et des recommandations pour la prise en charge du risque CV du patient PR [59]. Tout d'abord, il est indiqué en premier lieu que le clinicien doit être conscient du risque CV augmenté du patient PR par rapport à la population générale. Ensuite, le rhumatologue doit s'assurer de la prise en charge de ce sur-risque, et que l'utilisation d'AINS et de GC doit être en accord avec les recommandations spécifiques de traitement émises par l'EULAR. De plus, il est recommandé que :

1. L'activité de la pathologie doit être contrôlée de façon optimale dans le but de réduire le risque CV du patient ;
2. L'évaluation du risque CV est recommandée pour tous les patients tous les 5 ans au minimum, et doit être reconsidérée à chaque changement majeur de thérapie antirhumatismale ;

3. L'évaluation du risque CV du patient doit se faire en accord avec les recommandations nationales et le modèle *Systematic Coronary Risk Evaluation* (SCORE) doit être utilisé s'il n'existe pas de conduites à tenir instaurées par les instances nationales ;
4. Le cholestérol total et les *high density lipoproteins* (HDL) doivent être utilisés pour évaluer le risque CV dans la PR et les lipides doivent idéalement être dosés quand la pathologie est stable ou en rémission ;
5. Les modèles de prédiction du risque CV doivent être adaptés au patient PR par un facteur multiplicateur de 1,5, si cela n'est pas déjà inclus dans l'algorithme ;
6. L'exploration de l'athérosclérose subclinique par échographie doit être considérée dans l'évaluation du risque CV du patient PR ;
7. Les recommandations hygiéno-diététiques doivent souligner les bénéfices d'un équilibre alimentaire sain, d'une activité physique et d'un arrêt du tabac ;
8. La gestion du risque CV doit être effectuée conformément aux directives nationales dans la PR, l'utilisation des antihypertenseurs et des statines doit se faire comme dans la population générale ;
9. La prescription d'AINS dans la PR doit être faite avec prudence, surtout chez les patients présentant des pathologies CV connues ou en présence de facteurs de risque ;
10. Le traitement par GC doit être le plus court possible au dosage minimum, et la réduction des GC doit être faite en cas de rémission ou de faible activité de la pathologie ; les raisons de prolonger une thérapie par GC doivent être régulièrement reconsidérées.

Bien que visant à améliorer le diagnostic et la prise en charge du risque CV du patient PR, ces recommandations présentent des limites. Le comité de l'EULAR en charge de l'évaluation de ces principes présente un niveau d'agrément élevé (au moins 8,8/10) pour presque toutes les recommandations, toutefois la sixième est soumise à discussion puisque le niveau d'agrément est seulement de 5,7/10. De plus, les forces de recommandation et les niveaux de preuves sont faibles puisque se basant majoritairement sur des revues systématiques d'études de cas-contrôles, des études cas-contrôles ou des études de cas, et très peu sur des cohortes de patients ou des revues systématiques avec homogénéité des patients.

De plus, une très récente revue systématique incluant 6 articles représentant 478 sujets a montré que 73 à 97 % des patients PR ne sont pas conscients du risque CV lié à leur pathologie [121]. Ces lacunes sont surtout retrouvées vis-à-vis du rôle de l'exercice physique et des traitements par AINS

et GC, et essentiellement chez les patients présentant le plus haut risque CV. Ainsi, bien que l'ensemble de la communauté des rhumatologues est consciente du risque CV du patient, conformément aux recommandations de l'EULAR, la prise en charge ne semble pas optimale puisque le patient n'a pas connaissance de son sur-risque et des moyens possibles pour le réduire.

Une bonne prise en charge du risque CV passe par une bonne détermination de ce risque CV [122]. Plusieurs modèles d'évaluation existent avec pour les plus importants :

- le score de Framingham (FRS), qui évalue le risque coronarien à 10 ans en tenant compte du sexe, de l'âge, du cholestérol total, des HDL, du tabagisme et de la présence de diabète et d'HTA systolique (traitée ou non) ;
- le SCORE (**Figure 7**), qui estime le risque de décès d'origine CV à 10 ans en tenant compte des mêmes facteurs que le FRS à l'exception des HDL, du diabète et des âges inférieurs à 45 ans ou supérieurs à 65 ans.

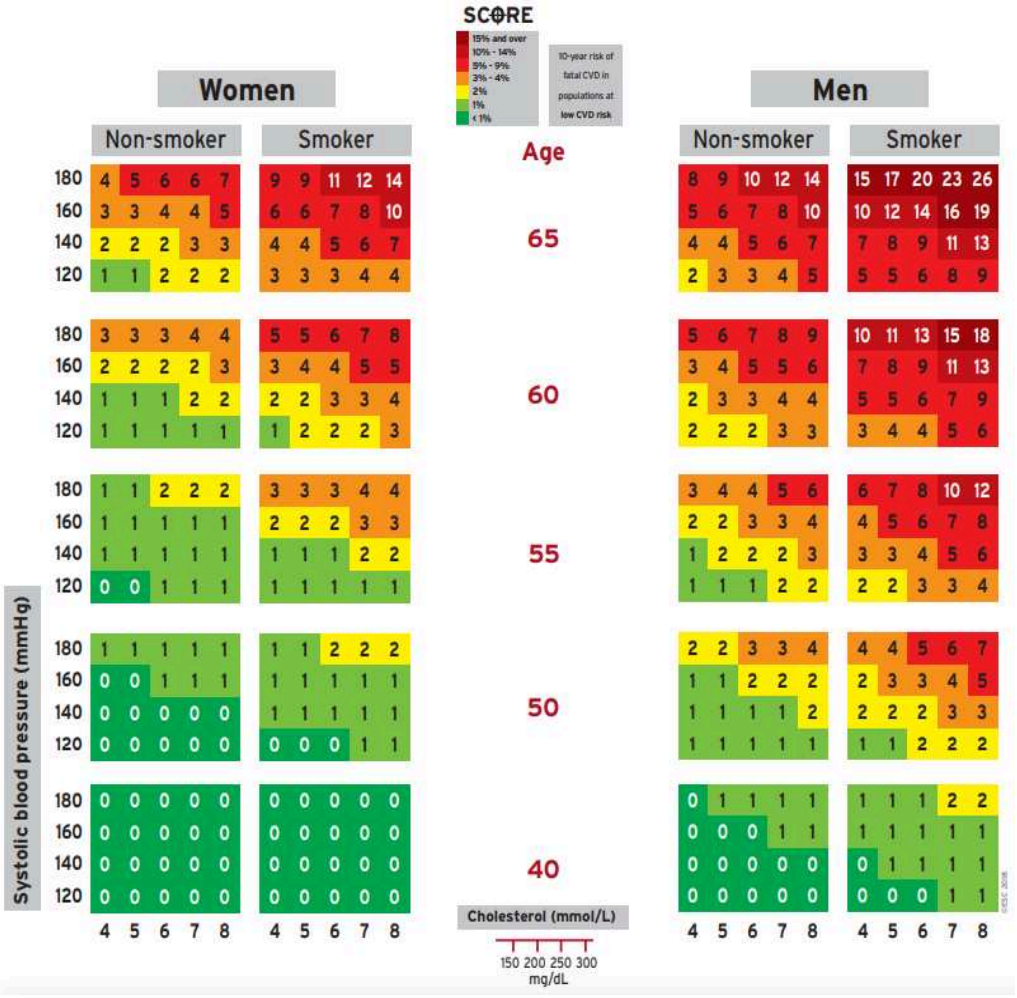


Figure 7 – Evaluation du risque cardiovasculaire par le modèle SCORE (systematic coronary risk evaluation) [123]

Le SCORE est le modèle le plus utilisée en Europe et est considéré comme le plus adapté aux patients PR [124]. Toutefois, tous les modèles sous-estiment le risque CV du patient PR puisque les facteurs de risque traditionnels ne permettent pas d'expliquer à eux seuls la surmortalité observée chez le patient [124–126]. De plus, la prévalence des patients présentant un risque CV modéré ou élevé varie selon le score utilisé [127]. Toutefois, il existe une bonne concordance entre les scores Framingham et Dorica (classant plus de 80 % des cas dans la même catégorie) et les scores Framingham et SCORE (plus de 70 % de concordance) [127]. Des tentatives ont été faites pour développer de nouveaux scores spécifiques à la PR [128–130] ou apporter des modifications aux scores déjà existants (comme l'utilisation de coefficients multiplicateurs) [22], mais cela ne permet pas de surpasser les modèles utilisés dans la population générale [129,131].

En conclusion, les moyens de diagnostic et d'évaluation mis à disposition des praticiens ne permettent pas une prise en charge totalement efficace du risque CV du patient PR en raison d'un diagnostic imprécis et d'une méconnaissance du patient vis-à-vis de son sur-risque CV. L'EULAR cherche à surpasser ces difficultés en améliorant ses recommandations de prise en charge qui, malheureusement, ne présentent pas encore un degré de preuve suffisant en raison de l'hétérogénéité des patients PR et de résultats régulièrement controversés.

2.5 Mécanismes impliqués dans le sur-risque cardiovasculaire

2.5.1 Facteurs de risque cardiovasculaires traditionnels

Les facteurs de risque CV traditionnels (âge, sexe masculin, antécédents familiaux, diabète et syndrome métabolique, l'hypertension artérielle (HTA), dyslipidémie et obésité, tabac) semblent jouer un rôle modeste dans l'augmentation du risque CV du patient PR puisque le risque relatif d'évènements CV ne diminue que très légèrement après ajustement statistique de ces facteurs de risque [63,101,132,133].

2.5.1.1 Hypertension artérielle

L'HTA, définie comme étant une hausse de la pression artérielle systolique (≥ 140 mmHg) et/ou une augmentation de la pression artérielle diastolique (≥ 90 mmHg), apparaît dès les premiers

mois de la PR et touche 50 à 70 % des patients [60,68,134–138]. Une étude prospective d'un an a montré un nombre significativement accru de patients PR atteints d'HTA à la fin de la période d'observation (de 42,36 à 55,62 %), augmentant considérablement le risque CV du patient PR [139]. Les patients PR avec de l'HTA ont un risque d'IDM augmenté de 84 % par rapport aux patients PR non-hypertendus [138]. Il a très récemment été montré une interaction additive significative entre PR et HTA, c'est-à-dire une action synergique entre les deux facteurs augmentant le risque de pathologies cardio et cérébrovasculaires [76]. L'accumulation de comorbidités contribue au développement de l'HTA. Dans un premier temps, l'inflammation contribue à l'activation et à la dysfonction endothéliale provoquant une augmentation de la rigidité artérielle conduisant à une augmentation des résistances périphériques et donc de la pression artérielle [135]. La sédentarité du patient PR due à ses douleurs et ses raideurs articulaires contribue à l'HTA puisqu'il est démontré que l'inactivité physique augmente l'incidence d'HTA aussi bien dans la population générale que dans la population PR, mais contribue aussi à la dyslipidémie et à l'obésité qui jouent un rôle dans l'HTA [135,140]. Pourtant, l'HTA est sous-diagnostiquée et sous-traitée, alors qu'elle est un facteur de risque modifiable majeur, contribuant à une augmentation du risque CV des patients PR [60,134,137]. En effet, par ses effets au niveau de la rigidité artérielle et de l'homéostasie calcique, l'HTA favorise la fibrose interstitielle conduisant à une dysfonction diastolique et systolique [91,135,141,142]. De plus, il a été démontré qu'un contrôle de la pression artérielle améliore les paramètres cardiaques en cas de PR [91].

2.5.1.2 Dyslipidémie

Si dans la population générale, les pathologies CV sont associées à une augmentation du taux de lipides circulants, les patients PR présentent une dyslipidémie particulière, commune aux pathologies inflammatoires chroniques, connue sous le nom de « paradoxe lipidique » [143]. Dans la PR, le patient présente une diminution des taux de *low density lipoproteins* (LDL), de cholestérol total (CT), de HDL et une augmentation des taux d'apolipoprotéine (apo) A et d'apoB [72,79]. En outre, les LDL sont plus oxydées ce qui, associé à une augmentation de l'expression des récepteurs *scavengers* par l'inflammation, conduit à une production de MCP-1 attirant les macrophages qui vont devenir des cellules spumeuses après phagocytose des LDL, ce qui favorise la maladie athéromateuse [122]. Il semblerait que la réduction des taux de LDL et de CT est associée à une augmentation d'évènements CV [144]. Toutefois, une autre étude indique que les LDL ne semblent

pas associées au risque d'IDM ou d'AVC en cas de PR [145]. En outre, les HDL perdent leurs propriétés cardioprotectrices en prenant un phénotype pro-inflammatoire, conduisant à une diminution de la capacité d'efflux du cholestérol participant ainsi au processus athéromateux [122]. L'apoA est connue pour être un facteur de risque CV [146], et l'apoB est associée à une progression de l'athérosclérose dans les carotides et les coronaires et est donc indépendamment associée au risque CV [79]. La dyslipidémie observée dans la PR semble être étroitement liée à l'inflammation : il a été montré que le taux de HDL est corrélé avec le taux de CRP et l'activité de la maladie [86]. La diminution des taux de lipides semble apparaitre plusieurs années avant les premiers symptômes [67], ces taux étant déjà significativement plus faibles dans la PR débutante par rapport aux contrôles [136]. Ainsi, en cas de PR il est observé une dyslipidémie singulière, marquée par une diminution qualitative et quantitative des lipides circulants, notamment des HDL qui perdent leurs propriétés cardioprotectrices, conduisant à une augmentation du risque CV du patient.

2.5.1.3 Obésité

De façon très surprenante et contrairement à la population générale, les patients PR présentant un IMC faible (< 20 kg/m²) ont un risque CV plus important que les patients avec un IMC élevé [60,120,122,147,148]. Ce phénomène est connu sous le nom de « paradoxe obésitaire ». Ceci s'explique par la cachexie rhumatoïde, définissant la fonte musculaire accélérée due à l'inflammation systémique, bien que devenue anecdotique de nos jours. Ainsi, il est nécessaire de conserver une certaine adiposité chez le patient, mais sans excès. En effet, l'obésité dans la PR contribue à une inflammation systémique, une résistance à l'insuline et une augmentation du risque CV dus au relargage d'adipokines et de médiateurs pro-inflammatoires conduisant à des anomalies fonctionnelles endothéliales et vasculaires [148,149].

2.5.1.4 Insulinorésistance

Une diminution de sécrétion et de sensibilité à l'insuline conduit au développement de diabète de type 2, connu pour doubler le risque CV et d'IDM du patient PR [64,101,138]. L'insulinorésistance, dont la prévalence est augmentée de 30 à 35 % dans la PR [150,151], est un facteur de risque d'athérosclérose, augmentant de 70 % le risque de cardiopathie ischémique [101,147]. Il semble que

l'insulinorésistance commence à apparaitre dans les stades précoces de la PR [136]. La présence du syndrome métabolique est associée à l'activité de la PR [152].

2.5.1.5 Age

En comparaison avec la population générale, il a été montré que les patients PR jeunes de moins de 65 ans présentent un risque d'évènements CV plus important que les patients PR de plus de 65 ans (risque relatif en comparaison avec la population générale = 3,33 *vs* 1,9, respectivement) [153], ce qui est confirmé par d'autres équipes [76,103,154]. L'augmentation prématurée des évènements CV chez le patient PR explique le risque fortement accru chez les moins de 50 ans [153]. Or, la population générale en vieillissant présente un risque augmenté d'évènements CV, ce qui, parallèlement à un nombre constant voire légèrement augmenté d'apparition d'évènements CV chez les patients PR, tend à diminuer les risques entre ces deux populations avec le vieillissement. Ainsi, les patients jeunes sont plus à risque de développer un évènement CV que la population générale, nécessitant une surveillance accrue de ces patients.

2.5.1.6 Tabagisme

Qu'il soit actif ou sevré, le tabagisme est un facteur de risque CV très important dans la PR, augmentant de 50 % ce risque par rapport au patient PR non-fumeur [138]. Il augmente en effet le risque de développement de FR et ACPA et est associé à une maladie plus sévère, conduit à une rigidité artérielle et donc des problèmes d'HTA et d'athérome [68,138,147]. Il est associé à une augmentation du risque de récurrence d'AVC et d'accident ischémique transitoire (AIT) proportionnellement à son ancienneté [104].

2.5.2 Athérome et athérosclérose

L'athérome se développe lorsque l'endothélium est activé et dysfonctionnel. Un endothélium activé surexprime des molécules d'adhérence tels que VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*), des sélectines (E-sélectine, P-sélectine), MCP-1 [155–157]. Il devient plus perméable aux monocytes, aux lymphocytes T et aux lipides. Les LDL pénétrant l'endothélium sont oxydées provoquant un environnement inflammatoire qui s'auto-

entretient. En effet, cette inflammation favorise l'expression de MCP-1 et la diapédèse des monocytes ce qui aggrave l'activation et la dysfonction endothéliale. Les monocytes une fois activés deviennent des macrophages qui phagocytent les LDL oxydées ce qui conduit à la formation de cellules spumeuses qui s'accumulent dans la paroi vasculaire. Parallèlement à cela, il y a une sécrétion de métalloprotéases destructrices de la matrice extracellulaire. Ces mécanismes conduisent à la formation d'un centre lipidique constitué des cellules spumeuses, entourées d'une chape fibreuse constituée de cellules musculaires lisses, qui migrent de la média vers l'intima, et de protéines matricielles extracellulaires (collagène, protéoglycanes). Ceci conduit à une sclérose de l'artère, c'est l'athérosclérose. Les complications de cette atteinte sont une sténose de la lumière artérielle due à la progression de la plaque, une rupture de la plaque, qui peut conduire à l'activation plaquettaire et la formation d'un thrombus pouvant s'emboliser.

La mesure par échographie de l'épaisseur de l'intima-media carotidienne (*carotid intima-media thickness*, cIMT) permet d'obtenir précocement des informations sur la maladie athéromateuse, ce qui en fait un bon indicateur de l'athérosclérose [158–160]. Cette technique consiste à mesurer l'épaisseur de l'intima (soit l'endothélium) et de la media vasculaire (soient le tissu connectif et les cellules musculaires lisses) qui sont les zones de formation de la plaque d'athérome. La cIMT est corrélée avec un risque augmenté de lésions athéromateuses et avec les évènements CV [161,162], ce qui en fait un bon indicateur de la maladie athéromateuse et un bon élément prédictif des évènements CV [160]. Il est montré que la cIMT est augmentée chez les patients PR [160,163]. En accord avec les données démontrant une athérogenèse accélérée, la cIMT augmente rapidement durant la première année suivant le diagnostic de la PR [164]. De façon intéressante, il a été montré que plus la durée des symptômes de la PR est longue et/ou moins la thérapie est agressive, plus la cIMT augmente [164]. Ceci est confirmé par une méta-analyse montrant une association entre la cIMT et le DAS28 [160] et une étude montrant que les patients avec une faible activité de la pathologie n'ont plus de différence de cIMT entre patients et population générale [97]. De plus, il a été montré une corrélation positive entre durée de la pathologie et cIMT [97]. Toutefois une étude récente montre une cIMT plus importante chez des patients PR avec une faible activité de la pathologie, par rapport au un groupe contrôle exempt de pathologie [165]. De façon très intéressante, cette étude montre dans le groupe PR une cIMT plus élevée chez les hommes que chez les femmes en dépit d'un âge et d'une activité de PR similaires.

Il est montré une très importante augmentation de la prévalence (*odd-ratio* = 3,61) de plaques d'athérome artérielles chez le patient PR par rapport à la population générale [120,160]. Chez ces patients, les lésions athéromateuses apparaissent plus précocement et ont une évolution plus rapide que dans la population générale, due à l'inflammation chronique [80,120,166]. La présence de plaques d'athérome carotidiennes est associée à une diminution de la survie CV du patient PR et est fortement liée à l'apparition de syndrome aigu coronarien [167]. Les facteurs de risque spécifiques de la PR (présence de FR, l'inflammation, le terrain génétique et les traitements de la PR) agissent en synergie avec les facteurs de risque CV traditionnels et contribuent à l'accélération du développement de la plaque athéromateuse [68,168].

Une étude transversale récente montre que l'apparition de l'athérosclérose subclinique a une incidence plus grande dans les phases de PR débutante par rapport à la population générale, et diminue progressivement dans le temps, probablement sous l'action des DMARDs [169]. Cependant, la durée et la sévérité de la PR sont associées positivement à la taille et à la vulnérabilité de la plaque chez les patients [170]. Il est en effet montré que la prévalence et la sévérité de la calcification coronaire, correspondant à un stade tardif de développement de la plaque athéromateuse, sont augmentées chez les patients avec une PR tardive par rapport aux PR précoces et aux patients contrôles [171].

L'athérosclérose conduit donc à un défaut de circulation du sang et de perfusion des organes par une réduction du calibre artériel, mais aussi à une augmentation de la rigidité artérielle par des modifications structurales et fonctionnelles des vaisseaux [120]. La rigidité artérielle se définit comme une perte de la compliance artérielle, c'est à dire de la fonction d'amortissement des troncs artériels [147,172]. Cette perte de compliance va induire des dommages au niveau des artérioles et des capillaires qui vont recevoir un flux sanguin turbulent et pulsatile, provoquant des dommages au niveau des organes tels que le cerveau et le cœur [172]. Des relations ont été démontrées entre les atteintes des microvaisseaux cérébraux et cardiaques et la rigidité artérielle [172,173]. Ainsi, l'athérosclérose et la rigidité artérielle causent des complications cardio et cérébrovasculaires (IC, maladies coronariennes, AVC) et augmentent le risque d'HTA [120,142,174]. En outre, l'augmentation de la rigidité artérielle provoque d'une part des altérations de la fonction et de la structure coronarienne conduisant à des problèmes ischémiques, et d'autre part une hypertrophie ventriculaire gauche conduisant à des arythmies. L'ensemble de ces problèmes

conduisent à des dysfonctions systolique et diastolique provoquant à terme une IC [142]. Un moyen d'évaluer la rigidité artérielle est la mesure de la vitesse de l'onde de pouls (VOP). Il a été démontré dans la PR une augmentation de cette VOP, reflétant une augmentation de la rigidité artérielle, en phase précoce de la PR [160]. Cette augmentation de VOP est positivement associée à la cIMT [175], à la durée [176] et la sévérité de la pathologie [160], à l'âge des patients, au taux de CRP [177] et à l'athérosclérose coronaire [178].

2.5.3 Inflammation

Des études ont montré que des taux élevés de CRP sont prédictifs de pathologies CV dans la population générale [179] et dans la PR [145]. Il a été montré que les paramètres inflammatoires (CRP, VS, …) sont associés à une augmentation significative du risque CV en cas de PR [145,180,181], et aux pathologies CV (IDM, IC) [79] et cérébrovasculaires [145]. En accord avec ces observations physiopathologiques, la diminution de l'inflammation par les traitements de la PR réduit le risque CV et la progression des maladies CV [70,79,122,146].

Des données montrent l'implication de l'inflammation dans les étapes de l'athérogenèse et dans les processus qui conduisent à la vulnérabilité de la plaque d'athérome [120]. Le TNFα est connu pour induire des cascades d'activation d'autres cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et IL-8) mais aussi des prostaglandines et métalloprotéases, impliquées dans la pérénisation de l'inflammation et de l'athérogenèse [67]. Dans la PR, le TNFα, l'IL-1β, l'IL-6 et l'INFγ semblent contribuer au développement de l'athérosclérose et à l'augmentation du risque CV [78,159]. En effet, ces cytokines augmentent l'expression de molécules d'adhérence conduisant à l'activation et à la dysfonction endothéliales, et au développement de l'athérome [182,183]. En accord avec ces données, les patients PR avec une cIMT pathologique présente des paramètres d'activité de la PR (VS et DAS28) supérieurs aux patients PR qui ne présentent pas de cIMT anormale [97]. De plus, les espèces réactives de l'oxygène vont participer à l'oxydation des LDL, acteurs majeurs de l'athérome en stimulant la fixation des monocytes à l'endothélium, la formation de cellules spumeuses, mais également au développement de la plaque, à sa fragilité et aux complications thrombotiques [146]. Le taux de CRP est corrélé au degré d'athérosclérose subclinique évaluée par cIMT et également à la VOP [101,184]. L'inflammation contribue à l'association entre forte activité de la maladie et cIMT

augmentée, mais aussi avec une vulnérabilité accrue des plaques coronariennes et carotidiennes [79]. Enfin, il a été montré que le nombre d'articulations gonflées et le taux de CRP sont associés à la progression de la plaque carotidienne dans la PR, mais aussi que les taux circulants d'IL-6 et de TNFα sont indépendamment associés à la calcification des artères coronaires [122].

L'inflammation, notamment le TNFα et l'IL-6, augmente l'insulinorésistance du patient indirectement en stimulant la production d'hormones du stress, notamment le cortisol, et directement en supprimant l'activité de l'*insulin receptor substrate 1* impliquée dans la signalisation du récepteur à l'insuline, ce qui augmente le risque de syndrome métabolique et donc le risque de pathologies CV [101,147,152,185]. L'IL-1β est également impliquée dans le syndrome métabolique en conduisant à des dysfonctions et à l'apoptose des cellules β de Langerhans [152].

Il semblerait que les marqueurs inflammatoires augmentés dans la PR (VS, CRP, nombre de leucocytes, IL-6 et TNFα) soient plus fortement associés à la mortalité CV et l'IC qu'à l'athérosclérose et l'IDM : l'inflammation contribuerait à la dysfonction endothéliale microvasculaire coronnaire, au remodelage myocardique, à la fibrose interstitielle myocardique et à la dysfonction diastolique, conduisant à l'IC [79]. Toutefois, d'autres études ne montrent pas de lien entre l'inflammation et la survenue d'IDM [186] ou d'atteintes microvasculaires coronaires [187,188]. De plus, le TNFα et l'IL-1β semblent être des facteurs importants dans l'hypertrophie ventriculaire gauche [92,189,190]. Il a également été montré que le taux de CRP est associé à la fibrose myocardique [96], à la réduction de la variabilité de la fréquence cardiaque, et à l'augmentation de l'intervalle QT [99]. Enfin, les ACPA seraient associés aux anomalies morphologiques et fonctionnelles du ventricule gauche [122].

Dans la population générale, l'inflammation conduit à un état d'hypercoagulabilité pouvant conduire à des AVC ischémiques [191]. En accord avec cette idée des cytokines semblent impliquées dans la survenue d'AVC. En effet, l'IL-1 jouerait un rôle puisque le traitement par un anticorps anti-récepteur à l'IL-1 réduit la taille de la zone infarcie chez l'animal [192] et tend à améliorer les signes cliniques 3 mois après un AVC chez des patients non-PR [193]. De plus, l'IL-17 semble impliquée dans

la dysfonction endothéliale aortique chez la souris, dans la neuroinflammation et dans les AVC [194]. En effet, chez la souris, l'inhibition de l'IL-17, par neutralisation par anticorps ou sur souris *knock-out* à l'IL-17, permet de réduire la neuroinflammation et les séquelles post-AVC [195]. Enfin, le TNFα est capable de cliver la VE-cadhérine, molécule impliquée dans le maintien des jonctions serrées de l'endothélium, pouvant conduire à une augmentation de la perméabilité endothéliale (incluant la barrière hémato-encéphalique (BHE)), des œdèmes interstitiels voire des hémorragies [122]. Il a également été montré que l'inflammation des vaisseaux et la perte de l'intégrité de la BHE sont des causes d'apparition de troubles neurologiques (troubles cognitifs, démences, AVC, …) [114]. De plus, chez le patient non-PR, l'inflammation est reconnue comme impliquée dans la dépression : les patients dépressifs présentent des taux plus élevés de CRP, d'IL-1, d'IL-6, de TNFα – aussi bien dans le sérum que dans le liquide céphalo-rachidien – et de molécules d'adhérence que les non-dépressifs [116].

En accord avec ces données, il est montré chez le patient PR que le taux de CRP et la VS sont associés au risque d'AVC [145], ainsi qu'une implication de l'inflammation dans l'augmentation de l'incidence de la dépression chez ces patients par rapport à la population générale [196]. Toutefois, ces données sont controversées. Ainsi, les traitements par DMARDs, bien qu'efficaces sur l'inflammation systémique, ne sont pas équivalents dans la réduction du risque d'AVC [197–199] et des atteintes cognitives ou de la dépression [200].

En conclusion, l'inflammation due à la PR semble être un acteur majeur du sur-risque CV du patient PR, en synergie avec les facteurs de risque CV traditionnels. Une récente revue de littérature après analyse multivariée montre que chez les patients PR, 30,3 % du risque CV est expliqué par les caractéristiques de la PR, 49 % du risque CV est expliqué par les facteurs de risques CV traditionnels, et une part de 20,7 % de ce risque CV reste inexpliqué [201]. En cohérence avec ces données, les éléments disponibles actuellement montrent que la réduction de l'inflammation ne suffit pas à elle seule à diminuer le risque CV du patient PR, suggérant que d'autres facteurs sont à prendre en compte [202]. En effet, alors que tous les traitements de la PR diminuent l'inflammation, ils n'ont pas tous les mêmes effets sur le sur-risque CV et ses mécanismes (**Tableau II**) [197,203].

Tableau II – Effets de certains *diseases-modifying anti-rheumatic drugs* (DMARDs) sur le risque cardiovasculaire du patient polyarthrite rhumatoïde (d'après Bartoloni et al. [203])

DMARDs	Dysfonction lipidique	Dysfonction endothéliale	cIMT	Évènements cardiovasculaires
Hydroxychloroquine	Amélioration	ND	ND	↓
Méthotrexate	Amélioration	ND	ND	↓
Anti-TNFα	Neutre / aggravation	↓	↓	↓
Tocilizumab	Aggravation	↓	↔	↔
Abatacept	Neutre	ND	↔	↓
Rituximab	Neutre	ND	↓	↔

cIMT : *carotid intima-media thickness*, TNFα : *tumor necrosis factor α*, ↔ sans effet significatif, ↓ diminue significativement, ND : non disponible

2.6 Effet des traitements sur le risque cardiovasculaire

2.6.1 csDMARDs

Le MTX réduit la survenue globale d'évènements CV de 28 %, d'IDM de 19 %, d'IC de 20 % et d'AVC de 22 % [197]. Les mécanismes impliqués ne sont pas totalement connus, mais il semble que vraisemblablement une augmentation d'efflux du cholestérol [204] – reconnue comme étant inversement associé au risque CV [205] –, en raison d'une augmentation des taux d'adénosine [206], et une induction d'activité enzymatique anti-oxydante mitochondriale [207] soient impliquées. Le MTX possède également des propriétés anti-inflammatoires, passant par l'adénosine, qui en activant son récepteur A_{2A}, permet de réduire l'activation des cellules de l'inflammation (LT, macrophages, monocytes et neutrophiles), réduit l'expression des molécules d'adhérence, et stabilise la progression de la plaque athéromateuse [208]. Le MTX est également associé à une diminution du risque de syndrome métabolique, et réduit également les taux de CRP, TNFα, d'IL-1β et d'IL-6 [203]. Toutefois, par son mécanisme d'action inhibant la dihydrofolate réductase, le MTX augmente les taux circulants d'homocystéine, acide aminé reconnu pour être un facteur indépendant de risque CV par des effets pro-thrombotiques, d'oxydation des LDL et pro-inflammatoires [159,166]. Cependant, l'utilisation d'acide folique en concomitance du traitement par MTX permet de normaliser le taux d'homocystéine et de réduire la mortalité CV [166].

L'hydroxychloroquine réduit la survenue d'évènements CV de 25 % chez le patient PR, par rapport aux patients ne le prenant pas [209]. Le traitement est associé à une amélioration du profil lipidique par une augmentation et une amélioration qualitative des taux de LDL (ce qui rapproche ce profil lipidique à celui de la population générale), une diminution du risque de diabète, un effet anti-thrombotique et une diminution de l'expression des molécules d'adhérence [203].

L'utilisation du léflunomide et de la sulfasalazine au long terme semble réduire le risque CV et l'incidence d'IDM des patients PR [203].

2.6.2 bDMARDS

Les anti-TNFα réduisent la survenue globale d'évènements CV de 30 %, d'IDM de 41 %, d'IC de 25 % et d'AVC de 43 % [197]. L'utilisation des anti-TNFα conduit également à une diminution de la rigidité aortique [210,211], une diminution de l'inflammation myocardique [211], une amélioration de l'index de masse du ventricule gauche [189], une augmentation des taux lipidiques conduisant à une amélioration du profil lipidique [212] et une amélioration de la sensibilité à l'insuline [213]. Il a aussi été démontré expérimentalement sur modèle d'arrêt cardiaque non-PR une amélioration de la dysfonction ventriculaire après traitement par anti-TNFα [214]. De façon contradictoire, des études cliniques ont montré l'absence de bénéfice de l'etanercept chez des patients non-PR souffrant de défaillance cardiaque [215], voire même une exacerbation de cette défaillance chez des patients traités par infliximab souffrant de défaillance cardiaque modérée à sévère [216]. Une récente étude s'est intéressée à l'ischémie cérébrale et a montré qu'un traitement par anti TNFα, l'infliximab (10 mg/kg durant 4 semaines), réduit les lésions cérébrales dues à l'ischémie/reperfusion du cerveau sur un modèle PR de souris transgéniques surexprimant le TNFα par rapport aux souris non traitées [217]. De façon intéressante, les patients PR répondeurs au traitement par anti-TNFα ont une incidence de dépression diminuée de 20 % par rapport au patients PR non-répondeurs au traitement [218].

Bien que le tocilizumab soit associé à une importante augmentation des taux de cholestérol, HDL, LDL et triglycérides (TG) [219,220], il améliore le risque CV à un niveau semblable à celui des anti-TNFα [221], avec une amélioration de la résistance à l'insuline [212], de la dysfonction endothéliale, une diminution de l'activation endothéliale et du stress oxydant [222], une augmentation du taux d'adiponectine [223], une diminution de la rigidité aortique [224] et de l'index de masse du ventricule gauche [99], sans toutefois modifier la cIMT [203].

L'abatacept ne présente aucun effet au niveau de la cIMT ni de la rigidité artérielle chez le patient PR, bien que cela ne soit pas retrouvé par une autre équipe qui montre une amélioration de la VOP [225]. Le traitement entraînerait une réduction du risque CV avec une réduction d'incidence d'IDM et d'AVC en comparaison avec les patients traités par anti-TNFα [203].

Le rituximab est associé à une amélioration du profil lipidique, de la cIMT et de la rigidité artérielle [226]. Toutefois, d'autres études ne trouvent pas ces effets bénéfiques au niveau de la cIMT [227] ou de la rigidité artérielle [228]. Toutefois, ce médicament ne semble pas réduire l'incidence d'évènements CV par rapport aux anti-TNFα et à l'abatacept [203].

Le canakimumab, un anti-IL1, entraîne une réduction du risque CV de 15 % et d'IDM de 24 % [203].

2.6.3 tsDMARDs

Le tofacitinib semble avoir le même effet bénéfique sur le risque CV que les bDMARDs [221]. Le tofacitinib augmente modérément les taux de CT, de LDL et de HDL, sans modification des TG, augmente le ratio CT/HDL et l'efflux du cholestérol [152,219,229,230]. Les mêmes effets sont retrouvés avec le baricitinib, avec toutefois une augmentation des TG et une diminution des LDL [152], bien qu'une récente revue de littérature montre une augmentation des HLD et LDL [231]. Il est également montré une diminution significative de la cIMT après 54 semaines de traitement par tofacitinib, malgré un taux élevé de lipides, ce qui peut expliquer l'absence de modification des caractéristiques de la plaque carotidienne [230]. Toutefois, une récente méta-analyse (représentant 11 799 patients PR issus de 26 essais cliniques) ne trouve pas de réduction du risque d'évènements cardiovasculaires chez le patient PR traité par inhibiteur de JAK par rapport aux patients recevant un placebo [232].

2.6.4 Anti-inflammatoires non stéroïdiens et stéroïdiens

L'implication de l'inflammation dans le risque CV laisse penser que les traitements anti-inflammatoires peuvent avoir un effet bénéfique sur ce risque en réduisant l'incidence des évènements CV. Or il a été montré une augmentation de la survenue d'évènements CV de 18 % pour les AINS et de 47 % pour les GC [197] en cas de PR. Les AINS sont associés à une augmentation du risque d'IDM (risque relatif = 1,13) et d'AVC (risque relatif = 2,15). Ils sembleraient toutefois avoir un effet bénéfique sur l'IC avec une réduction du risque de 14 %. Les AINS inhibiteurs sélectifs des cyclo-oxygénase (COX) de type 2 semblent présenter un risque CV plus important avec une survenue d'évènements CV plus importante que les non sélectifs (36 % contre 8 % respectivement) [197]. Cependant, une étude comparant le célocoxib, le naproxène et l'ibuprofène, ne montre pas de différence en termes de sécurité cardiovasculaire entre les trois molécules [233],

bien qu'il semblerait que le naproxène soit l'AINS le moins nocif au niveau du risque CV [234]. Une récente étude confirme l'effet délétère des AINS sur le risque d'AVC et d'IDM, avec toutefois un risque plus important pour les AINS non-sélectifs [235]. Le diclofenac est contre-indiqué chez les patients souffrant d'une insuffisance cardiaque congestive (classe II-IV NYHA), de maladie ischémique cardiaque, maladie artérielle périphérique et maladie cérébrovasculaire [236], et de nouvelles données ont amené les mêmes restrictions pour l'ibuprofène [237].

Les GC sont associés à une augmentation du risque d'IDM (+ 41 %), d'IC (+ 42 %) et d'AVC (+ 57 %) en cas de PR [197]. L'utilisation des GC est associée à une augmentation dose-dépendante de la mortalité CV à partir de 8 mg/jour [238]. L'utilisation quotidienne de prednisolone à 7,5 mg/jour (correspondant à la dose recommandée quotidienne pour un patient PR de 50 kg) augmente le risque d'IDM de 23 à 32 % [145,239]. Les mécanismes sous-jacents à ce sur-risque ne sont pas très bien déterminés, mais les effets indésirables des GC – prise de poids, résistance à l'insuline, dyslipidémie, augmentation de la pression artérielle – sont fortement suspectés [120,122,240,241]. Pour autant, les bénéfices anti-inflammatoires des GC ne sont pas à négliger puisqu'ils permettent de réduire la douleur et donc d'améliorer la mobilité des patients, mais permettent également d'atténuer les effets néfastes de l'inflammation sur le système CV [59].

2.6.5 Thérapies adjuvantes

En raison de l'incidence augmentée des facteurs de risque CV chez le patient PR, la prise en charge du risque CV peut également passer par la prescription de traitement antihypertenseur et d'inhibiteur de l'hydroxyméthyl-glutaryl-coenzyme A réductase, les statines [59]. A l'heure actuelle, rien n'indique que cette prise en charge nécessite des recommandations différentes chez le patient PR par rapport à la population générale. Les IEC et les ARA II sont à privilégier car ils ont des rôles bénéfiques au niveau de l'inflammation par une réduction des taux de cytokines inflammatoires TNFα et IL-1β [22,59]. Les statines semblent aussi efficaces chez les patients PR que non-PR pour réduire les évènements CV [122] : dans une large cohorte rétrospective dyslipidémique, la prévention primaire des évènements CV avec les statines est comparable entre les patients PR et les contrôles [242]. La large étude multicentrique TRACE RA portant sur 3 002 patients PR répartis sur 102 unités rhumatologiques du Royaume-Uni suivis pendant 2,5 ans n'a pas montré de réduction significative du risque CV entre le groupe traité par 40 mg d'atorvastatine et le groupe placebo [243]. Toutefois, il est à noter que cette étude s'est arrêtée précocement en raison du faible

taux d'évènements inattendus et de la puissance statistique limitée qui en résulte. Une réduction des LDL après initiation du traitement par statine conduit à une réduction de 30 à 40 % du risque CV selon les auteurs [242,243], tandis que l'arrêt du traitement conduit à une augmentation du risque de mortalité CV de 79 % [244]. Il a été montré chez le patient PR et dans un modèle animal d'arthrite induite à l'adjuvant que les statines permettent de convertir les HDL vers un profil anti-inflammatoire et non plus pro-inflammatoire [245], réduisent les taux de LDL et d'apoB, améliorent la rigidité artérielle, réduisent la pression artérielle et le nombre de plaques athéromateuses et augmentent leur stabilité [246–248], réduisent la dysfonction endothéliale, l'inflammation et la production des ROS par inhibition de la NADPH oxydase (NOX) [249,250] et semblent réduire l'activité de la PR [46].

Concernant le bilan lipidique, il est important de noter que, comme mentionné précédemment, le patient PR présente un paradoxe lipidique avec une diminution des taux de cholestérol due à l'inflammation chronique. Les traitements par DMARDs, par leurs effets anti-inflammatoires, conduisent donc à une augmentation quantitative et qualitative, donc une normalisation, des taux de CT, de LDL et de HDL [251], conduisant à une amélioration du ratio CT/HDL [59]. Ce ratio permet d'avoir un reflet de l'efficacité de la thérapie, mais est aussi un bon élément prédictif du risque CV dans la PR par rapport aux composants lipidiques seuls [252,253].

2.6.6 Prise en charge non-médicamenteuse

Il est recommandé au patient de changer ses habitudes de vie avec un régime alimentaire équilibré (comme le régime méditerranéen), une activité physique régulière adaptée et l'arrêt du tabac [59]. La pratique d'une activité physique est associée chez le patient PR à un profil CV favorable, similaire à celui de la population générale [254]. La pratique d'une activité physique aérobie et de résistance a des effets positifs sur la capacité cardiorespiratoire, le taux de lipides, la pression artérielle et la dysfonction endothéliale macro et microvasculaire [255,256].

En résumé, les facteurs de risque CV traditionnels mais aussi ceux spécifiques à la PR, incluant le tabagisme, l'âge, la dyslipidémie, l'HTA, l'hyperglycémie, l'obésité, un taux élevé de CRP, l'inflammation chronique et systémique, la présence de facteurs de gravité interviennent dans le sur-risque CV du patient PR. Il est à noter que ces mêmes paramètres sont connus pour conduire à

une activation et une dysfonction endothéliale qui fait le lit de l'athérogenèse, conduisant aux pathologies CV [146] (**Figure 8**). En accord avec cette idée, une méta-analyse regroupant 41 études, représentant 18 882 participants non-PR, a montré que la dysfonction endothéliale, mesurée au niveau de l'artère brachiale ou des artérioles digitales, est un élément prédictif des évènements CV [257]. La présentation atypique d'ischémie myocardique du patient PR en l'absence de plaque athéromateuse [78] corrobore également la possible implication d'une dysfonction endothéliale. De plus, les différences d'incidence de pathologies cardio et cérébrovasculaires suggèrent que la PR affecte différemment les territoires vasculaires [75]. Il est aussi important de considérer l'aspect réversible de la dysfonction endothéliale [258] ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle. Ainsi, la dysfonction endothéliale apparaît comme un acteur prépondérant, mais corrigible, dans la surmortalité CV du patient PR.

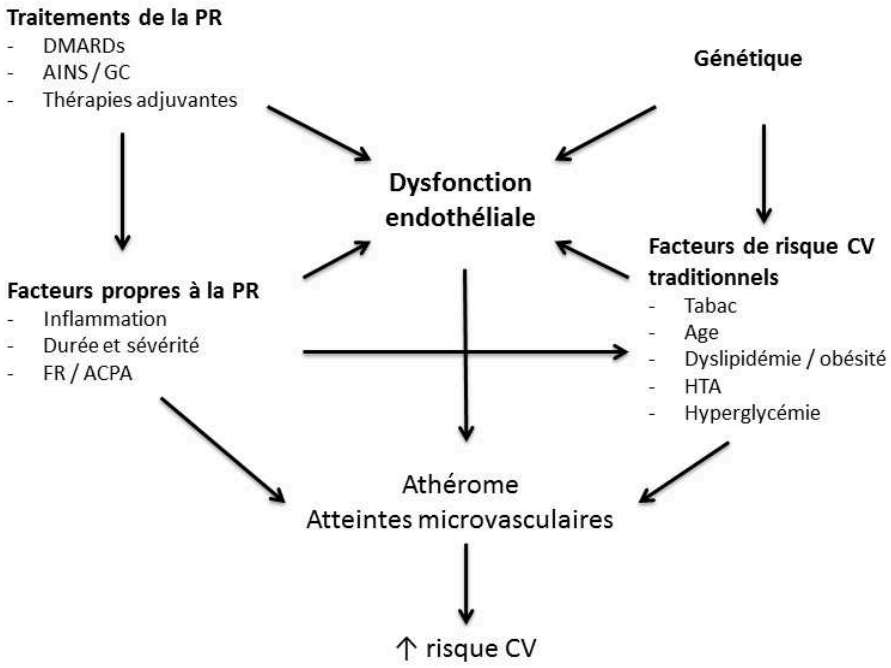


Figure 8 – Facteurs impliqués dans le sur-risque cardiovasculaire du pateint polyartrhite rhumtoïde (Romain Bordy, laboratoire EA4267, Besançon)
ACPA : anticorps anti-peptides citrulinés, AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens, CV : cardiovasculaire, DMARDs : *disease-modifying anti-rheumatic drugs*, FR : facteur rhumatoïdes, GC : glucocorticoïdes, HTA : hypertension artérielle, PR : polyarthrite rhumatoïde

3 La polyarthrite rhumatoïde et la dysfonction endothéliale

3.1 Les différents lits vasculaires [259,260]

Les vaisseaux sanguins ont pour but de transporter et répartir le sang dans l'organisme. Ceux-ci forment un réseau fermé permettant d'acheminer le sang du cœur aux tissus de l'organisme puis de le ramener au cœur. Ce réseau vasculaire se divise en plusieurs types de vaisseaux :

- les artères et artérioles acheminant le sang du cœur aux tissus ;
- les capillaires permettant les échanges de gaz et de nutriments entre le sang et les tissus ;
- les veinules et veines acheminant le sang des tissus au cœur.

La paroi des vaisseaux est constituée de trois tuniques qui sont du plus profond au plus superficiel : l'intima constituée d'une monocouche de cellules endothéliales directement au contact du sang et d'une lame basale ; la média constituée de cellules musculaires lisses, de fibres de collagène et d'élastine, assurant la motricité vasculaire ; l'adventice constituée de tissu conjonctif, jouant un rôle de soutien. L'intima et la média sont séparées par la limitante élastique interne et la média et l'adventice sont séparées par la limitante élastique externe (**Figure 9**). Toutefois, la structure et la composition de la paroi vasculaire varient selon le lit vasculaire considéré [260,261] (**Tableau III**).

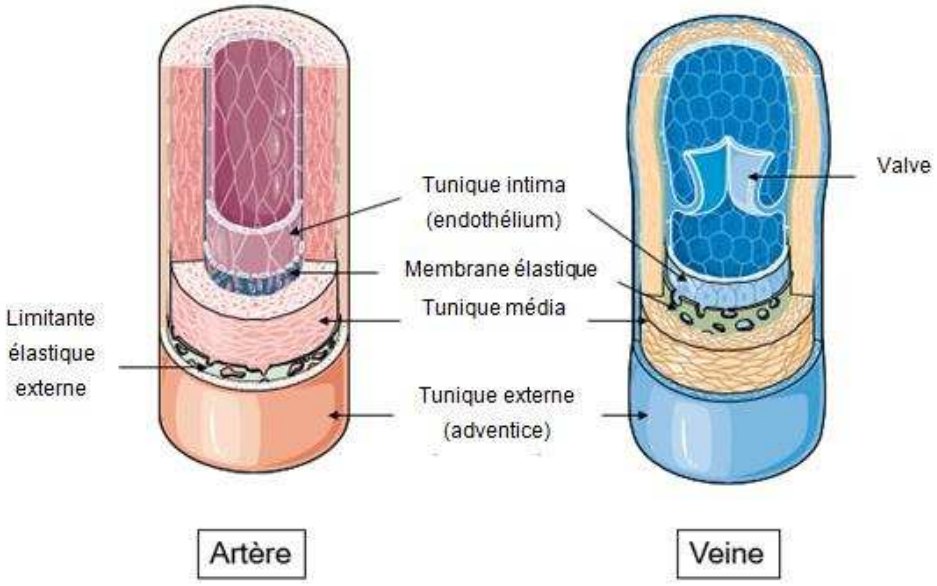


Figure 9 – Schéma des différentes tuniques d'une artère (à gauche) et d'une veine (à droite) [262]

Tableau III – Différences structurales des vaisseaux sanguins [260]

Type de vaisseaux	Diamètre (D) de la lumière et épaisseur (E) de la paroi	Composition relative	Fonction
Artère élastique	D : 1,5 cm E : 1,0 mm	Endothélium continu, élastine +++, cellules musculaires lisses +, collagène	Artères de conductance distribuant le sang du cœur aux tissus
Artère musculaire	D : 6,0 mm E : 1,0 mm	Endothélium continu, élastine +, cellules musculaires lisses +++, collagène ++	Artères distributrices
Artériole	D : 37,0 µm E : 6,0 µm	Endothélium, élastine, cellules musculaires lisses +++, collagène	Artères de résistance
Capillaire	D : 9,0 µm E : 0,5 µm	Endothélium fenestré ou discontinu	Echange de gaz et de nutriments
Veinule	D : 20,0 µm E : 1,0 µm	Paroi fine et souple, endothélium continu, valvules	Fonction de capacitance : retour veineux
Veine	D : 5,0 mm E : 0,5 mm		

Par définition, la notion de lit « macrovasculaire » regroupe les grosses et moyennes artères qui assurent un rôle de conduction du sang (aussi appelées « artères de conductance » ; aorte, artères pulmonaires, carotides, artères brachiales, artères fémorales, artères radiales). Elles sont très élastiques et sont capables de se dilater et se contracter passivement selon le volume de sang et donc de compenser les grandes fluctuations de pression.

Le terme lit « microvasculaire » regroupe tous les vaisseaux dont le diamètre est inférieur à 150 µm (aussi appelées « artères de résistance » ; petites artères, artérioles / capillaires et veinules). Le rôle des petites artères et artérioles consiste à moduler la résistance vasculaire périphérique, grâce à leur grande quantité de cellules musculaires lisses, pour optimiser l'apport en nutriments et limiter les variations de pression hydrostatique au niveau des lits capillaires [263].

3.2 L'endothélium

L'endothélium est une monocouche de cellules pavimenteuses tapissant les artères directement au contact du sang [259]. Il s'agit, d'une part, d'une barrière anatomique entre le sang et les cellules musculaires lisses de la media. D'autre part, c'est un tissu dynamique, sensible à des stimuli mécaniques (variations de flux sanguin) ou chimiques. Il a un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie en participant aux échanges de gaz et de nutriments, mais également en

régulant, par la synthèse et la libération de médiateurs, les phénomènes de vasomotricité, d'hémostase, d'agrégation plaquettaire, d'activation endothéliale et de prolifération cellulaire [264]. C'est ce que l'on appelle la fonction endothéliale (FE).

3.2.1 Fonction endothéliale : médiateurs et mécanismes

L'endothélium est capable de synthétiser et libérer différents médiateurs en réponse à différents stimuli [259,265,266]. Il est capable de sécréter des substances vasodilatatrices dérivées de l'endothélium (*endothelium-derived relaxing factors*, EDRF) comme le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline ou prostaglandine I_2 (PGI_2), les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (*endothelium-derived hyperpolarizing factors*, EDHF). Ces substances ont des propriétés vasorelaxantes par action sur les cellules musculaires lisses, inhibent l'agrégation plaquettaire et l'adhésion leucocytaire à la paroi vasculaire. Ces effets sont contrebalancés par des substances endothéliales vasoconstrictrices (*endothelium-derived constricting factors*, EDCF) comme l'endothéline 1 (ET-1), l'angiotensine II (Ang II), le thromboxane A_2 (TXA_2) et les ROS.

Le NO est un gaz radicalaire de demi-vie très courte (environ 4 secondes) mais traversant extrêmement bien les membranes, lui permettant d'exercer son action sur ses cibles [267,268]. Le NO est synthétisé par les NO synthases (NOS, EC 1.14.13.39), enzymes dotées d'un domaine réductase et d'un domaine oxygénase, qui consomment du β-nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) et du dioxygène pour réduire la L-arginine en L-citrulline et NO. Pour fonctionner, les NOS doivent être sous forme homodimériques et ont besoin d'un ensemble de co-facteurs : la tétrahydrobioptérine (BH_4), la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide et un hème. En cas de déficit en L-arginine ou en BH_4, la NOS est découplée conduisant à une réduction de l'oxygène ce qui induit la production de ROS avec notamment l'anion superoxyde ($O_2^{-\bullet}$) [265,266,269].

Il existe trois formes de NOS différenciées par leur mode d'expression :

- l'isoforme 1 (NOS-1 ou NOS neuronale ou nNOS) est présente de façon constitutive au niveau des neurones centraux et périphériques, des cellules épithéliales, des cellules photoréceptrices de l'œil, des îlots de Langerhans et des cellules de la muqueuse gastrique ;

- l'isoforme 2 (NOS-2 ou NOS inductible ou iNOS) peut être induite au niveau des cellules immunitaires, des hépatocytes, des cellules musculaires lisses vasculaires, des cellules macro- et microgliales, après exposition à des endotoxines bactériennes ou des cytokines pro-inflammatoires (INFγ, IL-1 ou TNFα). Cette isoforme est capable de produire de grandes quantités de NO. Elle est également exprimée de façon constitutive au niveau de l'épithélium pulmonaire et des plaquettes ;
- l'isoforme 3 (NOS-3 ou NOS endothéliale ou eNOS) est présente de façon constitutive au niveau des cellules endothéliales, des plaquettes, des cardiomyocytes et des cellules épithéliales.

La production de NO est régulée par des mécanismes transcriptionnels mais également par la disponibilité en L-arginine, en BH_4 et en calcium (uniquement pour les NOS-1 et 3) [267]. Cette production est provoquée par des stimuli chimiques (acétylcholine (Ach), bradykinine (BK), adénosine diphosphate (ADP), substance P), mais aussi mécaniques (forces de cisaillement ou *shear stress*) au niveau vasculaire favorisant la transcription, la traduction et la phosphorylation Akt-dépendante des NOS, augmentant leur activité et donc la sécrétion de NO [52,266]. Une fois synthétisé, une partie du NO va diffuser au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, ce qui va activer la guanylate cyclase conduisant à la conversion de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc), provoquant une relaxation musculaire et donc une vasodilatation [266–268]. Le NO permet également de prévenir les vasospasmes et inhibe l'agrégation plaquettaire, l'expression des molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales et la pénétration des macrophages ce qui réduit le risque athéromateux [266].

La PGI_2 est synthétisée à partir de l'acide arachidonique par la COX-1 puis par la PGI_2 synthase [270,271]. Elle possède une activité antiagrégante plaquettaire et vasorelaxante en activant l'adénylate cyclase par activation d'un récepteur couplé à la protéine G sur la cellule musculaire lisse vasculaire. Physiologiquement, ce n'est pas une voie majeure de relaxation vasculaire.

Les EDHF regroupent un ensemble de facteurs responsables d'une hyperpolarisation des myocytes vasculaires, indépendante du NO ou de la prostacycline [266,272]. C'est en 1987 que ce terme a été introduit lorsqu'il a été mis en évidence une relaxation vasculaire alors que les voies du NO et de la PGI_2 étaient inhibées. La nature exacte de ces facteurs est encore mal connue, toutefois le

peroxyde d'hydrogène semble jouer un rôle prédominant [266]. Il pourrait également y avoir implication des ions potassium, de dérivés des cytochromes P450, de l'adénosine monophosphate, des dérivés des lipooxygénases, du peptide natriurétique, ... [272]. Le mécanisme d'action de ces facteurs repose sur l'activation des canaux potassiques calcium-dépendants de faible (SK_{Ca}), intermédiaire (IK_{Ca}) et grande (BK_{Ca}) conductance qui permettent une sortie du potassium de la cellule musculaire lisse vasculaire et donc une hyperpolarisation de celle-ci conduisant à une relaxation. De façon très intéressante, il existe une compensation du déficit en NO par génération de H_2O_2 à partir des $O_2^{-\circ}$ produits par l'eNOS découplée [266]. Cette compensation par les EDHF *via* l'eNOS découplée est temporaire mais suffisante pour éviter une diminution de la vasorelaxation.

3.2.2 Différences entre lits vasculaires [266,273,274]

Malgré ces rôles communs, l'endothélium présente des hétérogénéités morphologiques, de compositions biochimiques ou phénotypiques selon les territoires vasculaires mais également au sein des différentes sections d'un même lit vasculaire. Ces hétérogénéités vont conditionner les différentes fonctions des différents lits vasculaires. Tout d'abord, il est noté des variations anatomiques en terme de taille, forme, orientation des cellules endothéliales, mais aussi au niveau du système des jonctions serrées (qui est moins développé dans la microvasculature que dans la macrovasculature, ce qui va influer la perméabilité vasculaire). L'endothélium peut être continu (artères de conductances, veines, capillaires du cerveau, cœur, peau et poumon), fenestré (capillaires au niveau des glandes endocrines et exocrines, muqueuses gastriques et intestinales, plexus choroïde, tubules rénaux) ou discontinu (notamment au niveau du foie). Il est également noté des différences phénotypiques au niveau de l'expression protéique, l'hémostase et la coagulation, la participation à la réponse inflammatoire, la prolifération cellulaire, l'adhérence et la migration leucocytaire, la perméabilité [261,264]. De plus, il existe des variations au niveau de la prédominance des mécanismes de relaxation endothéliale suivant la taille du vaisseau : le NO sera majoritairement impliqué au niveau des artères de conductance et les EDHF au niveau des artères de résistance (**Figure 10**) [261,266]. L'hétérogénéité observée permet à l'endothélium de se conformer aux divers besoins des tissus au sein de la totalité de l'organisme et permettent de s'adapter aux différents microenvironnements.

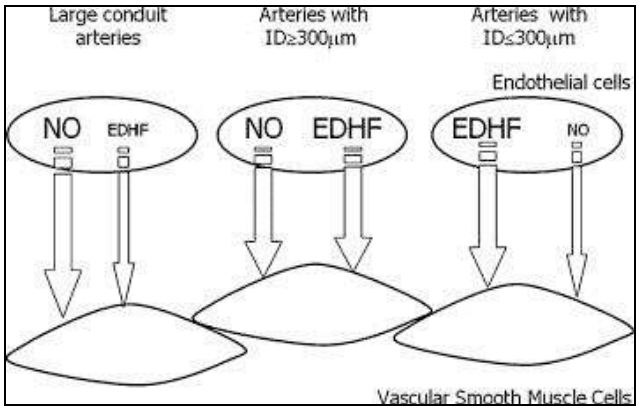


Figure 10 - Schéma représentatif de la proportion NO/EDHF selon les lits vasculaires [275]

3.2.2.1 Les particularités de la circulation coronarienne [276]

Comme précédemment décrit, le patient PR présente une hausse de mortalité CV principalement secondaire à une ischémie myocardique. Les mécanismes inflammatoires peuvent affecter les mécanismes régulateurs de la fonction vasculaire coronaire et du débit sanguin myocardique, contribuant au développement d'athérome et de l'ischémie myocardique et des évènements CV [78]. Cette partie a pour but de détailler la circulation coronarienne, territoire cliniquement pertinent et majoritairement impliqué dans le sur-risque CV, et les mécanismes qui la régulent.

Le réseau vasculaire myocardique est classiquement divisé en artères de conductance et en microvaisseaux intramyocardiques (**Figure 11**). Ce sont ces derniers qui participent à la majorité des résistances vasculaires coronaires et sont impliqués dans la régulation du débit sanguin. Il est courant de diviser le réseau vasculaire coronaire en trois types de vaisseaux :

- les larges artères de conductance épicardiques (> 400 µm) qui servent à acheminer le sang et qui participent faiblement aux résistances vasculaires coronaires. Leur vasomotricité est essentiellement régie par le *shear stress* et les régulations neuro-hormonales ;
- les petites artères (de 100 à 400 µm) qui sont le siège d'un tonus vasomoteur contribuant aux résistances vasculaires coronaires. Certains de ces vaisseaux de taille intermédiaire portent le nom *d'artères pénétrantes* qui traversent le myocarde pour faire communiquer les artères épicardiques et le réseau sous-endocardique. Leur diamètre est régi par le *shear stress*, les régulations neuro-hormonales et le tonus myogénique ;
- les artérioles (< 100 µm) où réside la majeure partie des résistances vasculaires coronaires et qui sont sensibles au tonus myogénique et aux besoins métaboliques du myocarde.

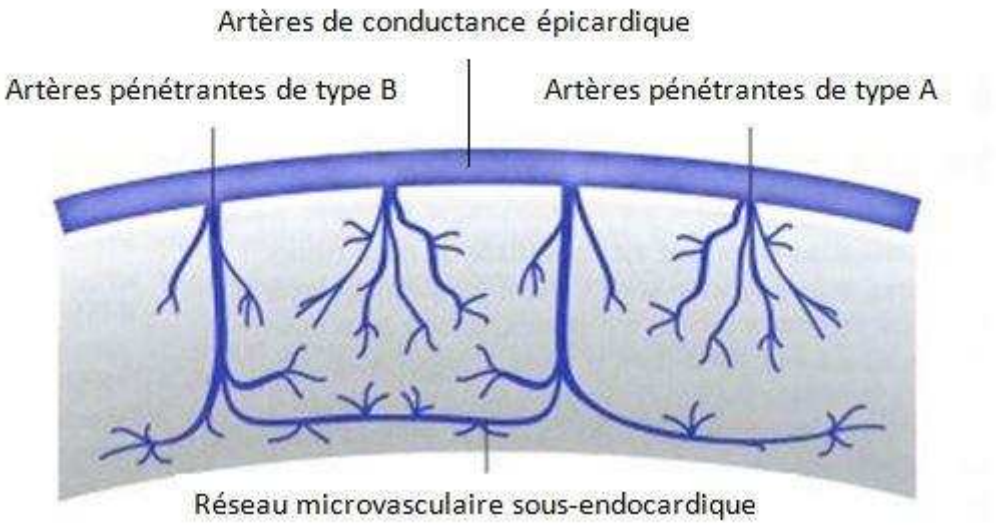


Figure 11 – Représentation schématique de l'anatomie du lit vasculaire coronaire artériel intramyocardique (selon Ouattara *et al.* [276]). Les artères de conductance permettent d'acheminer le sang depuis l'aorte. Les artères pénétrantes de type A vascularisent les deux tiers externes de la paroi myocardique tandis que les artères de type B sont nourricières pour le réseau microvasculaire sous-endocardique et participent à la vascularisation du tiers interne de la paroi.

Compte tenu du caractère contractile du cœur, le débit coronaire est soumis à d'importantes variations en raison de la révolution cardiaque, notamment au niveau du ventricule gauche. C'est pourquoi, des mécanismes adaptatifs permettent de compenser les contraintes mécaniques extravasculaires et maintenir un débit sanguin coronarien moyen.

1) <u>Régulation humorale</u>

Le NO est le médiateur principal de la relaxation des artères coronaires de toute taille. Sa synthèse est induite par l'Ach (libéré par le système nerveux parasympathique), la BK, l'histamine mais aussi le *shear stress*. Les voies des EDHF et de la prostacycline, activées par l'Ach, la BK ou même les forces de cisaillement, sont aussi impliquées dans la relaxation coronarienne quand la voie du NO est altérée [276,277]. L'action des EDHF est plus importante dans les artérioles que dans les artères de gros calibre et passe par l'activation des BK_{Ca} [276,278]. De plus, des canaux potassiques ATP-dépendants sont impliqués dans un tonus vasodilateur au repos et au cours de l'exercice physique [279].

L'adénosine a un rôle dans la vasodilatation des artérioles de calibre inférieur à 150 µm. Lors de l'augmentation du travail cardiaque ou en cas d'ischémie, la consommation en ATP augmente et

dépasse les capacités de régénération, ce qui conduit à la production d'AMP puis d'adénosine qui, une fois sortie du cardiomyocyte, induit une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaire par les canaux potassiques ATP-dépendants, *via* les récepteurs à l'adénosine, conduisant à une vasodilatation et donc une augmentation de la perfusion pour répondre aux besoins du myocarde en oxygène.

La sérotonine libérée par les plaquettes présente un double effet intéressant : elle est capable de vasocontracter les artères de plus de 100 µm de diamètre et de vasodilater les artérioles coronariennes.

Il a été montré que l'inhibition de l'un des médiateurs présentés ci-dessus ne modifie que modérément le processus de vasodilatation, suggérant qu'aucun de ces médiateurs à lui seul n'est indispensable et que des interactions existent entre eux pour agir efficacement au niveau vasculaire.

2) Régulation métabolique

L'hypoxémie est considérée comme le stimulus le plus puissant de la vasodilatation coronarienne. Toutefois il est n'est pas encore clairement établi si cette chute en oxygène a un impact direct ou un indirect, par le biais de métabolites comme l'adénosine, le NO ou les prostaglandines. Parallèlement à cela, l'augmentation de la concentration en dioxyde de carbone, et donc la diminution du pH de façon locale, active la vasodilatation et sensibilise les vaisseaux aux effets de l'adénosine.

3) Régulation nerveuse

Le tonus vasculaire coronaire est modulé par le système nerveux autonome sympathique, par un effet direct des neurotransmetteurs adrénergiques (adrénaline et noradrénaline) au niveau des récepteurs α et β [276]. Bien que présentant des récepteurs muscariniques, les artères coronaires ne sont pas innervées par le système nerveux autonome parasympathique.

4) Régulation mécanique / autorégulation

Il apparaît que le *shear stress* est l'un des stimuli les plus importants de la libération des facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium via des intégrines et mécanocepteurs.

Il est également impliqué une régulation myogénique, indépendante de la demande métabolique du myocarde, maintenant le débit sanguin coronaire constant dans un intervalle de pression de perfusion coronaire allant de 60 à 140 mmHg. Cette régulation semble médiée par les canaux potassiques ATP-dépendants, et semble indépendante de la voie du NO.

3.2.2.2 Les particularités de la circulation cérébrale [280–282]

Comme précédemment mentionné, la PR est un facteur de risque indépendant d'atteinte cérébrovasculaire. Cette partie a pour but de décrire la circulation cérébrale et ses mécanismes de régulation.

Le cerveau est l'un des organes les plus irrigués de l'organisme. Le sang y est acheminé par deux paires d'artères de conductance : les artères carotides et les artères vertébrales. Ces dernières vont se rejoindre pour former les artères basilaires qui irrigueront majoritairement le cervelet et le tronc cérébral, tandis que les carotides irrigueront l'encéphale. A la base du cerveau, les artères basilaires et carotides se rejoignent pour former un anneau anastomotique, le polygone de Willis. Ce polygone, qui permet d'équilibrer la pression entre les deux hémisphères cérébraux et qui représente un contournement en cas d'occlusion artérielle, donne naissance à trois paires d'artères : les artères cérébrales antérieures, moyennes et postérieures (**Figure 12**). Ces artères se diviseront ensuite progressivement en petites artères à la surface du cerveau, les artères piales, avant de devenir des artérioles pénétrantes qui vont entrer dans le tissu afin d'apporter les éléments nutritifs à l'encéphale.

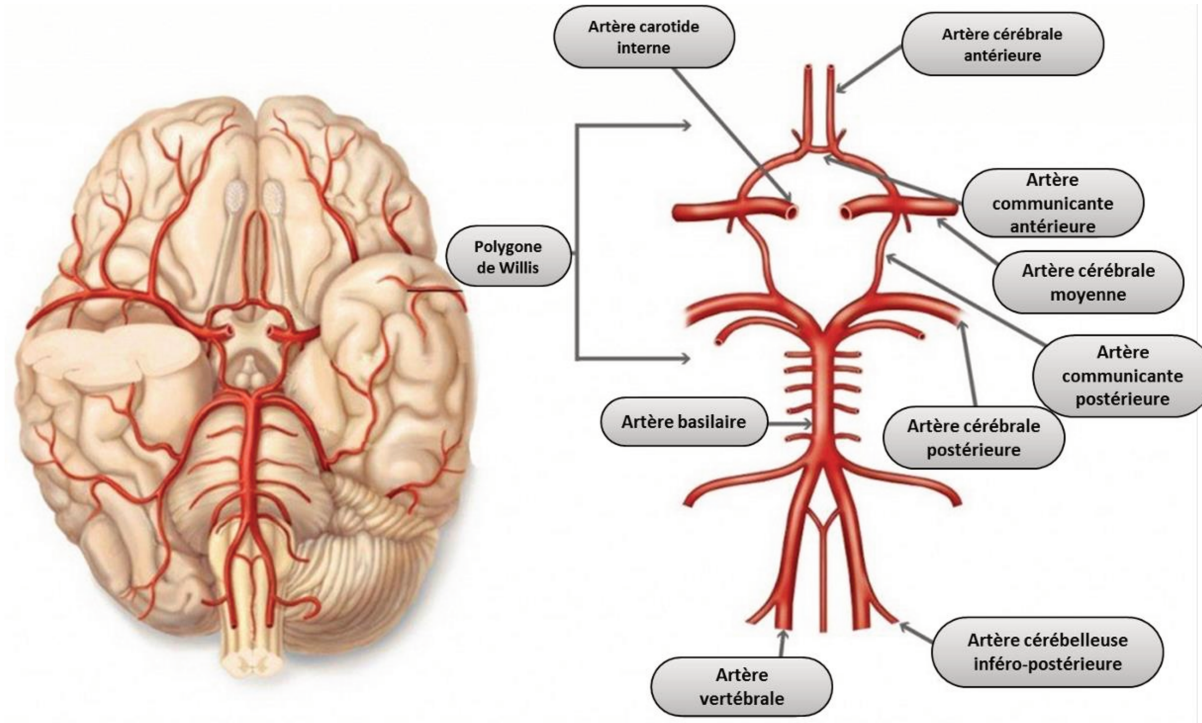


Figure 12 – Schéma de la circulation cérébrale à la base du cerveau, vue du dessous (à gauche), isolé et axé sur le polygone de Willis (à droite) [283]

Bien que présentant quasiment la même structure artérielle que dans le reste de l'organisme (intima, média très riche en cellules musculaires lisses, adventice et limitante élastique interne) [284], la circulation cérébrovasculaire présente la particularité de posséder des artères de gros calibre (artères cérébrales antérieures, moyennes et postérieures (2-3 mm de diamètre) pour les plus importantes), qui se comportent comme des artères de résistance en développant une réponse myogénique importante. Ce rôle inhabituel pour ce type de vaisseau permet de maintenir un débit sanguin cérébral (DSC) extrêmement stable et de protéger des fluctuations de pression artérielle les artérioles et les capillaires. Afin de garantir le bon fonctionnement du système nerveux central, l'endothélium cérébrovasculaire composant la BHE doit être hautement spécialisé et extrêmement sélectif pour assurer la régulation des phénomènes de perméabilité grâce à de nombreuses jonctions serrées, en plus de la régulation des phénomènes de vasomotricité, hémostase, agrégation plaquettaire, activation endothéliale et prolifération cellulaire. Plusieurs mécanismes régissent la régulation du DSC.

1) Régulation humorale

Les NOS ont une part prédominante dans la relaxation de toutes les artères cérébrales [285,286]. La production basale de NO permet d'inhiber le tonus de repos développé par tous les calibres d'artères cérébrales et piales. L'action des EDHF est médiée par l'activation des BK_{Ca} [287,288]. La voie des COX est également présente dans la régulation de la fonction endothéliale cérébrale, mais de façon minoritaire [286].

2) Régulation métabolique

En raison des besoins métaboliques en oxygène élevés du cerveau, l'hypoxie représente un puissant stimulus vasodilatateur : en cas de P_{O2} inférieure à 50 mmHg, le DSC peut augmenter de 400 % par rapport au niveau basal. Ces effets aigus sont médiés par des canaux potassiques ATP-dépendants ; en cas d'hypoxie chronique, l'augmentation du DSC est médiée par une augmentation de la densité capillaire. De la même manière, l'hypercapnie induit une vasodilatation : l'augmentation de la P_{CO2} conduit à une diminution du pH, qui se traduit par une libération plus importante d'ions H^+ qui vont induire une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires au niveau cérébral.

De façon intéressante, il existe un couplage métabolisme / flux vasculaire cérébral : en réaction d'une activité neuronale et donc une modification métabolique, la nNOS va s'activer conduisant à une vasodilatation locale [285].

3) Régulation nerveuse

De plus, une innervation sympathique et parasympathique, associée à une production locale de neurotransmetteurs (noradrénaline, acétylcholine, sérotonine) est capable d'activer les différentes voies de vasoconstriction ou vasodilatation au niveau de la circulation sanguine cérébrale.

Le baroreflèxe a un rôle protecteur en cas d'augmentation du DSC : en cas d'augmentation de la pression artérielle, l'activation du système nerveux parasympathique et l'inhibition du système nerveux sympathique par l'activation des barorécepteurs permet de rétablir la pression artérielle en induisant une vasodilatation, retrouvée au niveau de la vasculature cérébrale.

4) Régulation mécanique / autorégulation

Il semble également exister une communication au sein des cellules endothéliales par le biais de connexines qui permet de coordonner les vaisseaux proximaux avec la microcirculation cérébrale afin d'assurer une microperfusion adéquate [286]. A l'instar de la circulation coronaire, il existe une autorégulation myogénique du DSC : pour des pressions de perfusion comprises entre 50 et 150 mmHg, le flux sanguin est relativement constant (environ 50 mL de sang par 100 g de tissu cérébral par minute). Cette autorégulation semble régulée par des mécanocepteurs [281,282,286]. Hors de cet intervalle, l'autorégulation est perdue et le DSC est dépendant de la pression sanguine de façon linéaire. Il est aussi retrouvé une vasoconstriction lors de l'augmentation de la pression intra-artérielle, en raison d'une compression des artères cérébrales, dans l'hypertension intracrânienne [289].

3.3 La dysfonction endothéliale dans la polyarthrite rhumatoïde

Si l'atteinte CV dans la PR est connue depuis les années 1950, ce n'est qu'en 2002 qu'une dysfonction endothéliale (DE) a été mise en évidence par Bergholm *et al.* [290] chez le patient PR. Les données actuelles de la littérature suggèrent que la présence d'une DE constitue la condition *sine qua non* du développement de l'athérosclérose et des complications CV, ce qui en fait une cible thérapeutique de choix pour réduire le risque de mortalité CV du patient [146,291–293]. Le terme « dysfonction endothéliale » définit toute anomalie fonctionnelle réversible des cellules endothéliales qui acquièrent un phénotype moins propice à la vasodilatation, mais également pro-thrombotique, pro-coagulant, pro-inflammatoire et pro-prolifératif [258]. Depuis 2002, de nombreuses études ont confirmé la présence de la DE dans la PR, aussi bien au niveau des artères de conductance (lit macrovasculaire), site préférentiel de l'athérosclérose [294,295], qu'au niveau des artères de résistance (lit microvasculaire), qui contrôlent la perfusion des organes [176,188,296–298].

3.3.1 Dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance

La DE au niveau des artères de conductance apparait comme un marqueur préclinique des atteintes athéromateuses et des atteintes CV justifiant son exploration et son suivi chez le patient PR [299]. Toutefois, cette DE soulève encore des interrogations sur les plans physiopathologique et pharmacologique.

3.3.1.1 Méthodes d'exploration de la fonction endothéliale au niveau des artères de conductance

1) Chez l'Homme [259,300]

a) Vasodilatation dépendante du flux ou Flow-mediated dilation (FMD)

En raison de son caractère non invasif, cette technique est la plus couramment utilisée à l'heure actuelle pour évaluer la FE. La FMD mesure par échographie-Doppler la capacité de l'artère brachiale à répondre à la libération de NO par l'endothélium lors d'une hyperémie réactionnelle faisant suite à une occlusion de l'artère humérale pendant cinq minutes. Elle s'exprime en pourcentage de variation du diamètre maximal post-occlusif par rapport à la valeur pré-ischémique. Bien que cette technique soit peu coûteuse, non-invasive et relativement facile à utiliser, la FMD est une technique délicate et demande une standardisation et une grande expérience du manipulateur pour être reproductible. Il est également possible d'explorer la vasodilatation endothélium-indépendante par administration sublinguale de nitroglycérine, un donneur de NO.

b) Réactivité des artères coronaires épicardiques

Cette technique consiste à évaluer le changement de diamètre des artères coronaires épicardiques en réponse à l'acétylcholine, un agent vasodilatateur endothélium-dépendant, par coronarographie quantitative couplée à l'écho-Doppler intravasculaire. Cette méthode est coûteuse, invasive et ne peut être utilisée de façon répétée ce qui en limite l'utilisation. Pourtant elle présente l'avantage d'explorer directement la FE au sein de ce territoire vasculaire cliniquement important.

2) Chez l'animal : technique de vaisseaux isolés en condition isométrique [301]

La technique d'anneaux vasculaires isolés constitue la méthode standard d'exploration de la FE chez l'animal (comme le rat ou la souris). Elle consiste à quantifier la variation de tension de façon isométrique, c'est-à-dire sans variation de diamètre luminal, en réponse à des agents pharmacologiques vasoactifs (constricteurs ou dilatateurs) de segments d'artères de conductance

(aorte le plus souvent, mais aussi carotide ou pulmonaire) ou de veines montés entre deux crochets d'acier inoxydable reliés à un capteur de tension dans une chambre à organe isolé remplie de liquide physiologique (**Figure 13**). Pour éviter d'endommager l'endothélium lors de l'insertion des crochets, la taille de ceux-ci est à adapter selon le type de vaisseau ou la taille de l'animal.

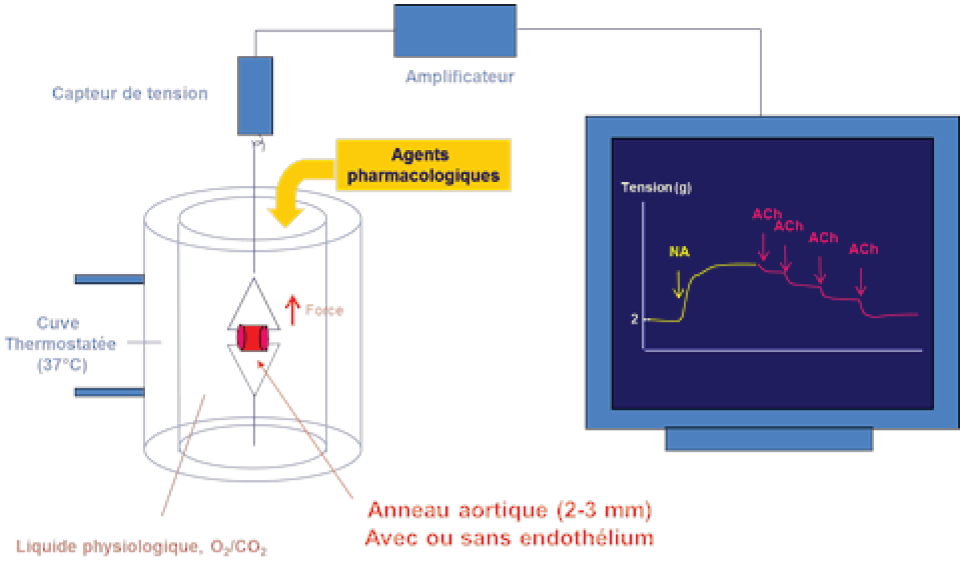


Figure 13 – Schéma du montage technique de la réactivité vasculaire sur anneau aortique isolé. La tension développée par l'anneau vasculaire est enregistrée par un capteur de tension. On étudie ici la relaxation d'une dose croissante et cumulative d'acétylcholine (Ach), après une précontraction à la noradrénaline (NA). (Figure réalisée par Céline Demougeot, EA4267, Besançon).

Au début de l'expérimentation, une phase de normalisation est nécessaire, d'abord pour autoriser la comparaison des valeurs entre différents segments, ensuite pour stimuler les fibres musculaires afin de mieux répondre aux stimuli pharmacologiques. En effet, il démontré que les réponses constrictrices et dilatatrices des vaisseaux sont plus fortes, plus stables et plus reproductibles sur un segment normalisé par rapport à un segment non étiré. La durée et l'intensité de l'étirement sont dépendantes du protocole et du vaisseau étudié. Par exemple pour les anneaux d'aorte de rat, il est couramment pratiqué une normalisation de 60 minutes avec application d'une force passive de 2g, avec une augmentation par paliers de 0,5 g toutes les 15 minutes.

Après cette normalisation, la viabilité des vaisseaux est vérifiée par des agonistes de la cellule musculaire lisse à concentration élevée (noradrénaline, phényléphrine, sérotonine, …) ou par solution riche en potassium (KCl : 100 à 120 mM). En raison du risque de lésion de l'endothélium lors de la manipulation du vaisseau ou du passage du crochet, il est nécessaire de tester l'intégrité de l'endothélium. Pour ce faire il est nécessaire de contracter le segment à l'aide d'un agent

vasoconstricteur pour étudier la relaxation maximale à un agent vasodilatateur endothélium-dépendant (l'Ach est le plus souvent utilisée). Le seuil d'acceptabilité est dépendant du vaisseau considéré (généralement il est de 80 % pour les segments d'aorte). Sur un segment viable et intègre, il est alors possible d'étudier la FE endothéliale, en mesurant la réponse vasodilatatrice d'un segment précontracté à des concentrations cumulatives d'un agent relaxant endothélium-dépendant.

Cette technique présente plusieurs avantages : elle est reproductible et facile à mettre en œuvre ; plusieurs chambres à organes sont présentes sur le système permettant l'étude de la FE et des mécanismes associés sur le même animal ; il est possible d'étudier en parallèle deux groupes différents ; le retrait de l'endothélium se fait facilement pour étudier la réactivité endothélium-indépendante. Toutefois, la principale limite de cette technique réside dans la tension appliquée sur le segment : la tension basale peut influencer la réactivité. Ainsi, entre deux groupes d'animaux (un contrôle et un arthritique par exemple), les réponses aux agents constricteurs pourront être différentes, nécessitant un ajustement des concentrations en agents pour obtenir des réponses identiques entre les groupes.

3.3.1.2 Données cliniques : dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance

1) <u>Etat des lieux</u>

Décrite au début des années 2000 chez le patient PR [302,303], la présence de la DE macrovasculaire chez le patient est depuis confirmée par de nombreuses études et revues comparant patients et sujets sains (**Tableau IV**) [294,299,304]. Deux récentes méta-analyses reprenant respectivement 20 études (représentant 852 patients *vs.* 836 sujets contrôles) [305] et 10 études (représentant 500 patients *vs.* 401 sujets contrôles) [306] confirment une altération de la FMD, donc la présence d'une DE macrovasculaire dans la PR.

Tableau IV- Dysfonction endothéliale (DE) au niveau des artères de conductance évaluée par *flow-mediated dilation* chez des patients polyarthrite rhumatoïde (PR) comparés à la population générale

Référence	Nombre de patients PR	Moyenne âge patients	Durée PR	Sévérité PR DAS28 (activité)	Présence DE (*vs.* contrôles)	Effet des traitements sur la FMD
Adawi et al. 2018[307]	44	54,42 ans	-	4,5 (modérée)	**Oui**	-
Arosio et al. 2007[176]	65 femmes	47 ans	6 ans	3,7 (modérée)	**Oui**	-
Bosello et al. 2008[308]	10	53,1 ans	12,8 ans	6,66 (forte)	**Oui**	Anti-TNFα (14 sem) Amélioration
Cypiene et al. 2010[309]	63	41,48 ans	-	-	**Non**	-
Fan et al. 2012[310]	102	45,4 ans	11,3 ans	2,5 (rémission)	**Oui**	-
Foster et al. 2010[311]	66	58,5 ans	10,7 ans	-	**Non**	DMARDs (4 sem) Sans effet
Foster et al. 2012[312]	18	58 ans	1 mois	-	**Non**	-
Hannawi et al. 2009[313]	31	54 ans	6 mois	4,3 (modérée)	**Oui**	DMARDs (52 sem) Amélioration
Holmes et al. 2010[314]	59	-	-	-	**Non**	-
Hürlimann et al. 2002[302]	11	46,5 ans	9 ans	-	**-**	Anti-TNFα (12 sem) Amélioration
Irace et al. 2004[315]	10	44,6 ans	7 ans	3,4 (modérée)	**Oui**	Anti-TNFα (6 sem) Amélioration
Kerekes et al. 2008[316]	52	-	10,5 ans	-	**Oui**	-
Protogerou et al. 2011[317]	60 femmes	-	-	-	**-**	Anti-R-IL6 (6 mois) Amélioration
Sarli et al. 2014[318]	50	43 ans	-	3,9 (modérée)	**Oui**	-
Södergen et al. 2010[319]	79	46,4 ans	12 et 18 mois	3,62 (modérée)	**Non**	-
Spinelli et al. 2014[320]	17	50,4 ans	8,58 ans	5,2 (forte)	**Oui**	Anti-TNFα (3 mois) Sans effet
Stamatelopoulos et al. 2009[321]	84	64,2 ans	7,89 ans	-	**Oui**	-
Temiz et al. 2015[322]	90	54 ans	6,41 ans	4,34 (modérée)	**Oui**	-
Van Doornum et al. 2003[323]	25	46,4 ans	13,7 ans	4,6 (modérée)	**Non**	-
Vaudo et al. 2004[303]	32	50 ans	11 ans	< 3.2 (faible)	**Oui**	-
Verma et al. 2017[324]	35	46 ans	8,5 ans	4,10 (modérée)	**Oui**	-
Veselinovic et al. 2012[325]	52	52,5 ans	5,7 ans	3,7 (modérée)	**Oui**	-

Le moment de survenue de la DE chez le patient PR fait encore l'objet de controverses, bien qu'elle semble apparaître précocement. En effet, bien que certaines études ne retrouvent pas d'anomalie de la réactivité vasculaire à 1 [312], 12 ou 18 mois [319] après le diagnostic de PR, d'autres

montrent la présence d'une DE moins d'1 an (5 ± 3 mois) après le diagnostic [295]. Il est toutefois intéressant de noter que l'équipe de Foster *et al.* [312] montre une augmentation des cellules endothéliales circulantes, signant une activation endothéliale en l'absence de dysfonction endothéliale évaluée par FMD. Dans des PR évoluant depuis plusieurs années, plusieurs études et revues ont montré la présence d'une DE. En effet, la méta-analyse (852 patients PR issus de 20 études) de Di Minno *et al.* comprenant des PR de plus de 5 ans d'évolution confirme la présence d'une DE [305]. González-Juanatey *et al.* [291] confirme ces résultats en rapportant une FMD altérée chez des patients dont la PR évolue depuis plus de 14 ans, alors que ceux ayant une PR de moins de 7 ans ne montrent pas d'anomalie de la FMD. Toutefois, ces résultats sont controversés car quelques équipes ne retrouvent pas de différences de FMD entre patients PR et population générale 10 [311] ou 13 ans [323] après le diagnostic de PR.

Cette DE et son évolution ne montrent pas de corrélation claire avec l'activité de la pathologie ; en effet, certaines études montrent une association entre FMD et CRP ou DAS28 [303,326] alors que d'autres non [318,319,327,328]. De plus, la sévérité de la pathologie ne permet pas de prédire la survenue d'une DE macrovasculaire : une étude menée chez des patients avec une PR de faible activité montre la présence d'une anomalie de FMD [303] alors qu'une autre étude montrant une PR avec une activité modérée ne retrouve pas cette anomalie [323]. Toutefois, la méta-analyse de Di Minno *et al.* montre que plus l'activité de la pathologie, exprimée par les taux de CRP et de VS, est importante, plus la FMD est basse [305].

Ainsi, bien que controversé, la majorité des études suggère que la DE apparaisse précocement, dans l'année qui suit le diagnostic de PR, et perdure voire s'aggrave avec la durée et/ou la sévérité de la maladie.

2) Mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance

L'origine de la DE macrovasculaire chez le patient PR est encore mal cernée. Mais il semblerait qu'elle soit le résultat d'un effet complexe entre facteurs de risque CV traditionnels, des prédispositions génétiques, une inflammation chronique, un stress pro-oxydatif, un statut thrombotique et des anomalies métaboliques [329].

a) Facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels

Les facteurs de risque CV traditionnels montrent des corrélations avec la DE macrovasculaire, témoignant de leurs impacts néfastes sur la FE [184,330,331]. Toutefois, ces résultats ne sont pas retrouvés par d'autres équipes qui montrent des signes d'athérosclérose ou d'anomalie vasculaire indépendamment des facteurs de risque CV (âge, dyslipidémie, …) [295,318,332,333]. Bien qu'ils ne soient pas directement incriminés, les facteurs de risque CV traditionnels semblent avoir un impact sur la DE macrovasculaire chez le patient PR.

b) Génétique

Certaines études montrent un lien entre FMD et certains facteurs génétiques comme l'épitope HLA-DRB1 [334], le gène du TNFα [335], le polymorphisme de l'IL-6 [336] ou de la 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase [337]. Très récemment, il a été mis en évidence que la sous-expression de l'allèle -786T>C situé sur le promoteur de l'eNOS est associé à un risque augmenté de DE dans la PR [338].

c) Composant auto-immun

Le rôle du composant auto-immun est également suspecté comme impliqué dans la DE puisqu'il est connu que le FR est impliqué dans la vascularite : son dépôt dans la paroi vasculaire conduit à la formation de complexes immuns de taille intermédiaire, activant le complément et induisant une inflammation vasculaire [13]. En accord avec ces données, il a été montré des corrélations positives entre FMD et FR [295,339,340]. Mais il n'est pas établi que ces facteurs soient la cause directe de l'atteinte vasculaire, car ils pourraient seulement refléter une pathologie plus inflammatoire. Toutefois, une étude *in vitro* a montré que le FR isolé de sérum humain est capable d'activer des PN neutrophiles ce qui augmente leur adhérence aux cellules endothéliales provoquant un processus délétère pour la cellule endothéliale (augmentation de l'expression de molécules d'adhérence, production de ROS) [341].

d) Inflammation

La PR est une pathologie inflammatoire systémique qualifiée de haut grade [330] faisant intervenir des protéines inflammatoires (taux élevés de CRP, TNFα, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-33 chez le patient PR) [342] jouant un rôle clé dans la physiopathologie de la PR mais aussi dans ses conséquences sur la DE. Parmi ces cytokines, le TNFα, l'IL-1 et l'IL-6 sont également synthétisées par les cellules endothéliales [343]. Le TNFα, l'IL-1β, l'IL-33 et la CRP sont capables de stimuler l'endothélium conduisant à une augmentation de sa perméabilité et à l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1, E-selectine, P-selectine, facteur von Willebrand) favorisant son activation et la perturbation des NOS, des COX et des NOX conduisant respectivement à une diminution de la biodisponibilité en NO, en PGI2 et à une augmentation de la production de ROS, ce qui conduit à la DE [146,156,305,344–347]. Il est important de noter qu'une augmentation de la production des ROS favorise le découplage de l'eNOS, la diminution de la biodisponibilité en NO, la dégradation de la relaxation médiée par les EDHF et l'augmentation de l'activité COX en faveur des EDCF, favorisant la DE [266]. Bien que ces protéines inflammatoires précitées ont des effets sur la FE, la majorité des études ne trouve pas de corrélation entre la fonction endothéliale des patients et le taux de CRP ou la VS [311,322], bien que certaines montrent une corrélation négative entre CRP et FMD [308]. Toutefois, l'exploration ponctuelle n'est pas pertinente car l'inflammation dans la PR évolue par poussée, justifiant l'étude de l'inflammation cumulée, c'est-à-dire l'évaluation des taux circulants de CRP lors de mesures répétées sur une longue période. Ainsi, l'équipe de Vaudo *et al.* [303] a mis en évidence une corrélation entre la CRP-cumulative et la FMD, ce qui n'a toutefois pas été retrouvé par l'équipe de Sandoo *et al.* [331] mesurant la CRP et la VS tous les 3 mois pendant 6 ans.

Ainsi, les études sont discordantes entre elles, ce qui complique la compréhension du lien, bien qu'indéniable, entre DE et inflammation, et qui peut suggérer l'implication de mécanismes plus complexes encore inconnus.

3) Marqueurs circulants de la dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance

Parmi les marqueurs circulants reflétant la FE dans le PR, plusieurs candidats sont intéressants. Tout d'abord, la diméthylarginine asymétrique (ADMA), composé endogène inhibant toutes les

formes de NOS diminuant la production de NO et étant donc impliqué dans la DE, est associée au risque CV et est retrouvée augmentée dans l'athérosclérose, l'hypercholestérolémie, le diabète de type de 2 [348,349]. En cas de PR, les données sont controversées car des études trouvent une corrélation positive entre la FMD et l'ADMA [320,350], ce qui n'est pas confirmé par d'autres équipes [351,352]. Ainsi, l'ADMA ne semble pas être un marqueur pertinent de la DE. Des études mettent en évidence une augmentation de la pentraxine-3 (PTX3) chez le patient PR [353]. C'est une longue protéine de la famille des pentraxines, dont fait partie la CRP, impliquée dans l'inflammation et dans le processus d'athérosclérose. Une étude chez le patient PR ne retrouve pas de corrélation entre PTX3 et DAS28, CRP ou VS, ce qui laisse supposer que la PTX3 n'est pas un marqueur fiable de DE dans la PR [354]. Une étude montre qu'un faible taux de vitamine D chez le patient PR est associée à la FMD [355]. Selon Södergen *et al.* [319], l'activation endothéliale apparait plus précocement que la DE ou le développement de l'athérosclérose, ce qui peut expliquer de mauvaises corrélations entre la FMD et les marqueurs d'activation endothéliale (ICAM-1, VACM-1, E-sélectine, MCP-1). Toutefois, des études montrent un lien entre atteintes fonctionnelles et structurales vasculaires : quelques études trouvent une corrélation négative entre FMD et cIMT [295,322,324,325], mais pas toutes [310,356].

Ainsi, à l'heure actuelle nous ne possédons aucun marqueur circulant fiable de la DE des artères de conductance. Des marqueurs encore inconnus, et vraisemblablement impliqués dans les mécanismes de DE, sont encore à trouver pour aider à la compréhension et au suivi du patient.

4) Effet des traitements sur la dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance

a) Traitements de la PR

Une étude menée chez 29 patients PR n'a pas montré d'effet positif des DMARDs (tous types de médicaments confondus) sur la DE, malgré une réduction du taux plasmatique de CRP et de la VS après 2 et 6 semaines de suivi [311]. Des effets similaires ont été retrouvés malgré une réduction des cytokines inflammatoires TNFα et IL-6 [357]. Toutefois, il a été démontré qu'un traitement commencé le plus tôt possible après l'apparition des symptômes par MTX et anti-TNFα retarde et réverse la progression de la DE et de l'athérosclérose [348].

a.1 csDMARDs

Bien que, comme précédemment montré, le MTX réduise le risque CV du patient PR, son effet au niveau de la DE est peu étudié et les résultats sont controversés. Les données sur ce sujet seront abordées en détails dans la partie 2 paragraphe 2.1.1.

a.2 bDMARDs

Les données concernant l'impact des anti-TNFα sur la DE macrovasculaire sont les plus nombreuses, mais sont également controversées. Plusieurs revues de la littérature montrent un effet bénéfique des anti-TNFα sur la FMD des patients PR [259,358], ce qui est conforté par une importante méta-analyse de 2017 reprenant 20 études qui a identifié les anti-TNFα comme associés à une amélioration de la DE chez le patient PR [359]. Toutefois, une autre méta-analyse ne montre pas d'effets de ces mêmes traitements sur la FMD [360]. De façon intéressante, une étude montre que les anti-TNFα améliorent la fonction endothéliale sans modifier l'aspect morphologique (cIMT) ni mécanique (rigidité artérielle) des vaisseaux [361], ce qui n'est pas retrouvé par une revue de littérature montrant majoritairement une réduction signification de la rigidité artérielle [362].

L'inhibition du récepteur à l'IL-6 par le tocilizumab montre des résultats encourageants au niveau de la DE : une étude pilote montre une amélioration de la DE après 3 mois et maintenu après 6 mois de traitement [317].

Le rituximab a montré une amélioration seulement transitoire de la DE à 12 semaines de traitement mais plus à 24 semaines [363]. Toutefois d'autres études montrent un effet bénéfique du rituximab à partir de deux semaines de traitement se maintenant à plus de 6 mois voire un an de traitement [364,365].

Un effet bénéfique sur la FMD des patients PR de l'anakinra a également été retrouvé [358] que ce soit 3 heures après le traitement [190,366] ou durant 30 jours de traitement [366].

Une étude, sans groupe contrôle, a montré l'absence d'effet de l'abatacept sur la FMD durant un an de traitement malgré une diminution des paramètres inflammatoires [367]. De même, Sandoo *et al.*, dans une lettre aux éditeurs, rapportent le même résultat au niveau vasculaire chez une patiente de 32 ans traitée 3 mois par la protéine de fusion [368]. Toutefois, l'impact de l'abatacept mérite de plus amples investigations.

a.3 tsDMARDs

L'impact des inhibiteurs des JAK sur la DE n'est pas connu à l'heure actuelle.

a.4 Glucocorticoïdes

L'utilisation des GC est incontournable dans la prise en charge initiale du patient et dans le traitement de ses crises. Toutefois, ces anti-inflammatoires montrent des effets délétères sur le risque CV du patient. Une revue de la littérature s'est intéressée aux effets de ces molécules au niveau de la fonction endothéliale [369] : si en condition physiologique l'utilisation des GC conduit à une détérioration de la fonction endothéliale, en condition inflammatoire chez le patient PR, la majorité des études montre une amélioration de la DE pour une dose de 7,5 mg/j (correspondant à la faible dose recommandée par la SFR [21]). Ainsi cette revue montre l'absence d'effets délétères, voire même un effet bénéfique sur la DE en cas de PR. Ces effets semblent dépendants de la dose, de la durée et de la voie d'administration du traitement. Toutefois ces résultats sont à prendre avec précaution car la revue s'appuie sur très peu d'articles disponibles (cinq).

a.5 AINS

Une seule étude s'est intéressée à l'impact d'un traitement de 2 semaines par AINS sur la DE en cas de PR [370]. Ont été comparés les effets de l'indométacine *vs.* rofecoxib *vs.* placebo chez 37 patients, et aucune modification de FMD n'a été trouvée entre les trois groupes.

b) Thérapies adjuvantes

L'utilisation des statines montre un effet bénéfique sur la DE chez le patient PR traité par 20 mg de simvastatine pendant 6 semaines [371]. Cette amélioration de la fonction endothéliale est corrélée négativement au niveau de l'inflammation systémique et au ratio LDL/HDL. Toutefois, lors de cette étude, le traitement par statine était associé à des DMARDs, questionnant sur une possible efficacité synergique entre les deux traitements. L'association des statines avec l'ézémétimibe montre également des effets bénéfiques sur la FMD dans la PR [358].

De même, un traitement par ramipril (10 mg/j) pendant 8 semaines améliore la FMD du patient PR [48], ce qui n'a toutefois pas été retrouvé dans une autre étude utilisant le quinapril [372].

Un traitement par spironolactone permet de réduire la DE chez les patients [358]. En revanche, la pioglitazone ne montre aucun effet bénéfique [358].

Sur un modèle de rat PR et diabètique, le vardenafil, un inhibiteur de la phosphodiestérase 5, et le cilostazol, un inhibiteur de la phosphodiestérase 3, montrent une amélioration de la DE aortique et augmente l'expression tissulaire de l'eNOS [373].

Enfin, l'activité physique durant des programmes de 3 à 6 mois a amélioré la DE du patient PR [53,255].

En conclusion, l'ensemble de ces données controversées soulignent la difficulté à comprendre et conclure sur la DE observées chez le patient, son origine, ses mécanismes, son histoire naturelle, ses liens de causalités et l'impact des traitements. La grande variabilité interindividuelle dans les études cliniques participe à ces discordances de résultats, montrant l'intérêt de l'utilisation des modèles animaux pour clarifier les mécanismes impliqués dans la DE.

3.3.1.3 Données expérimentales : dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance

1) <u>Les modèles murins de polyarthrite rhumatoïde</u>

Afin d'améliorer la compréhension de la physiopathologie et optimiser les traitements de la PR, la recherche fondamentale sur modèle animaux est primordiale. Parallèlement aux études cliniques chez l'Homme, l'utilisation des modèles murins de PR permet une étude plus complète des mécanismes physiopathologiques et de cibles thérapeutiques en standardisant la pathologie et les traitements, ce qui est extrêmement compliqué à appliquer chez l'Homme. Il existe plusieurs types de modèles d'arthrite chez l'animal, les modèles induits (par injection de bactérie, d'antigène, de collagène, ou d'huile minérale) et les modèles spontanés (par atteinte génétique) [374,375]. Les principaux modèles utilisés et les plus connus sont des modèles induits, il s'agit des modèles d'arthrite induite à l'adjuvant (AIA) et d'arthrite induite au collagène (CIA).

a) Modèle d'arthrite induite à l'adjuvant [374–377]

Le modèle AIA est le premier modèle expérimental de PR développé en 1956 par Pearson et son équipe [378] . Ce modèle consiste à immuniser préférentiellement des rats mâles Lewis de plus de 5 semaines, qui présentent la meilleure réponse à l'induction, par l'injection unique sous-cutanée à la base de la queue d'une suspension de *Mycobacterium tuberculosis* ou *M. butyricum* inactivé dans de l'adjuvant incomplet de Freund. La suspension ainsi obtenue est appelée adjuvant complet de Freund. Il est également possible d'induire l'arthrite par injection dans la face plantaire d'une patte qui sera plus affectée que la patte controlatérale [379]. Les peptidoglycanes du bacille inactivé absorbés au niveau du site d'injection sont drainés par les vaisseaux et nœuds lymphatiques jusqu'à la synoviale. L'accumulation de ces peptidoglycanes vont d'une part initier une réponse immunitaire par activation des LT et d'autre part induire la synthèse d'enzymes protéolytiques et de ROS pour éliminer les peptidoglycanes accumulés. Ces deux actions conduisent à une rupture de la structure articulaire cartilagineuse, matricielle et osseuse. Ce modèle est caractérisé par une inflammation polyarticulaire reproductible, d'apparition rapide, progressive et facilement mesurable, marquée par une infiltration lymphocytaire et une destruction articulaire, une résorption osseuse, une activation des cellules endothéliales, une prolifération périostée et synoviale conduisant à un pannus. Il y a activation d'une immunité LT-dépendante et complément-indépendante. Les lymphocytes Th1 et Th17 sont impliqués dans ce modèle avec une augmentation des cytokines TNFα, INFγ, IL-1, IL-6, IL-17, IL-21. En revanche, les LB ne semblent pas jouer de rôle dans l'immunisation de ce modèle ce qui ne permet pas de retrouver de FR ni des ACPA. De même, il n'est pas retrouvé de dyslipidémie. Les symptômes se développent environ 10 jours après l'induction avec un gonflement des extrémités (poignets et chevilles). L'inflammation progresse et est maximale entre 20 et 30 jours suivant l'induction avant de progressivement diminuer pour atteindre une rémission. Ce modèle présente également des atteintes gastro-intestinales, génito-urinaires, cutanées et ophtalmiques.

b) Le modèle d'arthrite induite au collagène [380,381]

Développé en 1977, le modèle CIA consiste en l'injection intradermique le plus souvent chez des souris (DBA/1, B10.RIII, C57BL6) ou chez des rats (Wistar, Lewis, Dark-Agouti) d'une suspension de collagène de type II hétérologue (d'origine bovine, humaine, porcine ou aviaire) ou homologue dans de l'adjuvant incomplet de Freund à la base de la queue. Il est également possible de faire

l'injection à la base du dos ou dans la face plantaire d'une patte. Il est possible de faire une nouvelle injection environ 21 jours après la première pour renforcer la réponse immunitaire et accentuer la sévérité arthritique. Le modèle résulte d'un dépôt de complexes immuns sur les surfaces articulaires et l'infiltration de la membrane synoviale par les cellules immunitaires. Ceci conduit à un pannus et une hyperplasie synoviale, une destruction du cartilage et une résorption osseuse. Il y a production de cytokines TNFα, INFγ, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-22 au niveau synovial, et une activation des LT CD4+ et des LB – avec production d'Ac anti-collagène de type II – et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Après induction, les premiers symptômes apparaissent vers le 21ème jour et perdurent jusqu'au 50ème-60ème jour avant de décroitre vers une rémission.

2) Mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance

L'utilisation du modèle animal a permis de caractériser certains mécanismes impliqués dans la DE macrovasculaire observée dans la PR [259,265,266,292,382,383]. Une importante revue de la littérature publiée en 2014 par Totoson *et al.* [265], incluant 10 études sur le modèle AIA et 2 études sur le modèle CIA, a résumé les données expérimentales disponibles sur la DE macrovasculaire aortique en conditions isométriques. A l'exception d'une seule, toutes les études ont exploré la relaxation du vaisseau par l'Ach au stade maximal de l'inflammation et ont montré une diminution de la relaxation témoignant d'une DE. L'étude faisant exception s'est intéressée, dans le modèle CIA, à un stade précoce de l'inflammation, aux premiers signes de la pathologie, et n'a pas montré de DE. Les études des mécanismes impliqués dans cette DE (**Figure 14**) ont identifié un découplage des eNOS et une diminution de la biodisponibilité en NO, un déficit en BH_4, une augmentation de l'activité de l'arginase et des NOX, une augmentation de la production d'anions superoxydes et de peroxinitrites (par couplage de l'$O_2^{-\circ}$ avec le NO), une suractivité du système rénine-angiotensine-aldostérone, avec implication de l'Ang II qui favorise l'hyperactivité des NOX par activation du récepteur à l'Ang II de type 1 (AT_1), une augmentation de l'activité de la COX-2 et un déficit en EDHF [265,383,384]. De façon paradoxale, une étude a exploré sur modèle de souris CIA la réactivité aortique à l'Ach au maximum de l'inflammation, et n'a montré aucune différence de réactivité entre les groupes contrôles et arthritiques [385]. Toutefois, les résultats de cette étude montrent

bien une diminution de la biodisponibilité en NO et une augmentation de l'expression de iNOS dans le groupe CIA.

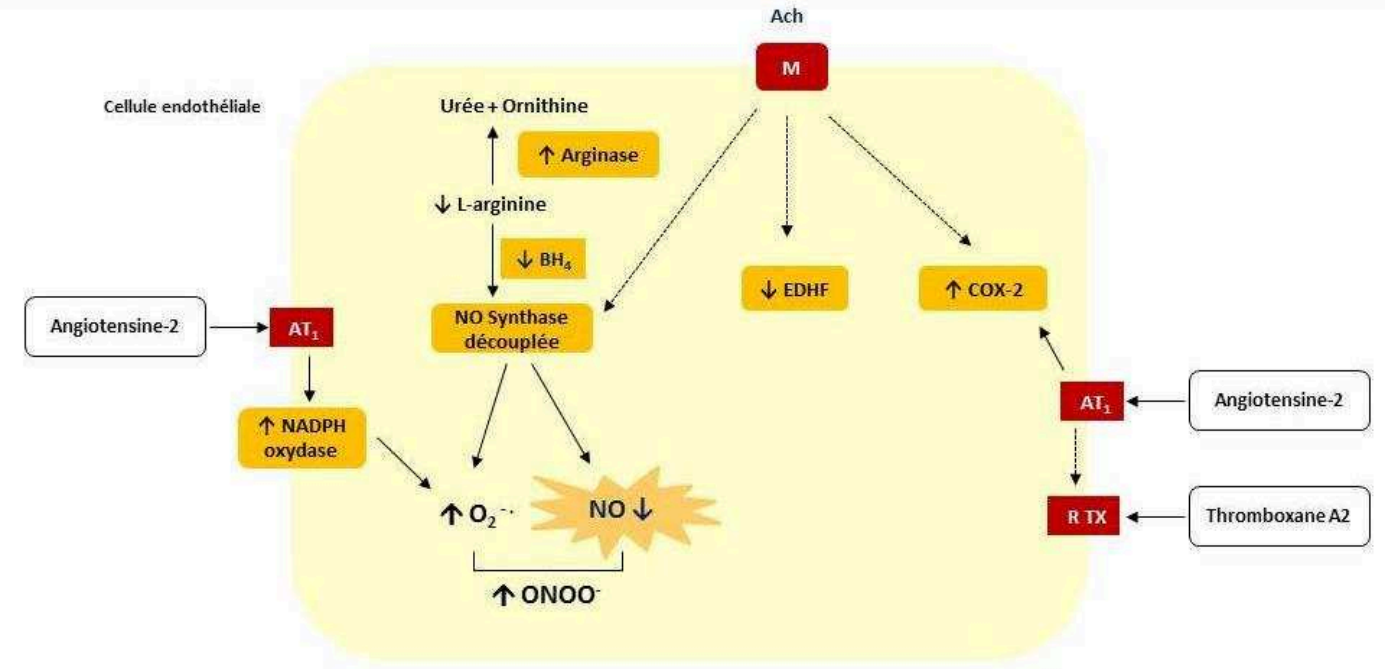


Figure 14 – Schéma des mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale observés chez le rat arthritique. L'activation du récepteur muscarinique (M) par l'acétylcholine (Ach) conduit à l'activation de trois principales voies endothéliales : la cyclooxygénase-2 (COX-2), les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF), et la voie de la NO synthase. Cette dernière catalyse la conversion de la L-arginine en monoxyde d'azote (NO) grâce à son cofacteur la tétrahydrobioptérine (BH_4). L'hyperactivité de l'arginase et un déficit en BH_4 conduit à un découplage de la NOS diminuant la production de NO et générant la production d'anion superoxide ($O_2^{-\cdot}$), capable de réagir avec le NO et former du peroxynitrite ($ONOO^-$). L'angiotensine II (Ang II) peut amplifier la production de facteurs dérivés de l'endothélium vasoconstrictants par activation de son récepteur Ang II de type 1 (AT_1) qui active la NADPH oxydase augmentant la production d'$O_2^{-\cdot}$, la COX-2 et le récepteur au thromboxane (R TX). Les flèches montantes et descendantes indiquent une augmentation ou une diminution, respectivement, des biodisponibilités ou des activités (d'après Totoson *et al.* [265]).

La cinétique d'apparition de la DE au niveau aortique a été étudiée à 4 stades dans le modèle AIA : en phase préclinique, 4 jours après l'induction (J4), à l'apparition des symptômes à J11, en phase aigu au maximum de l'inflammation à J33 et en phase chronique après diminution de l'inflammation à J90 [383]. La DE macrovasculaire est présente uniquement phase aiguë à J33, et est corrélée avec les taux circulants d'IL-1β, de TNFα et de MCP-1 mais pas de CRP, d'ICAM-1, VCAM-1 ni avec la sévérité de la pathologie. Une étude s'est intéressée au lien entre la DE macrovasculaire et microvasculaire [386], et a montré que la DE microvasculaire est d'apparition plus précoce et est plus durable que la DE macrovasculaire. Par ailleurs, ces deux atteintes (macro et

microvasculaires) ne sont pas corrélées, suggérant des mécanismes physiopathologiques différents.

De façon intéressante il a été montré dans le modèle AIA que l'activation du récepteur de type 1 à l'Ang II conduit à une production exacerbée d'EDCF *via* l'activation des COX-2, la production de ROS et l'activation du récepteur au thromboxane [387].

3) Effets des traitements sur la dysfonction endothéliale au niveau des artères de conductance

Les données concernant les effets du MTX sur la DE dans les modèles animaux seront abordées en détails dans la partie 2 paragraphe 2.1.1.

La plupart des études ont été réalisées par notre laboratoire sur aortes isolées dans le modèle AIA. Nous avons montré que :

- L'étanercept, un anti-TNFα, à dose de 10mg/kg tous les 3 jours pendant 3 semaines améliore significativement la DE par rapport aux animaux non-traités [388]. Cet effet passe par une augmentation de l'activité des NOS, une diminution de l'activité des COX-2 et de l'arginase et une normalisation de la production d'$O_2^{-\circ}$.
- La prednisolone (10 mg/kg/j) améliore significativement la DE aortique par rapport aux animaux non traités, ce qui n'est pas le cas d'une faible dose (1 mg/kg/j) [389]. Cet effet bénéfique passe par une amélioration de l'activité des NOS et de la production des EDHF, une normalisation de la production d'$O_2^{-\circ}$ et une diminution de l'activité des COX-2 et de l'arginase.
- Le traitement par diclofenac améliore significativement la DE par rapport aux rats non traités, ce qui n'est pas le cas d'un traitement par celecoxib, en améliorant la production des EDHF et en réduisant l'activité de l'arginase et la production d'$O_2^{-\circ}$ [390].
- L'inhibition de l'arginase, par la N_w-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA), chez le rat AIA restaure la FE avec une amélioration de l'activité des NOS et de la production des EDHF, une réduction de l'activité de la COX-2 et une normalisation de la production d'$O_2^{-\circ}$ [382], confirmant l'implication de l'hyperactivité de l'arginase dans la physiopathologie de la DE.

Dans le même modèle, l'équipe d'Haruna *et al.* montre dans le modèle AIA un effet bénéfique d'un traitement par fluvastatine à 5 mg/kg/j pendant 3 semaines [249]. D'autres équipes ont montré

un effet bénéfique sur la DE d'un traitement par losartan ou irbésartan [50,391]. De façon très intéressante, une étude a montré que l'utilisation du losartan *in vivo* sur modèle AIA ou *ex vivo* sur anneaux d'aorte isolés prévient la production d'EDCF [387].

Actuellement, aucune étude ne s'est intéressée à l'impact des DMARDs sur la FE de la souris CIA.

3.3.2 Dysfonction endothéliale au niveau des artères de résistance

Les données chez l'animal, précédemment présentées, montrent une différence de cinétique entre les DE macrovasculaire et microvasculaire, suggérant des mécanismes physiopathologiques différents [386]. De plus, dans la PR, une DE au niveau des artères de résistance peut avoir des conséquences cardiaques et cérébrales. Ainsi, il y a un intérêt à explorer cette DE au niveau des artères de résistance, car elle pourrait représenter un marqueur de DE précoce dans la PR, et aider à comprendre les mécanismes impliqués pour réduire ses impacts cardiaques et cérébraux.

3.3.2.1 Méthodes d'exploration de la fonction endothéliale des artères de résistance

1) Chez l'Homme [392,393]

a) *Pléthysmographie de l'artère brachiale ou* Forearm perfusion technique

Cette technique consiste à mesurer par plétysmographie les modifications du flux sanguin au niveau de l'avant-bras, c'est-à-dire par mesure de volume, avant et après perfusion d'une substance vasoactive dans l'artère humérale, reflétant la FE microvasculaire. Elle permet de perfuser des molécules d'intérêt et d'apprécier la vasodilatation médiée par l'endothélium ou non. De plus, le bras controlatéral, peu affecté par les molécules perfusées, peut servir de témoin. Son caractère invasif en limite tout de même l'utilisation sur de grandes cohortes de patients.

b) Venous occlusion plethysmography *ou* forearm blood flow (FBF)

Cette technique est une variante de la *forearm perfusion technique* où la FE est cette fois-ci évaluée par obstruction de l'écoulement veineux en gonflant un brassard autour du bras à une pression proche de la pression diastolique. En bloquant le retour veineux, l'avant-bras va augmenter de volume proportionnellement à la vitesse du flux artériel, lui-même dépendant de la réponse de l'endothélium, reflétant ainsi la FE. Cette technique non invasive est la plus utilisée dans la pratique courante et la plus retrouvée dans la littérature scientifique.

c) Iontophorèse couplée au Laser Doppler

Cette technique consiste en l'évaluation de la vasodilatation des microvaisseaux cutanés par injection locale de substances vasoactives par iontophorèse. L'effet est évalué par Laser Doppler de type *imaging* (LDi), pour un calcul sur une surface, ou par Laser Doppler associé au flux (LDF), pour une évaluation sur un seul point [394]. C'est une méthode facile d'utilisation, toutefois les mesures sont difficilement reproductibles.

d) Pléthysmographie digitale (EndoPAT)

Cette technique évalue la FE microvasculaire par pléthysmographie au niveau du doigt suite à une hyperémie réactionnelle de l'artère humérale. Le bras controlatéral peut servir de témoin. Cette technique permet le calcul de l'indice d'hyperémique réactive (*reactive hypermic index*, RHI) reflétant la FE. Des études ont montré que la FE périphérique évaluée par EndoPAT est corrélée significativement avec la fonction microvasculaire coronaire et est prédictive de la survenue d'évènements CV chez des patients prématurément atteints d'athérosclérose [395,396]. Cette technique est assez coûteuse, ce qui limite son accès, mais elle présente l'avantage d'être totalement opérateur-indépendant.

e) Réserve de flux coronaire ou coronary flow reserve (CFR)

Cette technique non-invasive évalue par échographie-Doppler transthoracique le flux sanguin coronaire au niveau de l'artère interventriculaire antérieure à un agent vasodilatateur, le plus souvent l'adénosine, administré par voie intra-veineuse. La CFR correspond au rapport entre le flux coronaire au pic dilatatoire sur le flux à l'état basal [397]. C'est une technique peu invasive (demandant juste une cathétérisation périphérique et non pas directement cardiaque), facilement accessible, peu coûteuse, non irradiante, non polluante (en comparaison aux techniques de référence que sont l'IRM cardiaque ou l'imagerie nucléaire) et répétable sur un même patient. Une certaine dextérité est demandée au praticien pour repérer l'artère.

f) Le rapport de viabilité sous-endorcardique ou Sub-endocardial viability ratio (SEVR)

Le SEVR se détermine de façon non-invasive, basé sur l'analyse des ondes de pouls en utilisant la tonométrie artérielle [398]. Il correspond au rapport de l'aire sous la courbe de la partie diastolique

de l'onde de pouls (soit la perfusion myocardique) sur l'aire sous la courbe de la partie systolique de l'onde de pouls (soit la contraction myocardique). Il reflète donc l'index entre l'offre et la demande en oxygène du myocarde, c'est-à-dire la perfusion myocardique par rapport à sa charge de travail. De faibles valeurs de SEVR traduisent un rapport offre/demande défavorable.

g) Doppler transcrânien

Cette technique non invasive utilise l'échographie-Doppler de haute fréquence pour évaluer non pas un débit mais la vitesse circulatoire cérébrale. La vitesse des hématies dans une artère dépend à la fois du débit et du calibre du vaisseau, ce qui témoigne de l'état de contraction (sténose ou vasospasme) ou de dilatation (vasodilatation) du vaisseau et donc de la FE, mais aussi les lésions athérosclérotiques [282,399,400]. Cette technique permet une exploration rapide des artères moyennes cérébrales sans passer par une angiographie (angiographie par résonnance magnétique ou par tomodensitométrie) – invasive, coûteuse, demandant du temps et une coopération importante du patient –, mais elle ne renseigne pas sur la morphologie vasculaire et est opérateur-dépendant.

2) Chez l'animal [301]

a) Technique de vaisseaux isolés en conditions isométriques avec le myographe de Mulvany

Le myographe de Mulvany est une méthode d'étude de la FE par quantification de la variation de tension de façon isométrique sur segments d'artères de résistance (coronaire, mésentère, cérébrale) ou de veinules (diamètres de 100 à 300 µm) (**Figure 15**). Le segment est ici tendu entre deux fils d'acier (diamètre 40 µm) ou de tungstène (diamètre 25 µm) sous stéréomicroscope.

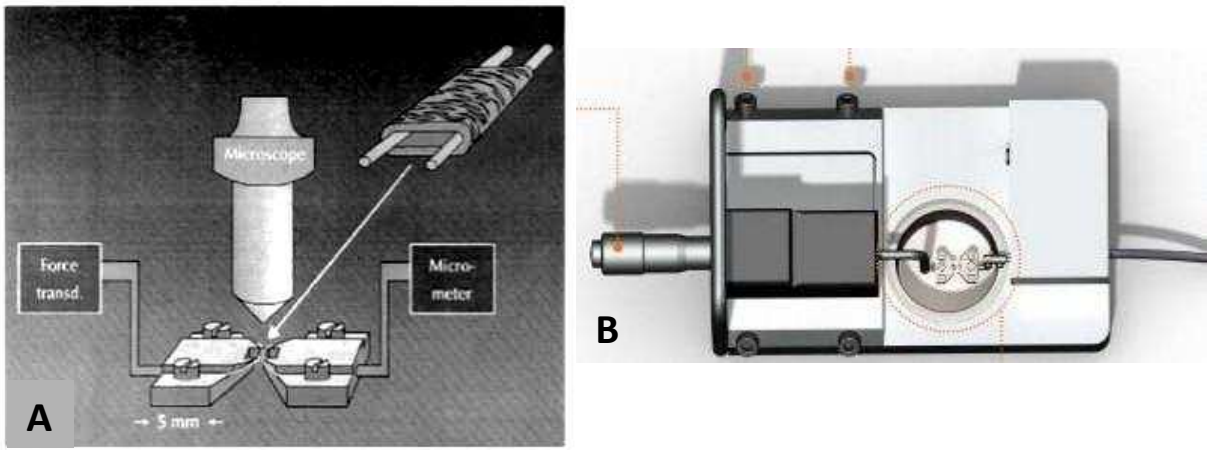


Figure 15 – Représentation de l'artère fixée (A) dans une chambre (B) du myographe de Mulvany [401].
A : le segment d'artère est tendu entre deux fils d'acier ou de tungstène entre deux mâchoires en acier inoxydable dont une est fixe et reliée à un transducteur et un capteur de pression, et une est mobile et reliée à un micromètre pour permettre d'imposer une tension intra-luminale isométrique.
B : chambre du myographe de Mulvany selon la marque Danish Myo Technologies®

La normalisation de ces segments est calculée selon l'équation de La Place en fonction de la taille du vaisseau et de sa réactivité à différente tension passive intra-luminale, afin de déterminer un étirement unique propre à chacun. La suite de l'expérimentation – tests de viabilité, d'intégrité de l'endothélium et étude de la FE – diffère peu du macrovasculaire. Toutefois, en raison de la plus grande fragilité de la microvasculature, les seuils minimaux du test d'intégrité de l'endothélium sont plus faibles. Par exemple, un segment coronaire est considéré comme ayant un endothélium intègre si la relaxation est au moins de 50 %. Cette technique présente les mêmes avantages et inconvénients que pour l'étude macrovasculaire en condition isométrique.

b) Technique de vaisseaux isolés en conditions isobariques avec l'artériographe de Halpern

C'est une technique plus proche de la physiologie car le vaisseau est soumis au stress rhéologique (pressions et forces de cisaillement). Elle permet d'appliquer une pression intraluminale au segment qui permet le développement d'un tonus myogénique, et elle permet d'étudier la morphologie et les propriétés mécaniques du vaisseau en plus de la FE.

Le segment de vaisseau (artère de résistance ou veinule) est prélevé et fixé entre deux canules de verres à l'aide de sutures pour éviter toute fuite de pression. Le diamètre des canules est à adapter suivant le type et la taille de vaisseau étudié. Un circuit intraluminal va permettre de pressuriser le vaisseau et éventuellement d'appliquer un flux intravasculaire pour mimer les forces de cisaillement et le *shear stress*. Un circuit extraluminal va permettre d'apporter le liquide

physiologique dans la chambre à organe isolé ainsi que les agents pharmacologiques. Le vaisseau est placé sous un microscope relié à une caméra et à un moniteur associé à un analyseur de contraste calibré permettant de mesurer le diamètre du vaisseau ainsi que l'épaisseur des deux parois (**Figure 16**).

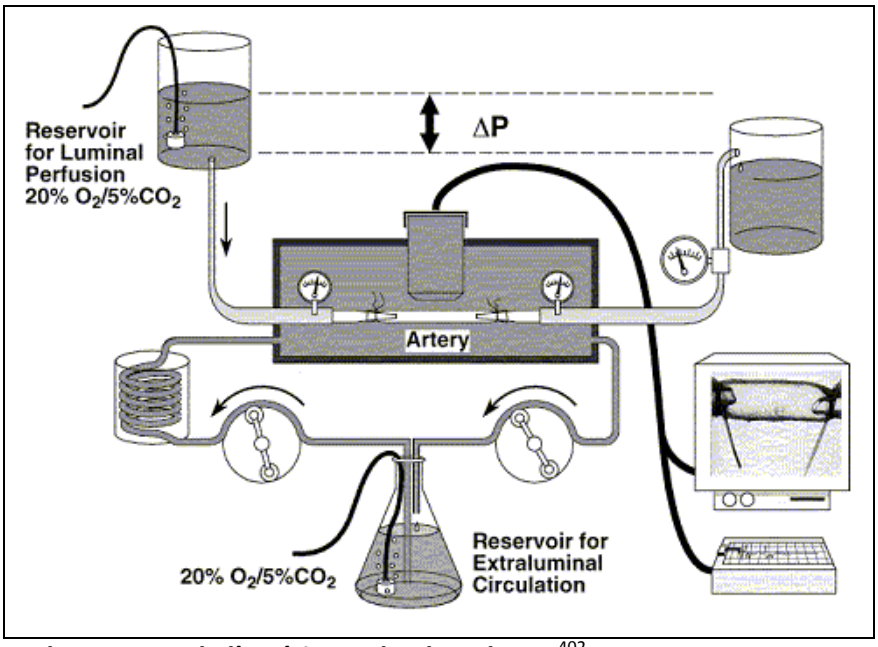


Figure 16 – Schéma de montage de l'artériographe de Halpern [402].

Après montage, le segment est pressurisé à environ 80 % de la pression artérielle physiologique de l'animale pendant 30 à 60 minutes. Cette normalisation permet au segment de développer un tonus myogénique spontané. Ce tonus est un indicateur de la réactivité et surtout de la viabilité du segment, bien que cela ne dispense pas des mêmes tests de viabilité et d'intégrité de l'endothélium décrits dans les sections concernant les myographes isométriques. Les seuils d'acceptabilités sont dépendants du type de vaisseau et du protocole utilisé. Il est possible de retirer l'endothélium des vaisseaux pressurisés soit en faisant passer une bulle soit à l'aide de détergent. La FE est également testée sur vaisseaux viables et intègrent soit en utilisant des concentrations croissantes et cumulatives en agent vasorelaxation endothélium-dépendant, soit en incrémentant le flux intravasculaire.

Cette technique est considérée comme mimant au mieux la physiologie ce qui en fait son avantage. De plus, comme le diamètre du vaisseau est variable, qu'il existe une pression transmurale et que la forme cylindrique du vaisseau est respectée, il est possible d'étudier le tonus myogénique (c'est-à-dire la contraction du vaisseau en réponse à une augmentation de la

pression), les paramètres morphologiques (surface transversale, ratio lumière/paroi) et mécaniques (élasticité, courbe contrainte-déformation) du vaisseau, ce qui permet une étude beaucoup plus complète qu'en conditions isométriques. Toutefois, le gros inconvénient de cette technique vient du fait que les expériences ne peuvent être réalisées que sur un vaisseau à la fois, ce qui ralenti les études nécessitant l'exploration de mécanismes physiopathologiques ou pour des groupes d'animaux nombreux.

c) Techniques in vivo

Les techniques FMD et *forearm perfusion* ont été adaptées pour être applicables *in vivo* chez le rat anesthésié à l'isoflurane afin d'en étudier la fonction endothéliale [403]. Comme chez l'Homme, il est mesuré le diamètre vasculaire et le flux sanguin par échographie-Doppler au niveau de l'artère fémorale, soit en réponse à l'injection de substances vasodilatatrices (acétylcholine, adénosine, nitroglycérine) par l'artère iliaque commune ou la veine caudale, soit en réponse à l'hyperémie post-occlusive de l'artère iliaque commune. L'hyperémie est obtenue en passant un filament de prolène autour de l'artère iliaque par accès transabdominal qui est tiré puis serré afin d'occlure l'artère. Malgré la pose de cathéter et l'utilisation d'anesthésique, ces techniques peuvent être répétées chez le même animal, ce qui permet un suivi de la fonction endothéliale dans le temps, ce qui n'est pas possible avec les techniques *ex vivo*. De plus, ces techniques se rapprochent des celles utilisées chez l'Homme et permettent une étude dans l'environnement d'origine sans prélèvements tissulaires, ce qui permettrait une meilleure transposition des résultats de l'animal à l'humain. Toutefois, l'isoflurane interfère avec les paramètres hémodynamiques, et doit être pris en compte dans l'interprétation des résultats. De plus, ces techniques ne permettent pas d'étudier les mécanismes impliqués dans la DE.

De la même manière, la technique LDi a été adaptée chez le rongeur [404]. Cette technique permet d'évaluer sur animal anesthésié et tondu, au niveau de la zone d'étude, la réactivité des microvaisseaux cutanés par injection locale de substances vasoactives par iontophorèse par laser Doopler. C'est une technique pouvant être utilisée à plusieurs reprises chez le même animal ce qui permet des études longitudinales. Toutefois, l'utilisation d'anesthésique est à prendre en compte lors de l'interprétation des résultats.

3.3.2.2 Dysfonction endothéliale au niveau des artères de résistance et polyarthrite rhumatoïde : état de l'art des données cliniques et expérimentales

Plusieurs études se sont intéressées à la fonction endothéliale des artères de résistance du patient PR. Afin d'avoir une vision exhaustive des données existantes, nous avons réalisé une revue narrative de la littérature pour répertorier les informations disponibles sur la fonction et la dysfonction endothéliale microvasculaire chez le patient PR.

Revue publiée dans *Nature Review Rheumatology*, 2018 Jul;14(7):404-420 (FI : 15.661) [405]

Bordy R, Totoson P, Prati C, Marie C, Wendling D, Demougeot C.

Microvascular endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis

En résumé, notre cherche Pubmed a permis d'identifier 50 articles qui ont exploré la fonction endothéliale microvasculaire du patient PR par LDi, FBF, endoPAT, CFR ou SEVR et 2 articles qui ont porté leur exploration sur artères isolées chez l'animal.

Les principales données sont les suivantes :

- Quatre études ont été réalisées en phase précoce (moins d'un an après le diagnostic) : 2/4 ont montré la présence d'une DE dans les stades précoces de PR.
- Onze articles sur 17 ont montré la présence d'une DE dans les stades avancés de PR.
- Toutes les études utilisant la CFR ont mis en évidence une DE coronarienne quelle que soit l'ancienneté de la pathologie.
- La majorité des études n'a pas montré de corrélation significative entre DE microvasculaire et durée de la pathologie, activité de la pathologie et marqueurs inflammatoires (CRP et VS). De même, la recherche de biomarqueurs circulants (cytokines, marqueurs d'activation endothéliale ou de facteur de risque CV) donne des résultats extrêmement controversés.
- Certaines études, mais pas toutes, (9/14) montrent un effet bénéfique des csDMARDs et bDMARDs sur la fonction endothéliale.
- Les études s'intéressant aux effets des GC (2 études) ou de la pioglitazone (2 études) ne montrent pas d'effets significatifs sur la DE. La rosuvastatine améliore la FE mesurée par SEVR dans 1 étude. Une étude s'intéressant à l'activité physique ne montre pas de

différences à 3 mois, mais indique une amélioration de la fonction endothéliale à 6 mois de protocole d'activité physique.

- Une étude réalisée sur un modèle CIA chez le mouton montre l'existence d'une DE coronarienne et périphérique (au niveau digital). Une autre étude chez le rat AIA montre une DE microvasculaire au niveau mésentérique, apparaissant plus tôt que la DE aortique observée sur le même modèle.
- Une seule étude clinique suggère la présence d'une DE au niveau de la circulation cérébrale par Doppler transcrânien chez le patient PR.

Depuis la rédaction de cette revue, une méta-analyse regroupant 5 articles et représentant 334 sujets (155 sujets contrôles et 179 patients PR) a confirmé la présence significative d'une DE coronarienne, mesurée par CFR, en cas de PR [406].

En conclusion, cette revue montre l'intérêt porté sur la DE des artères de résistance du patient PR mais également la difficulté des études cliniques à s'accorder sur les résultats. Outre les éléments susmentionnés reflétant la difficulté à mettre en évidence l'apparition de cette DE et en trouver des marqueurs circulants, d'autres questions restent en suspens :

- La DE microvasculaire précède-t-elle la DE macrovasculaire chez l'Homme comme cela a été observé chez l'animal ?
- Est-ce que la DE microvasculaire périphérique corrèle avec la DE coronarienne ?
- Est-ce que la rémission clinique de la PR correspond à une rémission de la DE microvasculaire ?
- La DE microvasculaire peut-elle prédire la survenue d'évènements CV ?
- Quels sont les mécanismes impliqués dans cette DE microvasculaire ?
- Quels sont les impacts des traitements sur la DE microvasculaire ?

De plus amples études sont nécessaires afin de pouvoir répondre à ces questions. Les études expérimentales présentent un intérêt certain car elles permettent de standardiser la sévérité et l'histoire naturelle de la pathologie mais également les traitements, ce qui permettrait grandement de limiter la controverse des résultats.

Microvascular endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis

*Romain Bordy[1], Perle Totoson[1], Clément Prati[1,2], Christine Marie[3], Daniel Wendling[2,4] and Céline Demougeot[1]**

Abstract | The systemic autoimmune disease rheumatoid arthritis (RA) is characterized by increased cardiovascular mortality and morbidity and is an independent cardiovascular risk factor. Cardiovascular diseases (CVDs) result from accelerated atherogenesis, which is a consequence of endothelial dysfunction in the early stages of the disease. Endothelial dysfunction is a functional and reversible alteration of endothelial cells and leads to a shift in the properties of the endothelium towards reduced vasodilation, a pro-inflammatory state, and proliferative and prothrombotic properties. In RA, endothelial dysfunction can occur in the large vessels (such as the conduit arteries) and in the small vessels of the microvasculature, which supply oxygen and nutrients to the tissue and control inflammation, repair and fluid exchange with the surrounding tissues. Growing evidence suggests that microvascular endothelial dysfunction contributes to CVD development, as it precedes and predicts the development of conduit artery atherosclerosis and associated risk factors. As such, numerous studies have investigated microvascular endothelial dysfunction in RA, including its link with disease activity, disease duration and inflammation, the effect of treatments on endothelial function, and possible circulating biomarkers of microvascular endothelial dysfunction. Such findings could have important implications in the cardiovascular risk management of patients with RA.

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common systemic autoimmune disease and is characterized by a reduced life expectancy that is 3–18 years lower than that of the general population[1]. Cardiovascular diseases (CVDs), which include myocardial infarction and stroke, have been described as the main cause of premature mortality and sudden death in RA[2]. In a meta-analysis that included 41,490 patients with RA, the risk of CVD was 48% higher in these patients than in the general population[3]. The risk of CVD in RA is comparable to that in diabetes[4] and persists even after adjusting for other cardiovascular risk factors[5], thus making the occurrence of RA a strong independent cardiovascular risk factor. The relative increase in risk of myocardial infarction and stroke in patients with RA (compared with the general population) is 68% and 41%, respectively[3]. For myocardial infarction, this increased risk is observed within the first 3 years following diagnosis[6], indicating that the increased risk of CVD occurs in the early stages of RA. Despite remarkable improvements in RA treatment, evidence indicates that the mortality gap between patients and the general population is not closing[7,8].

The reasons for the excess risk of CVD in RA are not fully understood, but a role of endothelial dysfunction is largely suspected[9,10]. Endothelial dysfunction is a systemic condition that affects the macrovasculature, which is the predominant location of atheroma plaque development, and also the microvasculature, that is, the 'business end' of the circulation (also known as the microcirculation), which supplies oxygen and nutrients to the tissues and controls inflammation and repair (BOX 1). Although more research has been dedicated to the link between macrovascular endothelial dysfunction and CVD, evidence from the past few years suggests an important role of microvascular endothelial dysfunction in CVD development, as this condition precedes and predicts the development of conduit artery atherosclerosis and associated risk factors, at least in the general population[11].

In RA, endothelial dysfunction is observed at both the macrovascular and the microvascular levels even though the large majority of the literature relates to macrovascular endothelial dysfunction[9,12–14]. However, compared with macrovascular endothelial dysfunction, whether endothelial dysfunction in the microvascular beds occurs at different stages of RA, reflects different steps of the vascular pathology (FIG. 1) and differentially responds to antirheumatic treatment is not well known. These points are challenging but important to address, as endothelial dysfunction has a prognostic value for cardiovascular events in the general population, and the

[1]PEPITE EA4267, FHU INCREASE, Universitaire Bourgogne Franche-Comté, UFR Santé, F-25000, Besançon, France.

[2]Service de Rhumatologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Besançon, F-25000, Besançon, France.

[3]INSERM UMR1093 CAPS, Universitaire Bourgogne Franche-Comté, UFR des Sciences de Santé, F-21000, Dijon, France.

[4]EA 4266, Universitaire Bourgogne Franche-Comté, UFR Santé, F-25000, Besançon, France.

*e-mail: cdemouge@univ-fcomte.fr

https://doi.org/10.1038/s41584-018-0022-8

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

Key points

- Microvascular endothelial dysfunction is an early and/or seminal event in the development of cardiovascular diseases and associated organ damage and is also present in patients with rheumatoid arthritis (RA).
- Microvascular endothelial dysfunction does not correlate with disease activity, disease duration, levels of C-reactive protein or the erythrocyte sedimentation rate.
- Antirheumatic drugs and other therapies can be used to treat microvascular endothelial dysfunction, but the effects of these therapies differ.
- Achieving remission in RA does not guarantee the normalization of microvascular endothelial function.
- Semiautomated methods for the measurement of microvascular endothelial dysfunction exist; therefore, the concept of endothelial-guided therapies in RA deserves attention.
- The predictive value of microvascular endothelial dysfunction for cardiovascular events needs to be demonstrated in future studies.

correction of endothelial dysfunction is associated with a reduced risk of CVDs[10].

In this Review, we describe microvascular endothelial dysfunction and its association with risk of CVDs and summarize the available data regarding microvascular endothelial dysfunction in RA. We specifically discuss the link between microvascular endothelial dysfunction and RA disease activity, disease duration and inflammation and the effects of various treatments on microvascular endothelial function. Finally, we evaluate the possible circulating biomarkers of microvascular endothelial dysfunction and the potential of measuring microvascular endothelial function for cardiovascular risk management in RA.

Microvascular endothelial dysfunction

The endothelium, composed of a single layer of endothelial cells, is a selective barrier that separates blood content from the interstitial compartments. The endothelium is a crucial homeostatic organ for the regulation of vascular tone, vascular structure, blood coagulation, trafficking of the leukocytes, antigen presentation and important steps in the catabolism of lipoproteins and other biologically important blood-borne molecules[15–18]. Strategically placed, the endothelium receives, integrates and responds to various signals: mechanical stimuli, such as pressure and shear stress, and chemical stimuli, such as hormones and locally secreted substances[19]. The important role of the endothelium was primarily recognized as its capacity to release factors that modulate vascular tone; these factors are usually classified as endothelium-derived relaxing factors (EDRFs), including nitric oxide, prostacyclin and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), and endothelium-derived contracting factors (EDCFs), including angiotensin II, endothelin 1 and vasoconstrictor prostanoids.

The term endothelial dysfunction defines the phenotypical modulation of the endothelium towards a non-adaptive state that is characterized by the loss or dysregulation of the homeostatic mechanisms that operate in healthy endothelial cells. This state leads to increased expression of adhesion molecules, increased synthesis of prothrombotic and pro-inflammatory factors, increased oxidative stress, increased vascular smooth muscle cell proliferation and increased vascular smooth muscle tone secondary to impaired synthesis of EDRFs and excessive production of EDCFs[20]. Endothelial dysfunction is preceded by endothelial activation, which is defined by the endothelial expression of cell surface adhesion molecules, such as vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) and endothelial leukocyte adhesion molecule (E-selectin). Endothelial cell activation is typically induced by pro-inflammatory cytokines, such as TNF and IL-6, and facilitates the recruitment and attachment of circulating leukocytes to the vessel wall[21]. Endothelial activation is both a cause and a consequence of endothelial dysfunction[21].

Clinical relevance. A large body of evidence indicates that endothelial dysfunction is a common condition associated with many diseases that have a high cardiovascular risk, such as hypertension[22–24], diabetes[25–28], dyslipidaemia[29,30], ageing[22] and obesity[28]. Endothelial dysfunction is considered a systemic syndrome that is a consequence of exposure to traditional and nontraditional risk factors, including local factors (for example, shear stress), genetic factors and other as yet unknown factors (either protective or harmful), and the systemic manifestations are associated with notable morbidity and mortality. Accordingly, endothelial dysfunction is regarded as a 'barometer' of the total cardiovascular risk[20].

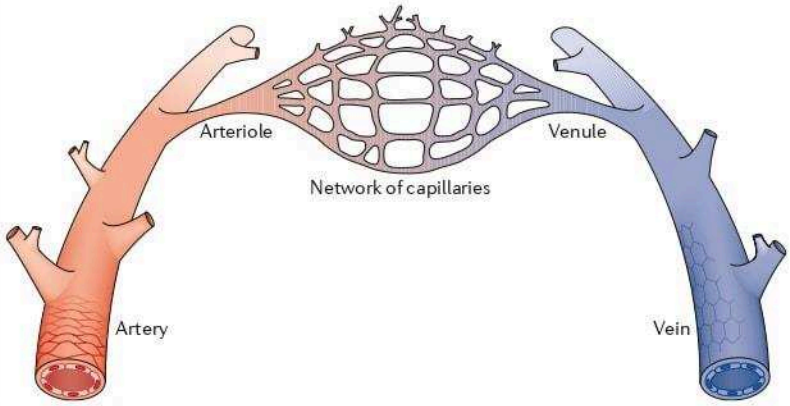
Conversely, microvascular endothelial dysfunction and macrovascular endothelial dysfunction show only a weak correlation with each other in the general population[31], supporting the idea that microvascular endothelial dysfunction and macrovascular endothelial dysfunction have distinct pathophysiological roles in the vascular disease course[11,32]. Indeed, although every vascular bed contains endothelial cells, the function of the endothelial cells and their structure and phenotypes differ between beds from the macrovasculature and those from the microvasculature and between different vascular beds from the microvasculature[33]. For instance, the contribution of nitric oxide to endothelium-dependent vasodilation decreases and that of EDHF increases as the size of arteries decreases[19]. Likewise, the response to pro-inflammatory cytokines (such as cytokine-induced synthesis of prostaglandins), the expression of adhesion molecules and proteolytic enzymes, and the production of nitric oxide by endothelial cells differs between various vascular beds and between beds from the macrovasculature and microvasculature[34,35]. Moreover, the contribution of endothelial cells to leukocyte trafficking and inflammation is higher in the microvasculature than in the macrovasculature[36,37]. Finally, given that the estimated total endothelial cell surface area of arterioles (261,337 cm^2) and venules (879,989 cm^2) in a 70 kg man is around 300 times larger than that associated with the aorta (156 cm^2) and larger arteries (3,333 cm^2)[38], endothelial cells in the venules and arterioles might be the primary source of tissue and circulating inflammatory mediators that secondarily infiltrate the endothelium of larger vessels[36]. Notably, in clinical practice, vascular structural abnormalities (such as increased stiffness or thickening of the arterial wall, as indicated

Dyslipidaemia
A disorder of lipoprotein metabolism characterized by a spectrum of quantitative and qualitative changes in lipids and lipoproteins.

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

Box 1 | **Structure and function of the microvasculature**

The microvasculature (the blood circulation within the organs) is composed of arterioles (resistance vessels), capillaries and venules (which are all less than ~300 μm in diameter). One of the primary functions of the systemic microvasculature is to ensure adequate oxygen and nutrient delivery to meet the metabolic demands of every cell within an organ and to remove carbon dioxide and waste products produced by cells[11]. Exchanges between the blood and interstitial fluid around cells exclusively occur at the capillary level. The systemic microvasculature exerts additional important functions. For instance, the renal microvasculature has a key role in the control of plasma filtration, electrolyte exchange and water reabsorption, whereas the adipose microvasculature controls the storage of fat. Importantly, postcapillary venules are the entry point of inflammatory cells into the tissues. Endothelial cells, which form a single layer lining the microvasculature, are a major regulator of vasomotor tone, vascular structure and remodelling, fibrinolysis and coagulation, as well as angiogenesis and inflammation[19]. The endothelium of the cerebral capillaries is also the cellular site of the blood–brain barrier. Accordingly, microvascular endothelial dysfunction has multiple consequences, including increased vascular tone, increased permeability of the blood–brain barrier, promotion of thrombosis, vascular remodelling, vascular hypertrophy and rarefaction, and increased production of inflammatory factors[36,38]. Microcirculation controls the passage of fluid (perfusion) to each organ and adapts the perfusion to the needs of the organ. As a result, microvascular endothelial dysfunction might lead to hypoperfusion (an inadequate supply of oxygen and nutrients to the tissues) at rest combined with uncoupling between organ perfusion and the metabolic requirements of the organ, thus rendering organs more vulnerable to macrovascular endothelial dysfunction[38,45].



by the augmentation index (AIx) or carotid intima-media thickness (cIMT) measurements, respectively) should not be confused with endothelial dysfunction because these processes relate to different aspects of the vascular pathology.

Consistent with the idea that macrovascular endothelial dysfunction and microvascular endothelial dysfunction have different pathophysiological roles in the general population, microvascular but not macrovascular endothelial dysfunction was associated with future cardiovascular events in a large cohort of 1,574 healthy middle-aged (49.9 years on average) men[39], and the addition of microvascular but not macrovascular endothelial dysfunction to the Framingham risk score enabled an improved cardiovascular risk reclassification. Likewise, the addition of microvascular but not macrovascular endothelial dysfunction to a risk model that included the Framingham risk score improved the risk discrimination and reclassification of major cardiovascular events in another large cohort of healthy elderly individuals (all 70 years of age)[40]. In the Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) trial, which studied a cohort of women with angina syndromes who had normal conduit arteries, a large number of women in this cohort had microvascular dysfunction that was not correlated with traditional cardiovascular risk factors[41,42].

From the large body of studies that link endothelial dysfunction and cardiovascular risk in the general population and in patients with traditional CVD[43], macrovascular endothelial dysfunction seems to be a good predictor of cardiovascular events in patients with pre-existing atherosclerosis, whereas microvascular function seems to be a good predictor of cardiovascular events in patients without pre-existing vascular pathology[43], allowing the identification of individuals at high cardiovascular risk before the onset of macrovascular disease[43,44]. From a pathophysiological point of view, functional changes in different microcirculatory beds likely precede and predict the development of vascular dysfunction and remodelling in conduit arteries[45]. Notably, the inflammatory response in the microvasculature, which is characterized by endothelial activation in the microvasculature, has an important role in driving the atherosclerotic process in large vessels[38]. In turn, the stiffening of large vessels such as the aorta can lead to increased transmission of pulsatile pressure and flow into the microvasculature, which can further damage microvascular beds and cause end-organ damage[46], thus indicating a vicious circle of interactions between small and large vessels (FIG. 1).

Clinical assessment. The current methods to assess endothelial dysfunction in humans measure EDRF-dependent vasodilation in response to either a pharmacological agonist (such as acetylcholine or bradykinin), which activates endothelial receptors (vascular reactivity), or reactive hyperaemia (flow-mediated vasodilation). Reactive hyperaemia is usually elicited by inflating (until blood flow occlusion) and deflating a blood pressure cuff around the artery upstream of the site of measurement. When the cuff is released, the post-ischaemic increase in blood flow in the artery causes increased shear stress, which mechanically stimulates the endothelial cells and induces nitric oxide-dependent vasodilation. Using these methods, microvascular endothelial function can be measured in the skin (with laser Doppler flowmetry or laser Doppler imaging (LDi)[47]), forearm (with forearm blood flow plethysmography[48]), fingers (with finger plethysmography, such as finger peripheral arterial tonometry[47,48]), or coronary microvasculature (with coronary flow reserve (CFR)[49] or subendocardial viability ratio measurements[50–52]). Whereas LDi, finger peripheral arterial tonometry and methods for measuring the subendocardial viability ratio are non-invasive, forearm blood flow plethysmography and methods for measuring CFR are invasive. Only the measurement of microvascular endothelial function by finger peripheral arterial tonometry is fully automated. Using these methods, endothelial function is indicated by the intensity of the vasodilatory response to vasoactive drugs or to reactive hyperaemia, and endothelial dysfunction is defined as an impairment of the measured endothelium-dependent vasodilation compared with that of healthy volunteers.

Framingham risk score
An algorithm used to estimate the 10-year risk of developing coronary heart disease on the basis of age, sex, cholesterol levels, blood pressure (and whether the individual is being treated for hypertension), diabetes and smoking status.

Pulsatile pressure
The difference between the systolic and diastolic blood pressure (also called pulse pressure), which is governed by the relationship between ventricular ejection and the viscoelastic properties of the large arteries (arterial stiffness).

Reactive hyperaemia
A transient increase in blood flow that occurs following a brief period of ischaemia (for example, arterial occlusion).

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

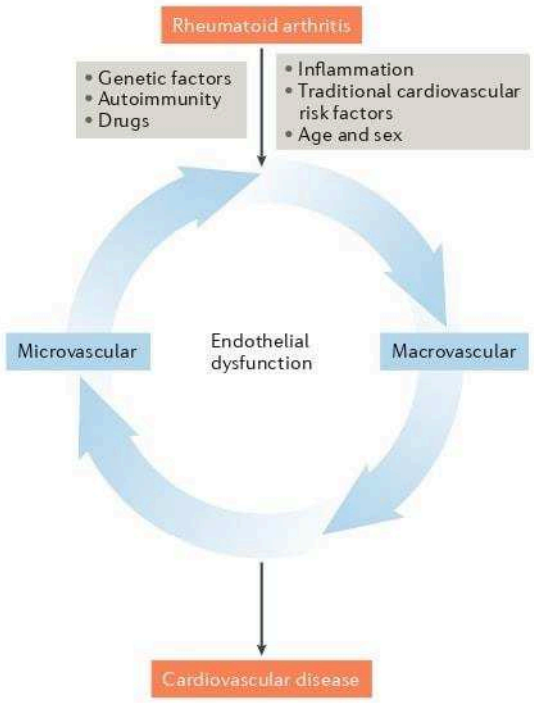


Fig. 1 | **Microvascular and macrovascular crosstalk and associated cardiovascular diseases in RA.** Endothelial dysfunction is usually considered a systemic syndrome that reflects the effects of all the atherogenic factors present in an individual and whose systemic manifestations are associated with considerable cardiovascular morbidity and mortality. However, considering the distinct physiological roles of the macrovasculature and microvasculature, endothelial dysfunction in the macrovasculature and microvasculature might be involved in different aspects of the vascular pathology. In rheumatoid arthritis (RA), the combination of genetic factors, immune dysregulation, inflammation, metabolic disturbances, traditional cardiovascular risk factors, sedentary behaviour, age or drugs might influence the crosstalk between macrovascular and microvascular functions. According to this hypothesis, functional changes in the microvasculature precede and predict the development of endothelial dysfunction in conduit arteries. In turn, endothelial dysfunction leads to the stiffening of large vessels, such as the aorta, and induces increased transmission of pulsatile pressure and flow into the microvasculature, which can further damage microvascular beds and causes damage to the organs, thus initiating a vicious cycle of interaction between small and large vessels.

Endothelial dysfunction in RA

The presence of endothelial dysfunction in patients with RA has been demonstrated since the beginning of the 2000s in both the macrovascular[53] and microvascular beds[54]. In RA, a combination of multiple factors might lead to crosstalk between the microvascular and macrovascular beds and induce endothelial dysfunction in both (FIG. 1). These factors include genetic factors (such as *HLA-DRB1* status[53] or polymorphisms in *MTHFR*[55], *TNF*[2] or *IL6* (REFS[2,56])), immune dysregulation (such as the presence of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibodies)[2,57], inflammation (for example, the production of cytokines IL-1β, IL-6, TNF or IL-17)[2,58], metabolic disturbances (such as the co-occurrence of diabetes mellitus or dyslipidaemia)[59], traditional cardiovascular risk factors (hypertension or smoking)[12,59], sedentary behaviour[59,60], age[59] and/or drug use (steroid or NSAIDs)[61].

In agreement with data from the worldwide general population, data from cross-sectional and longitudinal studies of large or small cohorts of patients with RA demonstrate no correlation between microvascular and macrovascular endothelial dysfunction[62–66]. This lack of correlation suggests that endothelial dysfunction in the macrovasculature and microvasculature reflects different aspects of the vascular pathology in RA. Notably, even though the increased incidence of coronary artery diseases (CADs; compared with the general population) in RA is shared by many cardiometabolic diseases (such as hypertension, diabetes and dyslipidaemia), patients with RA more frequently have myocardial ischaemia in the absence of obstructive epicardial disease than patients with other diseases[67], suggesting a prominent role for coronary microvascular dysfunction in RA. The surface area of the microvascular vasculature is much greater than that of the large conduit arteries, and the structure and function of the microvascular endothelium can be readily influenced by therapeutic intervention over several weeks, whereas reducing the size of an atherosclerotic plaque in large artery segments requires a longer time period[45]. Furthermore, endothelial dysfunction is a reversible process[20]. Hence, the assessment of microvascular endothelial function might have a particular value in the diagnosis, stratification and treatment of cardiovascular risk in RA.

Microvascular endothelial dysfunction in early RA. Multiple studies have been performed to assess whether microvascular endothelial dysfunction occurs early in the course of RA (TABLE 1). This issue is important to assess for providing arguments in favour of the use of microvascular endothelial dysfunction as a subclinical marker of cardiovascular risk that could be measured during the early stages of the disease.

In cross-sectional studies, microvascular endothelial dysfunction was present in the skin and coronary vasculature in patients with an average disease duration of 11 months[68] or 6 months[69]. By contrast, no endothelial dysfunction was observed in the skin microvasculature of patients in the very early stages of arthritis (that is, an average disease duration of 2 months[70] or 5 months[71]). Notably, despite the lack of functional endothelial abnormality at the very early stage of disease, the number of circulating endothelial cells (a marker of endothelial damage) was on average increased in patients with very early arthritis compared with healthy individuals[70], suggesting that microvascular endothelial cells were already damaged and/or activated in very early RA. From a pathophysiological perspective, this result means that the damage to microvascular endothelial cells is concomitant with the beginning of the course of the disease but that a few months are necessary to lead to a measurable functional impairment of the microvascular endothelium.

One limitation of the available studies is that the majority of these studies included DMARD-naive

Myocardial ischaemia
A restriction in blood supply to the myocardium resulting from reduced blood flow in the coronary arteries. This restriction leads to an imbalance between myocardial oxygen supply and demand, causing cardiac dysfunction, myocardial infarction, arrhythmias and sudden death.

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

Table 1 | **Microvascular endothelial dysfunction in early and established RA**

Study	Study type	Method	Number of patients with RA (average age, years)	Number of healthy individuals (average age, years)	RA duration (average)	RA activity[a]	RA treatment?	Endothelial dysfunction?
Early RA								
Foster, 2012 (REF.[70])	Cross-sectional	LDi	18 (58)	48 (54)	2 months	n.i.	Yes (NSAIDs)	No
van Eijk, 2011 (REF.[71])	Cross-sectional	LDi	15 (48)	15 (48)	5 months	Low	Yes (NSAIDs)	No
Klimek, 2017 (REF.[68])	Cross-sectional	LDi	• 28 patients with RA (41) • 47 patients with AS (33)	26 (31)	11.4 months	Moderate	Yes (glucocorticoids and NSAIDs)	Yes
Turiel, 2009 (REF.[69])	Cross-sectional	CFR	25 (52)	25 (50.5)	6.24 months	Active	No	Yes
Established RA								
Arosio, 2007 (REF.[62])	Cross-sectional	LDi	65 (47)[b]	40 (45)[b]	6 years	Moderate	Yes (MTX or glucocorticoids)	Yes
Foster, 2010 (REF.[83])	Cross-sectional	LDi	66 (58.5)	48 (54)	10.7 years	n.i.	Yes (MTX)	No
Sandoo, 2012 (REF.[63])	Cross-sectional	LDi	67 (56)	29 (42)	8 years	Moderate	Yes (cDMARDs)	No
Bergholm, 2002 (REF.[54])	Longitudinal	FbF	10 (52)	33 (54)	<18 months	n.i.	No	Yes
Yki-Jarvinen, 2003 (REF.[74])	Cross-sectional	FbF	20 (53)	33 (54)	• <18 months (10 patients) • 3 years (10 patients)	n.i.	Yes (50% of patients)[c]	Yes
Hänsel, 2003 (REF.[75])	Cross-sectional	FbF	8 (35)[b]	8 (34)	10 years	Moderate	Yes (DMARDs)	Yes
Mäki-Petäjä, 2008 (REF.[76])	Cross-sectional	FbF	12 (59)	13 (59)	n. i.	Active	Yes (DMARDs)	Yes
Alomari, 2012 (REF.[77])	Cross-sectional	FbF	42 (34)	36 (30.4)	5 years	n.i.	Yes (DMARDs)	Yes
Provan, 2011 (REF.[84])	Cross-sectional	PAT	• 82 patients with active RA (56.9) • 31 patients in remission (58.1)	86 (53.7)	• 17.1 years (active RA) • 16.9 years (remission)	82 active 31 remission	Yes (~30% of patients; DMARDs)	No
Santos, 2012 (REF.[85])	Cross-sectional	PAT	107 (50.2)[b]	124 (46.9)[b]	10.7 years	Moderate	Yes (cDMARDs)	No
Ciftci, 2008 (REF.[78])	Cross-sectional	CFR	30 (43.7)	52 (45.3)	9.5 years	Remission	Yes (DMARDs)	Yes
Recio-Mayoral, 2009 (REF.[79])	Cross-sectional	CFR	• 12 patients with RA (47) • 13 patients with SLE (40)	25 (44)	16 years (RA)	Low	Yes (anti-inflammatory drugs)	Yes
Kakuta, 2016 (REF.[80])	Cross-sectional	CFR	87 (65 years)	23 (65)	9 years	Low	Yes (DMARDs)	Yes
Ikonomidis, 2014 (REF.[81])	Longitudinal	CFR	• 60 patients with RA and CAD (59.5) • 20 patients with RA without CAD (58)	30 (57.1)	• 12 years (RA with CAD) • 11 years (RA without CAD)	Active	Yes (DMARDs)	Yes
Pieringer, 2010 (REF.[86])	Longitudinal	SEVR	• 17 patients with RA (48.8) • 13 patients with AS (48.8)	35 (47.5)	10 years	Active	Yes (DMARDs)	No

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

Table 1 (cont.) | **Microvascular endothelial dysfunction in early and established RA**

Study	Study type	Method	Number of patients with RA (average age, years)	Number of healthy individuals (average age, years)	RA duration (average)	RA activity[a]	RA treatment?	Endothelial dysfunction?
Established RA (cont.)								
Pieringer, 2014 (REF.[87])	Cross-sectional	SEVR	131 (54.3)	151[d] (46.3)	13.2 years	Moderate	Yes (DMARDs)	No
Anyfanti, 2017 (REF.[82])	Cross-sectional	SEVR	91 (61.6)	31 (58.3)	9.5 years	Moderate	Yes (DMARDs or glucocorticoids)	Yes

AS, ankylosing spondylitis; CAD, coronary artery disease; cDMARD, conventional DMARD; CFR, coronary flow reserve; FbF, forearm blood flow; LDi, laser Doppler imaging; MTX, methotrexate; n.i., not indicated; PAT, peripheral arterial tonometry; RA, rheumatoid arthritis; SEVR, subendocardial viability ratio; SLE, systemic lupus erythematosus. [a]Disease activity defined as remission (28-joint disease activity score (DAS28) < 2.6), low activity (2.6 ≤ DAS28 ≤ 3.2), moderate activity (3.2 < DAS28 ≤ 5.1) or active disease (DAS28 > 5.1). [b]Women-only cohort. [c]Half the patients with RA ($n = 10$) had newly diagnosed disease and were treatment naive. [d]Patients without RA were recruited from the same department of rheumatology and internal medicine (that is, not healthy individuals).

patients who were being treated with anti-inflammatory drugs (NSAIDs or glucocorticoids)[68,70,71]; these drugs might have by themselves improved endothelial function, as reported in animal models of arthritis[72,73]. In addition, the extent of disease activity was heterogeneous across these studies, with RA being moderate or active in the studies reporting endothelial dysfunction[68,69] and low or not provided by the authors in the studies reporting a lack of endothelial dysfunction[70,71]. Thus, whether the presence of endothelial dysfunction in very early RA is linked to disease activity and/or drugs is currently not known, and more data are required to draw definite conclusions on the time and conditions associated with the development of microvascular endothelial dysfunction in RA. Notably, studies using finger plethysmography (peripheral arterial tonometry) in early RA are lacking and should be performed, as this method is non-invasive, fully automatized and possible to perform in routine clinical practice and in large cohorts of patients. Moreover, despite its great clinical relevance, whether microvascular endothelial dysfunction precedes macrovascular endothelial dysfunction in the course of RA is currently unknown.

Microvascular endothelial dysfunction in established RA. Even though the stage in which microvascular endothelial dysfunction begins needs further investigation, ample evidence demonstrates that microvascular endothelial function is altered in established RA (defined as a disease duration of ≥12 months). Multiple studies support this conclusion, including cross-sectional and longitudinal studies in which microvascular endothelial function was measured in the skin[62], brachial[54,74–77] or coronary microvasculature[78–82] (TABLE 1). However, other studies have conversely failed to observe impaired endothelial function in the skin[63,83], finger[84,85] or coronary[86,87] microvasculature in patients with RA. Unfortunately, these latter studies suffer from limitations, including the use of inappropriate control groups (such as the inclusion of individuals who differed in their cardiovascular risk profile[84], age, cholesterol levels, smoking status or the presence of diabetes compared with the individuals in the RA group)[87] and the use of mixed cohorts (such as patients with either RA or ankylosis spondylitis (AS))[86] or women-only cohorts[85]. Studies of endothelial dysfunction to date have varied greatly in terms of the sample size, disease duration (from 3 to 17.1 years), disease activity and drug use (including whether the patients have received DMARDs or drugs with vascular effects, such as hypolipidaemic, antihypertensive or antidiabetic drugs).

Notably, the presence of impaired coronary microvascular endothelial function (as indicated by the CFR) in patients with RA has been well established[78–81], thus providing a pathophysiological basis for the frequent occurrence of myocardial ischaemia without evidence of occlusion of the epicardial coronary arteries in patients with RA[67]. However, as the measure of CFR is invasive and/or difficult to perform in routine practice, the remaining question is whether the assessment of microvascular endothelial function in the peripheral vascular beds might be a reliable reflection of coronary endothelial function, as observed in the general population[88]. To the best of our knowledge, no study has yet been conducted to answer this question in RA. In a longitudinal study conducted with 197 patients with RA from the Dudley Rheumatoid Arthritis Comorbidity Cohort (DRACCO), which included 201 patients with RA who were followed between 2006 and 2012, investigators measured both skin microvascular endothelial function by LDi and coronary microvascular endothelial function by subendocardial viability ratio measurements[89]. Unfortunately, the relationship between the two parameters was not explored, and the lack of a control group makes it impossible to know whether these parameters were impaired or not. Further studies are therefore needed to answer this important question.

Disease duration and microvascular endothelial dysfunction. The detection of endothelial dysfunction in patients with established disease in the above-mentioned studies raises the question of whether disease duration affects the occurrence and/or severity of microvascular endothelial dysfunction in RA.

Although a number of studies have investigated the relationship between microvascular endothelial function and disease duration by various methods, including skin LDi[62,64,71,90,91], finger plethysmography[88], CFR[78,80] and subendocardial viability ratio[82], all but one of these studies[78] failed to demonstrate a correlation (Supplementary Table 1).

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

However, the majority of studies thus far have been cross-sectional, whereas the evaluation of the effect of disease duration requires a longitudinal approach and the assessment of patients with RA who have a stable level of disease activity and receive consistent treatment, which will be difficult to perform. In one longitudinal study[91], the investigators measured microvascular endothelial function in the skin in a cohort of 51 patients before and after 4 months of therapy with either methotrexate (alone or in combination with another conventional DMARD) or an anti-TNF drug (added to methotrexate alone or in combination with another conventional DMARD). In this study, endothelial function did not change notably during the 4-month follow-up. However, when dividing the patients with RA into patients who responded and patients who did not respond to antirheumatic therapy, endothelial function improved only in the group of responders, suggesting that the change in the level of disease activity is a more important factor than disease duration in determining the occurrence of endothelial dysfunction.

At the coronary level, one study by Ciftci et al.[78], albeit cross-sectional, deserves attention. In this study, the disease duration of the 30 included patients with RA ranged from 1 to 25 years; importantly, all the patients were in remission for more than 3 months, thus discarding disease activity as a confounding factor. In this cohort, the investigators found an association between CFR and disease duration. Thus, the available studies make it difficult to conclude what effect disease duration has on microvascular endothelial dysfunction. In this context, animal studies in models of chronic arthritis could help to answer this question.

Systemic inflammation and microvascular endothelial dysfunction. In diseases associated with low-grade inflammation, such as hypertension, diabetes and obesity, C-reactive protein (CRP) is considered a reliable circulating biomarker of endothelial function[92]. In RA, which is associated with high-grade inflammation, chronic systemic inflammatory burden is largely suspected and widely assumed to contribute to endothelial dysfunction. A causal link between systemic inflammation and microvascular endothelial dysfunction would imply that levels of CRP and/or the erythrocyte sedimentation rate (ESR) might be used as biomarkers of microvascular endothelial dysfunction or might be useful to predict the evolution of this vascular dysfunction.

Although a large number of studies have investigated whether a correlation exists in RA between microvascular endothelial function and levels of CRP or the ESR, the results of these studies have been controversial (Supplementary Table 1). Whatever the vascular bed, in the majority of the studies, the investigators found no correlation between microvascular endothelial function and these two parameters[64,65,69–71,74,78,80,82,83,85,91,93–95]. However, many of these studies use a cross-sectional approach that does not account for the fluctuating nature of inflammation in RA and the resulting inflammatory insult to the vascular wall over a longer period of time.

In a longitudinal study of the DRACCO cohort, Sandoo et al.[65] tried to resolve this issue by measuring the cumulative inflammatory burden over a length of time rather than by measuring levels of CRP or the ESR at a single time point. This cumulative inflammatory burden was calculated from the area under the curve (AUC) for quarterly measurements of CRP level and ESR obtained between 2006 and 2012. The investigators found no correlation between the AUC of inflammatory markers and endothelial function at the end of the follow-up. However, a limitation of the study is that the AUCs for the CRP level and ESR were divided by the total period of data collection for each patient to produce an average AUC, as for some patients, data points were missing at the start or end of the 6 years. Therefore, this average AUC did not reflect the cumulative inflammation burden over the 6-year follow-up but rather the annual average inflammatory burden. In addition, the cumulative inflammation was calculated only for the duration of the study and not for the total disease duration, and the possibility that inflammation might have been higher early in the patient's disease course cannot be discarded. Importantly, the investigators also demonstrated that the levels of CRP and the ESR at baseline did not correlate with endothelial function 6 years later, thus discarding CRP and ESR as factors that can predict microvascular endothelial dysfunction.

In a further study of the DRACCO cohort[96], the investigators found no difference in skin microvascular endothelial function between patients with RA who had normal levels of inflammation (defined as CRP <5 mg/l and ESR <25 mm/h) compared with patients with RA who had high levels of inflammation (defined as CRP >5 mg/l and ESR >25 mm/h). Likewise, in another study that evaluated the presence of myocardial ischaemia by dobutamine stress contrast echography in patients asymptomatic for CAD[95], only the patients with RA who had high levels of serum CRP and a high ESR had myocardial ischaemia. In these patients, ischaemia was not linked to epicardial coronary obstruction, thus suggesting the involvement of microvascular endothelial dysfunction. Nevertheless, the cumulative CRP levels (calculated from the AUC for CRP measurements made every 3–6 months for 3 years) did not differ between patients with and without myocardial ischaemia. However, this study investigated only a small number of patients with RA ($n = 18$), limiting the interpretations of the findings. Overall, controversial data likely reflect the heterogeneity of the analysed studies, but nevertheless, the data indicate that contrary to what is observed in low-grade inflammatory diseases, neither the CRP levels, the ESR nor the measurement of the cumulative inflammatory burden would be useful as reliable diagnostic markers of microvascular endothelial dysfunction in RA.

From a mechanistic point of view, lack of correlation between the inflammatory burden and/or inflammatory markers and microvascular dysfunction does not discount the involvement of inflammation in microvascular dysfunction pathogenesis. Indeed, in a study comparing coronary microvascular endothelial function in 80 patients with RA who did or did not have CADs[81], the

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

patients with CAD had a lower endothelial function than the patients without CAD, despite identical CRP levels and 28-joint disease activity score (DAS28). However, the patients with RA who had CAD exhibited higher circulating IL-1β levels, and IL-1β levels correlated with coronary endothelial function in both groups. Likewise, in a small cohort of 20 patients with RA, endothelial function (measured by forearm blood flow) did not correlate with CRP and IL-6 levels but was negatively correlated with circulating TNF levels[74]. These data suggest that circulating pro-inflammatory cytokines, such as IL-1β or TNF, are more reliable indices of microvascular endothelial dysfunction than CRP levels or ESR.

Disease activity and microvascular endothelial dysfunction. From a therapeutic perspective, whether microvascular endothelial dysfunction is directly linked to RA disease activity is of utmost importance for the management of cardiovascular risk in patients with RA. In studies of early RA, the identification of microvascular dysfunction in patients seems to be related to the levels of disease activity: in one study of patients with low levels of disease activity, no apparent microvascular dysfunction was detectable[71], whereas in another study of patients with high levels of disease activity, the presence of microvascular dysfunction was demonstrated[69]. These findings suggest that disease activity is important for the occurrence of microvascular endothelial dysfunction in RA.

Although multiple studies have demonstrated no link between RA activity and microvascular endothelial function (Supplementary Table 1), as mentioned above, the majority of studies of microvascular function have been cross-sectional, which does not consider the cumulative effect of disease activity on microvascular function. Nevertheless, several studies have reported the occurrence of microvascular endothelial dysfunction (when compared with healthy individuals) in patients with RA who were in remission[78] or reported no difference in endothelial function between patients with RA who were in remission and patients with RA who had active disease[85]. Likewise, the presence of endothelial dysfunction has been reported in patients with RA who had low levels of disease activity[62,79], and the occurrence of endothelial dysfunction did not differ between patients with RA who had active disease and those patients who had moderate disease activity[90]. By contrast, in one study, endothelial function (measured by finger plethysmography) was lower in patients with active RA than in patients in remission[84]. However, one limitation of this study was that the patients in the active RA cohort did not have a lower endothelial function than individuals in the control cohort (that is, healthy individuals), probably because the individuals in the control cohort had a poorer cardiovascular risk profile than the patients in remission. Although microvascular function and the DAS28 are correlated in some studies[68,97], the majority of studies to date have demonstrated no such correlation[58,62,64,71,79,82,85,90,91].

These controversial findings indicate that the level of disease activity is not predictive of the presence of microvascular endothelial dysfunction, and from a pathophysiological perspective, they suggest that disease activity is one of multiple factors responsible for microvascular endothelial dysfunction. In addition, the precise mechanisms linking disease activity to endothelial dysfunction are still unknown. One study from 2018 deserves attention as this study was specifically designed to determine whether an arthritis-based monitoring of disease activity would be sufficient to detect and monitor early microvascular injury in RA[98]. For this purpose, the investigators studied the effect of anti-TNF drug cessation on microvascular endothelial function (as assessed by forearm blood flow plethysmography following acetylcholine infusion). Of the 22 patients who stopped receiving anti-TNF therapy, only the 8 patients who flared had a lower endothelial function than at the time of drug cessation, whereas no difference was seen in the remaining 14 patients. A great limitation of this study is the small sample size (28 patients with RA in total: 22 patients who stopped receiving anti-TNF therapy and 6 patients who continued receiving anti-TNF therapy), which led to high standard errors and limited the interpretation of the results. However, this study provides new avenues for the design of future studies aiming to decipher the link between disease activity and microvascular endothelial dysfunction in RA. Albeit preliminary, the results of this study imply that clinical inflammation is more important in determining the status of microvascular health than the presence or absence of anti-TNF therapy. Additionally, these results were obtained in patients with RA most of whom were receiving methotrexate therapy, thus raising the question of whether antirheumatic drugs such as methotrexate can affect microvascular endothelial function.

Effects of treatments

Although the pathogenesis of vascular dysfunction in RA is largely unknown, the commonly held belief is that the high inflammatory burden is the major culprit for the deterioration of endothelial function, leading to subsequent structural changes, atherosclerosis and related cardiovascular complications. This assumption is mainly supported by the similitude existing between the pathogenesis of atherosclerosis, driven by vascular inflammation, and that of RA, driven by a joint inflammation followed by high-level systemic inflammation that supposedly induces vascular inflammation. According to this hypothesis, increased disease activity leads to increased systemic inflammation and increased vascular damage, and as a consequence, any treatment that reduces disease severity and/or systemic inflammation is expected to improve vascular function. As discussed above, the link between microvascular endothelial dysfunction and disease activity or inflammation is far less simple than believed, as no direct relationship has been found between these parameters in clinical studies. This complexity is reinforced when examining the effect of treatments on microvascular endothelial function.

The first striking observation is that most of the case–control studies that demonstrated the presence of impaired microvascular endothelial function in patients with RA were performed in patients already receiving DMARDs and/or anti-inflammatory therapy[62,74–82].

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

Interestingly, in one study of 65 patients with RA who had a moderate level of disease activity, macrovascular endothelial function was better in patients receiving methotrexate therapy than in patients receiving glucocorticoid therapy, whereas no difference was observed for microvascular function between these two groups, suggesting that the effects of the drugs are vascular-bed specific and independent of the effects of the drugs on disease activity. Of course, some studies have also reported a lack of endothelial dysfunction in patients with RA receiving treatment compared with healthy individuals[63,70,83–87]. However, none of these studies discussed thus far was designed to demonstrate the effect of one given therapy on endothelial function.

Anti-TNF therapy and methotrexate. Multiple studies have been conducted to specifically unravel the question of whether specific therapies have an effect on microvascular endothelial function (TABLE 2). Given the seminal role of methotrexate and anti-TNF drugs in the treatment of RA, most of the available studies have compared the effect of methotrexate therapy, anti-TNF therapy, and/or combined methotrexate and anti-TNF therapy on microvascular endothelial function, but the results of these studies have been controversial.

The majority of studies to date included patients with established RA (disease duration 3–12 years) and had small sample sizes. In one study, the 30 patients (including 17 patients with RA and 13 patients with AS who were refractory to methotrexate therapy) showed an improvement in coronary endothelial function following a switch to the anti-TNF infliximab for 6 weeks[86]. However, a confounding factor was that most of the patients were also taking either NSAIDs (the AS group) or glucocorticoids (the RA group), and the patients with RA also had a paradoxical increase in arterial stiffness following infliximab therapy.

Two studies that compared patients with RA receiving either methotrexate alone or combined methotrexate and anti-TNF therapy for 6 months[99,100] reported an improvement from baseline of endothelial function in the methotrexate-treated group but not in the methotrexate and anti-TNF group. By contrast, in another study, although the 21 patients receiving methotrexate therapy had a better baseline endothelial function (measured by response to acetylcholine infusion) in their skin microvasculature than the 30 patients receiving anti-TNF therapy, neither treatment improved endothelial function after 4 months[91]. Interestingly, patients who responded to antirheumatic therapy (as indicated by improvements in disease activity) also showed greater improvements in endothelial function, irrespective of the treatment, than patients who did not respond to therapy. Hence, as discussed above, reducing the level of disease activity might be more important than the mode of action of the antirheumatic drug in improving endothelial function. However, a bias in the studies of patients receiving combined methotrexate and anti-TNF therapy is that these patients had a longer duration of disease and were more often positive for anti-citrullinated protein antibodies and/or rheumatoid factor than the patients receiving methotrexate alone.

Other biologic drugs. In addition to anti-TNF therapy, the effect of other biologic drugs on microvascular endothelial function has also been investigated. Abatacept (a modulator of the co-stimulatory signal for T cell activation) had a transient effect on endothelial function in one case-report study[101]. Strikingly, the transient improvement of microvascular endothelial function occurred along with a progressive deterioration of macrovascular endothelial function[101], suggesting that the effect of this drug was vascular-bed dependent. The addition of the anti-IL-6 antibody tocilizumab to DMARD therapy for 6 months improved skin endothelial function in a group of 20 patients with RA[102]. In regard to another pro-inflammatory cytokine, IL-1, a single injection of the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) anakinra in DMARD-treated patients with RA improved coronary endothelial function measured 3 hours later; the benefits of the drug on endothelial function were greater in the patients with CAD than in the patients without CAD, despite the patients having identical CRP levels and DAS28 (REF.[81]). This study suggests that the reduction of inflammation is likely an important element for improving endothelial function but that other elements, which might be vascular specific, are also involved.

Glucocorticoids. Glucocorticoids are commonly used therapies for relieving inflammation, including in RA. Surprisingly, contrary to the commonly held belief that glucocorticoids have adverse effects on the cardiovascular system, the results from two studies suggest that glucocorticoids do not hamper endothelial function and might even improve endothelial function when taken at a low dosage over a long time period. Indeed, endothelial function was unchanged in patients receiving short-term glucocorticoid treatment (7–10 days) compared with function at baseline[103] and was similar to patients receiving glucocorticoids for 6 months[104]. Interestingly, the chronic use of low-dose glucocorticoids (81 months) in patients receiving DMARD therapy was associated with improvements in finger endothelial function compared with patients not receiving glucocorticoids (the majority of whom were receiving DMARD therapy)[103]. Thus, it appears that the negative effects of glucocorticoids on endothelial function observed in noninflammatory conditions[105] could be counterbalanced by the glucocorticoid-induced decrease in systemic and/or vascular inflammation in RA. More studies are necessary to determine which dose and/or duration of glucocorticoid therapy is safe in targeting microvascular endothelial dysfunction.

Non-rheumatic drugs and other therapies. Although antirheumatic drugs might be adequate for improving endothelial function in some patients with RA, other patients might need alternative and/or additional therapies. For these latter patients, therapies specifically targeting endothelial function are needed.

Pioglitazone, an antidiabetic drug, improved endothelial function (measured by finger plethysmography) in patients with RA in two studies but had no additional beneficial effects when added to DMARDs for 8 weeks

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

Table 2 | **Effects of treatments on microvascular endothelial function in RA**

Study	Method	Number of patients with RA (average age, years)	Number of healthy individuals (average age, years)	RA duration	Treatment	Effect on endothelial function (comparator)
Antirheumatic drugs						
Datta, 2007 (REF.[93])	LDi	8 (60.3)	8 (58.5)	n.i.	Combination of DMARDs: MTX, triamcinolone, leflunomide, hydroxychloroquine and/or anti-TNF for ~10.9 days	Increased endothelial function (baseline), but endothelial function remained lower than in healthy individuals (controls)
Galarraga, 2010 (REF.[91])	LDi	51 (56)	–	10 years	MTX (alone or in combination with sulfasalazine or hydrochloroquine) or anti-TNF (added to MTX alone or in combination with sulfasalazine or hydrochloroquine) for 4 months	No difference (baseline)
Ruiz-Limón, 2017 (REF.[102])	LDi	20 (47.8)	–	7.6 years	Tocilizimab added to DMARDs for 6 months	Increased endothelial function (baseline)
Sandoo, 2011 (REF.[94]) and Sandoo, 2012 (REF.[112])	LDi	23 (54)	–	11 years	Anti-TNF for 3 months	Transient effect: increased endothelial function at 2 weeks but no difference at 3 months (baseline)
Sandoo, 2015 (REF.[101])	LDi	1 woman (32)	–	11 years	Three infusions of abatacept (separated by 4 weeks) added to hydroxychloroquine and prednisolone therapy, with a 3-month follow-up	Transient effect: increased endothelial function at 2 weeks but no difference at 3 months (baseline)
Hjeltnes, 2012 (REF.[99])	PAT	• MTX group: 34 (56) • MTX and anti-TNF group: 21 (58)	–	• 3 years (MTX) • 9 years (MTX and anti-TNF)	MTX compared with MTX and anti-TNF for 6 months	• MTX group: increased endothelial function at 6 weeks and 6 months (baseline) • MTX + anti-TNF group: no difference at 6 weeks and 6 months (baseline)
Hjeltnes, 2013 (REF.[100])	PAT	• MTX group: 34 (56) • MTX and anti-TNF group: 30 (58)	–	• 3 years (MTX) • 8 years (MTX and anti-TNF)	MTX compared with MTX and anti-TNF for 6 months	• MTX group: increased endothelial function at 6 weeks and 6 months (baseline) • MTX and anti-TNF group: no difference at 6 weeks and 6 months (baseline)
Radhakutty, 2016 (REF.[104])	PAT	• Acute treatment: 18 (64) • Chronic treatment: 18 (67)	–	n.i.	Low-dose prednisolone added to DMARDs for 7 days (acute) compared with prednisolone treatment for >6 months (chronic)	No difference between patients with acute and chronic glucocorticoid treatment
Petersons, 2017 (REF.[103])	PAT	• Acute treatment: 12 (59)[a] • Chronic treatment: 12 (61)[a]	–	n.i.	Low-dose prednisolone added to DMARDs for 7–10 days (acute) or 81 months (chronic) treatment	• Acute: no difference (baseline) • Patients in the chronic treatment group had a higher endothelial function than patients in the acute treatment group
Bergholm, 2002 (REF.[54])	FbF	10 (52)	33 (54)	<18 months	MTX, cyclophosphamide, glucocorticoids and NSAIDs for 6 months	Increased endothelial function (control group)
Hänsel, 2003 (REF.[75])	FbF	8 (35)[b]	8 (34)	10 years	Switch from MTX to etanercept for 21 days	No difference (baseline)
Komai, 2007 (REF.[97])	FbF	15 (50)	–	10 years	Infliximab added to MTX for 6 weeks	Increased endothelial function at 2 and 6 weeks (baseline)

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

Table 2 (cont.) | **Effects of treatments on microvascular endothelial dysfunction in RA**

Study	Method	Number of patients with RA (average age, years)	Number of healthy individuals (average age, years)	RA duration	Treatment	Effect on endothelial function (comparator)
Antirheumatic drugs (cont.)						
Rongen, 2018 (REF.[98])	FbF	• Continued therapy: 8 (61) • Discontinued therapy with flare: 8 (52) • Discontinued therapy without flare: 14 (52)	–	• 14.2 years (continued therapy) • 8.6 years (discontinued therapy with flare) • 9.4 years (discontinued therapy without flare)	Discontinuation or continuation of anti-TNF for 6 months in patients receiving or not receiving other DMARDs and/or anti-inflammatory drugs and/or lipid-lowering or blood pressure-lowering drugs; discontinuation of therapy resulted in flare in some patients	• Continued therapy: no difference (baseline) • Discontinued therapy without flare: no difference (baseline) • Discontinued therapy with flare: decreased function (baseline)
Turiel, 2010 (REF.[115])	CFR	20 (52 years)	25 (50.5)	6.2 months	MTX and folic acid or adalimumab alone for 18 months	Increased endothelial function (baseline)
Ikonomidis, 2014 (REF.[81])	CFR	• CAD group: 60 patients (59.5) • No CAD group: 20 (58)	30 (57.1)	• 12 years (CAD group) • 11 years (no CAD group)	Anakinra added to DMARDs for 3 h in patients with and without CAD	• Increased endothelial function in both groups (baseline) • Patients with CAD had a greater increase in endothelial function from baseline than patients without CAD
Pieringer, 2010 (REF.[86])	SEVR	• 17 patients with RA (48.8) • 13 patients with AS (48.8)	35 (47.5)	10 years	Switch from conventional treatment to infliximab for 6 weeks	Increased endothelial function (baseline)
Other treatments						
Ormseth, 2014 (REF.[107])	PAT	34 (51)	–	n.i.	Pioglitazone added to DMARDs for 8 weeks	No difference (placebo group)
Marder, 2013 (REF.[106])	PAT	143 (55.5)	–	11 years	Pioglitazone added to DMARDs for 12 weeks	No difference (placebo group)
Tam, 2011 (REF.[108])	SEVR	• Rosuvastatin: 24 (54) • Placebo: 26 (55)	–	• 11.5 years (rosuvastatin) • 12.3 years (placebo)	Rosuvastatine added to DMARDs for 12 months	• Increased endothelial function (placebo group) • Increased endothelial function at 6 months but no difference at 12 months (baseline)
Metsios, 2014 (REF.[111])	LDi	36 (53)	–	6 years	Physical exercise added to DMARDs for 6 months	No difference at 3 months but increased endothelial function at 6 months (baseline)

AS, ankylosing spondylitis; CAD, coronary artery disease; CFR, coronary flow reserve; FbF, forearm blood flow; LDi, laser Doppler imaging; MTX, methotrexate; n.i., not indicated; PAT, peripheral arterial tonometry; RA, rheumatoid arthritis; SEVR, subendocardial viability ratio. [a]Patients with inflammatory arthritis. [b]Women-only cohort

compared with DMARD therapy alone[106,107] (TABLE 2). By contrast, the addition of the statin rosuvastatin to patients' ongoing DMARD therapy (methotrexate for 70% of patients) for 12 months improved their coronary endothelial function compared with the addition of placebo[108]. However, the increase in endothelial function from baseline was evident only at 6 months and not at 12 months[108]. Notably, statin therapy can impair the effectiveness of rituximab therapy[109], and therefore, drug interactions will be important to consider in the clinical management of cardiovascular risk of patients with RA[110]. In another study, DMARD-treated patients with RA who had moderate levels of disease activity were included in a 6-month programme of individualized exercise intervention (resistance and aerobic training)[111]. Compared with baseline function, 6 months (but not 3 months) of exercise improved microvascular endothelial function (measured by skin LDi). The change in aerobic capacity (measured by maximum oxygen consumption (VO_2 max)) but not CRP levels could predict changes in microvascular function. Of note, exercise simultaneously improved microvascular and macrovascular endothelial function. Thus, statins or exercise might be used as add-on therapies to improve microvascular endothelial function in DMARD-treated patients with RA, but more studies are needed to confirm these data.

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

Treatment durability and improving endothelial function. An important issue to resolve is whether the beneficial effect of therapy on microvascular function is durable in order to determine whether the vascular function has to be followed up by dedicated methods or whether the follow-up of disease activity is sufficient to monitor vascular health. In two studies, the addition of anti-TNF to conventional DMARD therapy improved endothelial function of the skin microvasculature at 2 weeks but not at 3 months compared with function at baseline[94,112] (similar to the transient effect observed with abatacept therapy[101], discussed above). Of interest, this transient effect was observable despite a sustained reduction in DAS28 and CRP levels. Notably, such a transient effect of add-on anti-TNF therapy has also been observed for macrovascular endothelial function[113]. Moreover, in a 2016 study of patients with RA who were in long-term remission[114], the patients receiving anti-TNF treatment had higher levels of arterial inflammation (as measured by ^{18}FDG–PET–CT imaging) than the patients receiving nonbiologic DMARD therapy. However, the available studies are limited by their short-term follow-up (not exceeding 6 months), and further longitudinal studies with a long-term follow-up (in years) of microvascular endothelial function are required.

As microvascular endothelial dysfunction is present early in the course of RA and as endothelial dysfunction is a reversible alteration of the endothelial phenotype, it is important to know whether antirheumatic intervention in early RA could sustainably reverse this condition. Only one study has been conducted to date to address this question[115]. In this study, the investigators demonstrated that in treatment-naive patients with early RA (disease duration of 6 months), treatment with methotrexate and folic acid (10 patients) or adalimumab (10 patients) for 18 months improved coronary microvascular function equally. More studies that investigate endothelial function in other microvascular beds and that have larger sample sizes are required to confirm these data. Importantly, an unresolved question is whether the early improvement of microvascular endothelial function translates into a reduction in cardiovascular morbidity and/or mortality.

In summary, the heterogeneous results of the available literature make it difficult to draw any definite conclusions about the effects of therapy on microvascular endothelial function in RA. Even though most studies have reported beneficial effects, whether these effects are drug specific, vascular-bed specific and/or related to disease activity is currently unknown. In addition, the great limitation of many studies is the lack of a comparison with healthy individuals, which makes it impossible to know whether the treatment only improved endothelial function or normalized endothelial function to that of healthy individuals. The two studies that did include healthy individuals had discrepant results. In one study, endothelial function improved in eight patients with RA following 11 days of treatment with various drugs (methotrexate, anti-TNF, leflunomide, triamcinolone or hydroxychloroquine), but their endothelial function remained lower than in healthy individuals[93]. By contrast, in another study[54], 6 months of treatment with various drugs (methotrexate, cyclophosphamide, low-dose glucocorticoids and NSAIDs) in treatment-naive patients with newly diagnosed RA normalized their endothelial function to that observed in healthy individuals. Thus, further studies are required to answer this question. Unravelling the pathophysiological mechanisms of microvascular dysfunction in preclinical studies is also important for the rational use of antirheumatic drugs for cardiovascular prevention.

Possible biomarkers

Most of the methods currently used for assessing microvascular endothelial function are either invasive, not automated or not suitable for routine use; hence, the identification of circulating biomarkers would be of great clinical interest (Supplementary Table 2).

Pro-inflammatory cytokines and other serum mediators. Given the suspected link between inflammation and endothelial dysfunction, investigators have looked at the association between pro-inflammatory cytokines and microvascular endothelial function. Some evidence indicates that circulating IL-1β[81] or TNF[74] levels correlate with microvascular endothelial function. Notably, the positive effects of anti-TNF or anti-IL-1Ra therapies on microvascular function suggest that these cytokines are not only markers but also mediators of microvascular endothelial dysfunction in RA. Levels of another pro-inflammatory cytokine, IL-6, correlated with endothelial function in a mixed cohort of patients with either RA or AS[68] but not in two cohorts of patients with RA[70,74]. IL-17 has a seminal role in the pathogenesis of RA, but data regarding the association between IL-17 and endothelial function are also controversial; no correlation was observed in one cohort of 87 patients with RA[116], whereas a negative correlation was observed in another cohort of 51 patients[58].

Various other serum mediators that are considered valuable markers of endothelial dysfunction in classical CVD have been evaluated. No association between microvascular endothelial function and ICAM1, VCAM1, thrombomodulin, E-selectin, von Willebrand factor or vascular endothelial growth factor (VEGF) levels has been observed in RA[70,83,85,100]. The probable explanation for this lack of correlation is that the upregulation of these mediators is not restricted to the microvascular beds in RA but also occurs at the inflamed joints and in cells other than endothelial cells.

Lipid levels and blood pressure. Dyslipidaemia is a well-known cardiovascular risk factor, implicating markers of lipid metabolism as potential biomarkers of endothelial dysfunction. However, whereas no correlation has been observed between microvascular endothelial function and levels of the lipoprotein(a)[100] (increased levels of which are associated with cardiovascular risk[117]), HDL cholesterol or triglycerides[82], a link has been reported between microvascular endothelial function and total cholesterol levels[82], LDL cholesterol levels[76] or serum adiponectin levels[97]. In regard to other cardiovascular risk factors, the presence of hypertension,

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

dyslipidaemia or insulin resistance was associated with lower microvascular endothelial function in a longitudinal study of patients with RA[65]. However, in another cohort of patients with RA, improvements in endothelial function following anti-TNF therapy did not correlate with changes in blood pressure levels[94]. Likewise, blood pressure levels have been associated with endothelial function in the skin microvasculature[90] but not in the coronary microvasculture[82]. The limitation of these studies, which were mostly cross-sectional, is that antirheumatic drugs and/or disease activity might induce changes in lipid metabolism or blood pressure, and some of the patients included in these studies were already receiving hypolipidaemic and/or antihypertensive drugs.

Dimethylarginines. The L-arginine analogues asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA) could be valuable markers of microvascular endothelial function. ADMA is a competitive inhibitor of nitric oxide synthase and thereby reduces nitric oxide production and promotes endothelial dysfunction. SDMA also interferes with nitric oxide production but does so indirectly by reducing the cellular availability of arginine. For these reasons, these two analogues emerged as new putative contributors and/or biomarkers of endothelial dysfunction in various CVDs[118–121].

Although neither coronary nor skin microvascular endothelial function correlated with ADMA[63,82] or SDMA levels[89,96] in various cohorts of patients with long-standing RA, one study did report an association between ADMA levels and coronary endothelial function in patients with early RA[69]. The ratio of ADMA to SDMA levels is a proposed index of dimethylaminohydrolase activity, which is the enzyme that degrades ADMA. Although this ratio did not correlate with microvascular endothelial function in patients from the DRACCO cohort[89,96], a possible explanation for the lack of association might be that whereas nitric oxide is the predominant mediator of endothelial function in the macrovascular beds, at the microvascular level, endothelium-derived EDHF is the predominant contributor[19]. Of interest, a correlation between SDMA or the ADMA to SDMA ratio and endothelial function was observed in a subgroup of patients from the DRACCO cohort who had high levels of inflammation (CRP >5 mg/dl, ESR >25 mm/h)[89,96], whereas no correlation existed in the patients with low levels of inflammation. This finding raises the question of whether SDMA levels and/or the ADMA to SDMA ratio are markers of disease activity, rather than endothelial dysfunction, in RA.

Markers of vascular oxidative stress. Enhanced vascular oxidative stress contributes to the pathogenesis of microvascular endothelial dysfunction[122]; hence, markers of vascular oxidative stress might be associated with endothelial dysfunction. Blood levels of nitrotyrosine (a cytotoxic oxidant produced following the reaction between nitric oxide and superoxide anion), malondialdehyde (a by-product of lipid peroxidation)[81] or myeloperoxidase (a peroxidase enzyme released in the blood by activated neutrophils)[76] are inversely correlated with microvascular endothelial function. Interestingly, in one study of 80 patients with RA[81], the lower coronary endothelial function observed in patients with CAD (compared with patients without CAD) was associated with a twofold increase in oxidative stress burden (indicated by levels of nitrotyrosine, malondialdehyde and protein carbonyls, which are biomarkers of protein oxidation induced by reactive oxygen species) and threefold higher serum levels of IL-1, despite both patient groups having similar disease activity scores. After anakinra treatment, coronary endothelial function improved and oxidative stress levels decreased in all patients, but the effect was greater in patients with CAD than in patients without CAD. Unfortunately, this study was not designed to determine the predictive value of these biological markers on changes in endothelial function.

Other potential markers. Autoantibodies are potential markers of endothelial dysfunction, as immune activation, reflected by the presence of autoantibodies, is considered an important nonmodifiable risk factor for CVD in RA[57]. However, the limited data available on this link are conflicting; for example, the presence of anti-CCP or IgM rheumatoid factor is associated[123] or not associated[90] with microvascular endothelial dysfunction in different cohorts of patients with RA. One study reported that 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) levels positively correlated with endothelial function, but this evaluation was restricted to a cohort of vitamin D-deficient patients with RA[116]. In other studies, endothelial function was correlated with plasma viscosity (a marker of inflammation)[91] but not with soluble cartilage oligomeric matrix protein (a marker of progression of joint tissue damage)[99].

In conclusion, the current data suggest that neither the classical markers of systemic inflammation nor the traditional markers of CVD (such as markers of endothelial activation, ADMA or SDMA) are useful for diagnosing or predicting microvascular endothelial dysfunction in RA. Data regarding IL-1β or TNF levels and oxidative stress markers are promising. As the available studies were not specifically designed to investigate the value of the aforementioned factors in the diagnosis, stratification and prediction of microvascular endothelial dysfunction and its cardiovascular consequences, large prospective studies that investigate the value of several markers alone or in combination are required.

Preclinical animal studies

The difficulty in drawing clear conclusions about the role of microvascular endothelial dysfunction in RA is due to the great heterogeneity of the clinical studies studying this process in regard to disease duration, age and sex and the high level of medication of the included patients, who take both antirheumatic and other drugs (such as aspirin or antihypertensive, antidiabetic or hypocholesterolaemic drugs), which all have the potential to affect endothelial function. Such biases, which are difficult to avoid in clinical studies,

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

are not present when using animal models of arthritis. Therefore, preclinical studies might be helpful to disentangle some complex features of microvascular endothelial dysfunction in RA.

Although animal studies investigating macrovascular endothelial dysfunction are quite numerous (reviewed elsewhere[124]), studies of microvascular endothelial dysfunction are very limited. In a model of collagen-induced arthritis in sheep, both the digital and coronary arteries exhibited endothelial dysfunction[125], and treatment with mesenchymal precursor cells to prevent systemic inflammation reduced the development of endothelial dysfunction in the two vascular beds[126]. This study suggests that assessment of endothelial dysfunction in the peripheral arteries is a good predictor of coronary endothelial dysfunction in RA. In a study conducted in the rat adjuvant-induced arthritis model, microvascular endothelial dysfunction (assessed in the mesenteric arteries) occurred earlier than macrovascular endothelial dysfunction (assessed in the aorta) in the course of the disease[127]. Moreover, ICAM1, VCAM1 and CRP levels did not correlate with microvascular endothelial dysfunction in this model. Of interest, the investigators demonstrated that in the chronic phase of the adjuvant-induced arthritis model (when clinical inflammation has resolved), microvascular endothelial dysfunction persisted, whereas macrovascular endothelial dysfunction was no longer present. Thus, these data suggested that RA has a vascular-bed-dependent effect on vascular function and that distinct mechanisms are involved. These data also indicate that these animal models could be useful for unravelling the pathophysiological features of microvascular dysfunction in RA.

Future directions

Many gaps in our knowledge still exist regarding microvascular endothelial dysfunction in RA (BOX 2). Even though the available data indicate the presence of microvascular endothelial dysfunction in early and long-standing RA, the clinical relevance of these findings remains to be established in prospective longitudinal studies.

According to the latest EULAR recommendations[128], cardiovascular risk management should be performed by the rheumatologist and include the use of cardiovascular risk prediction models (such as the SCORE algorithm) as well as the screening for subclinical atherosclerotic plaques and cIMT by carotid ultrasonography. However, the existing cardiovascular risk prediction models developed for the general population are acknowledged to inaccurately estimate the cardiovascular risk in patients with RA[129,130], and

Box 2 | **Remaining questions to resolve on microvascular endothelial dysfunction in RA**

A number of questions remain regarding the role of microvascular endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis (RA).

Does microvascular endothelial dysfunction precede macrovascular endothelial dysfunction and remodelling?

- Longitudinal studies can be used to investigate the timing of microvascular endothelial dysfunction. Such studies should measure microvascular endothelial dysfunction, macrovascular endothelial dysfunction and indices of remodelling (augmentation index (AIx) and carotid intima-media thickness (cIMT)) in patients with RA and in healthy individuals.

Does microvascular endothelial function measured in the peripheral vascular beds correlate with coronary endothelial function?

- Cross-sectional studies that investigate the correlation between microvascular endothelial function in the peripheral beds (measured by automatized methods) and coronary endothelial function (as assessed by coronary flow reserve) in patients with RA should help answer this question.
- Preclinical studies in animal models of chronic arthritis (alongside a non-arthritis control group) that study vascular reactivity in isolated coronary arteries and peripheral arteries at different stages of the disease should also provide insight into whether endothelial functions in these two vascular beds are connected.

Is RA clinical remission synonymous with microvascular endothelial dysfunction remission?

- The relationship between clinical remission of RA and endothelial dysfunction remission can be explored in interventional, longitudinal studies (preferably of large cohorts of patients with RA) that investigate the effect of antirheumatic drugs on microvascular endothelial function, disease activity and putative biomarkers of microvascular endothelial dysfunction and have a long-term follow-up (>5 years).
- Preclinical studies in animal models that look at the dose effects of drugs (alone or in combination) on microvascular endothelial function compared with placebo should also provide further insight to help answer this question.

Does microvascular endothelial dysfunction predict cardiovascular events?

- This question can be addressed with large longitudinal prospective studies of patients with RA who do not have cardiovascular disease that investigate the prognostic and stratification value of microvascular endothelial dysfunction measured in early RA and coronary and cerebrovascular events 5–10 years later. Such studies could include comparisons of endothelial dysfunction measured by flow-mediated dilation, AIx or cIMT and cardiovascular risk prediction scores.

What are the specific mechanisms involved in microvascular endothelial dysfunction?

- Preclinical in vitro and in vivo studies should be useful for identifying the relevant microvascular targets specific to RA.

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

carotid plaques reflect structural abnormalities of the macrovasculature that occur after the development of macrovascular endothelial dysfunction. In this context, the measurement of microvascular endothelial dysfunction might be an early predictor of future cardiovascular events and/or a good predictor of cardiovascular events that are specifically linked to microvascular endothelial dysfunction, such as myocardial ischaemia in the absence of obstructive coronary disease or stroke. Longitudinal studies that measure microvascular endothelial function, macrovascular function, morphology markers (cIMT and AIx) and cardiovascular risk prediction scores in the same cohort are required. Likewise, whether the development of microvascular endothelial dysfunction precedes that of macrovascular endothelial dysfunction has to be clearly established in dedicated studies to identify the vascular window of opportunity in RA.

In the general population, the assessment of endothelial dysfunction in peripheral vascular beds is more easily accessible than the coronary beds and hence more feasible to measure in clinical practice. Therefore, an important issue to resolve is whether the measurement of peripheral microvascular endothelial dysfunction predicts future cardiovascular events. Likewise, dysfunction of the cerebral arteries is involved in stroke or cognitive impairments[131]; however, only one study to date has focused on the cerebrovascular bed and showed impaired cerebral circulation in RA[132], and hence, more studies of cerebral endothelial function are required.

The identification of specific circulating biomarkers of microvascular endothelial dysfunction will likely be very challenging. As several genetic factors have been reported to influence macrovascular endothelial function and cardiovascular risk in RA[133], it would be of interest to determine whether such markers might reflect endothelial dysfunction in the microvasculature. However, the direct measurement of endothelial dysfunction by a non-invasive and easy-to-handle method is of particular interest to identify patients at high risk of CVD.

Conclusions

Patients with RA are at high risk of cardiovascular morbidity and mortality. This heightened risk of CVD is reflected by the occurrence of early endothelial dysfunction, even in the absence of detectable atherosclerosis, in both the microvasculature and macrovasculature[6]. Whereas macrovascular endothelial dysfunction is acknowledged as the main contributor to atherogenesis of the large arteries, growing evidence suggests that in many typical CVDs, microvascular endothelial dysfunction is a warning signal that precedes and predicts the development of conduit artery atherosclerosis and cardiovascular risk factors[11]. As a consequence, microvascular endothelial dysfunction seems to be a potential surrogate marker of cardiovascular risk in addition to a target for treatments aiming to reduce cardiovascular morbidity and mortality in RA.

Despite its importance for the rheumatology community, the limitations of current studies of microvascular endothelial dysfunction in RA (such as their cross-sectional design, small sample size and heterogeneity in patients analysed) mean that no definite conclusions can be made on the link between microvascular endothelial dysfunction and inflammation. Although chronic inflammation is probably involved in the pathogenesis of accelerated microvascular endothelial dysfunction, the available data suggest that achieving remission in RA does not guarantee normalization of microvascular endothelial function. Hence, the concept of microvascular endothelial-function-guided therapy deserves attention. In addition, whether the positive effect of certain drugs on microvascular endothelial dysfunction is long lasting is unclear. Likewise, the discrepancies between the effects of different antirheumatic drugs on microvascular endothelial dysfunction suggest the existence of mechanisms of microvascular endothelial dysfunction that are specific to RA. Mechanistic animal studies might help to answer these questions and identify unique therapeutic targets for treating microvascular endothelial dysfunction in RA.

Published online: 31 May 2018

1. Giles, J. T. Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: current perspectives on assessing and mitigating risk in clinical practice. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **29**, 597–613 (2015).
2. López-Mejías, R. et al. Cardiovascular risk assessment in patients with rheumatoid arthritis: The relevance of clinical, genetic and serological markers. *Autoimmun. Rev.* **15**, 1013–1030 (2016).
3. Avina-Zubieta, J. A., Thomas, J., Sadatsafavi, M., Lehman, A. J. & Lacaille, D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 1524–1529 (2012).
4. van Halm, V. P. et al. Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease: a cross-sectional study, the CARRE Investigation. *Ann. Rheum. Dis.* **68**, 1395–1400 (2009).
5. del Rincón, I. D., Williams, K., Stern, M. P., Freeman, G. L. & Escalante, A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum.* **44**, 2737–2745 (2001).
6. Holmqvist, M. E. et al. Rapid increase in myocardial infarction risk following diagnosis of rheumatoid arthritis amongst patients diagnosed between 1995 and 2006. *J. Intern. Med.* **268**, 578–585 (2010).
7. Kaplan, M. J. Cardiovascular complications of rheumatoid arthritis: assessment, prevention, and treatment. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **36**, 405–426 (2010).
8. van den Hoek, J. et al. Mortality in patients with rheumatoid arthritis: a 15-year prospective cohort study. *Rheumatol. Int.* **37**, 487–493 (2017).
9. Prati, C., Demougeot, C., Guillot, X., Godfrin-Valnet, M. & Wendling, D. Endothelial dysfunction in joint disease. *Joint Bone Spine* **81**, 386–391 (2014).
10. Daiber, A. et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 1591–1619 (2016).
11. Gutterman, D. D. et al. The human microcirculation: regulation of flow and beyond. *Circ. Res.* **118**, 157–172 (2016).
12. Moroni, L., Selmi, C., Angelini, C. & Meroni, P. L. Evaluation of endothelial function by flow-mediated dilation: a comprehensive review in rheumatic disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **65**, 463–475 (2017).
13. Kotani, K., Miyamoto, M. & Ando, H. The effect of treatments for rheumatoid arthritis on endothelial dysfunction evaluated by flow-mediated vasodilation in patients with rheumatoid arthritis. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **15**, 10–18 (2017).
14. Gonzalez-Gay, M. A., Gonzalez-Juanatey, C., Vazquez-Rodriguez, T. R., Martin, J. & Llorca, J. Endothelial dysfunction, carotid intima-media thickness, and accelerated atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* **38**, 67–70 (2008).
15. Haller, H. Endothelial function. General considerations. *Drugs* **53** (Suppl. 1), 1–10 (1997).
16. Kimura, K. et al. Diversity and variability of smooth muscle phenotypes of renal arterioles as revealed by myosin isoform expression. *Kidney Int.* **48**, 372–382 (1995).
17. Napoli, C. et al. Efficacy and age-related effects of nitric oxide-releasing aspirin on experimental restenosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 1689–1694 (2002).
18. Takahashi, M., Ishida, T., Traub, O., Corson, M. A. & Berk, B. C. Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress. *J. Vasc. Res.* **34**, 212–219 (1997).
19. Triggle, C. R. & Ding, H. The endothelium in compliance and resistance vessels. *Front. Biosci. Sch. Ed.* **3**, 730–744 (2011).
20. Matsuzawa, Y. & Lerman, A. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis, and treatment. *Coron. Artery Dis.* **25**, 713–724 (2014).
21. Liao, J. K. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J. Clin. Invest.* **123**, 540–541 (2013).

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

22. Linder, L., Kiowski, W., Bühler, F. R. & Lüscher, T. F. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. *Circulation* **81**, 1762–1767 (1990).
23. Panza, J. A., Quyyumi, A. A., Brush, J. E. & Epstein, S. E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* **323**, 22–27 (1990).
24. Treasure, C. B. et al. Epicardial coronary artery responses to acetylcholine are impaired in hypertensive patients. *Circ. Res.* **71**, 776–781 (1992).
25. Calver, A., Collier, J. & Vallance, P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-ependent diabetes. *J. Clin. Invest.* **90**, 2548–2554 (1992).
26. Cosentino, F. et al. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* **107**, 1017–1023 (2003).
27. Mäkimattila, S. et al. Chronic hyperglycemia impairs endothelial function and insulin sensitivity via different mechanisms in insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* **94**, 1276–1282 (1996).
28. Steinberg, H. O. et al. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **97**, 2601–2610 (1996).
29. Casino, P. R., Kilcoyne, C. M., Quyyumi, A. A., Hoeg, J. M. & Panza, J. A. The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. *Circulation* **88**, 2541–2547 (1993).
30. Spieker, L. E. et al. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* **105**, 1399–1402 (2002).
31. Hamburg, N. M. et al. Relation of brachial and digital measures of vascular function in the community: the Framingham heart study. *Hypertension* **57**, 390–396 (2011).
32. Sitia, S. et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun. Rev.* **9**, 830–834 (2010).
33. Kieda, C. Heterogeneity of endothelial cells — role in vessel specialization and cooperation in vasculogenic mimicry. *Postepy Biochem.* **59**, 372–378 (2013).
34. Geiger, M., Stone, A., Mason, S. N., Oldham, K. T. & Guice, K. S. Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **273**, L275–L281 (1997).
35. Gerritsen, M. E., Niedbala, M. J., Szczepanski, A. & Carley, W. W. Cytokine activation of human macro- and microvessel-derived endothelial cells. *Blood Cells* **19**, 325–339 (1993).
36. Sumagin, R. & Sarelius, I. H. Emerging understanding of roles for arterioles in inflammation. *Microcirculation* **20**, 679–692 (2013).
37. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium. I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* **100**, 158–173 (2007).
38. Stokes, K. Y. & Granger, D. N. The microcirculation: a motor for the systemic inflammatory response and large vessel disease induced by hypercholesterolaemia? *J. Physiol.* **562**, 647–653 (2005).
39. Anderson, T. J. et al. Microvascular function predicts cardiovascular events in primary prevention: long-term results from the Firefighters and Their Endothelium (FATE) study. *Circulation* **123**, 163–169 (2011).
40. Lind, L., Berglund, L., Larsson, A. & Sundström, J. Endothelial function in resistance and conduit arteries and 5-year risk of cardiovascular disease. *Circulation* **123**, 1545–1551 (2011).
41. Reis, S. E. et al. Coronary microvascular dysfunction is highly prevalent in women with chest pain in the absence of coronary artery disease: results from the NHLBI WISE study. *Am. Heart J.* **141**, 735–741 (2001).
42. von Mering, G. O. et al. Abnormal coronary vasomotion as a prognostic indicator of cardiovascular events in women: results from the National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *Circulation* **109**, 722–725 (2004).
43. Flammer, A. J. et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* **126**, 753–767 (2012).
44. Vizzardi, E. et al. Noninvasive assessment of endothelial function: the classic methods and the new peripheral arterial tonometry. *J. Investig. Med.* **62**, 856–864 (2014).
45. Lockhart, C. J., Hamilton, P. K., Quinn, C. E. & McVeigh, G. E. End-organ dysfunction and cardiovascular outcomes: the role of the microcirculation. *Clin. Sci.* **116**, 175–190 (2009).
46. Chantler, P. D. & Frisbee, J. C. Arterial function in cardio-metabolic diseases: from the microcirculation to the large conduits. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **57**, 489–496 (2015).
47. Anderson, T. J. & Phillips, S. A. Assessment and prognosis of peripheral artery measures of vascular function. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **57**, 497–509 (2015).
48. Lekakis, J. et al. Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **18**, 775–789 (2011).
49. Bourdarias, J. P. Coronary reserve: concept and physiological variations. *Eur. Heart J.* **16** (Suppl. 1), 2–6 (1995).
50. Al Mheid, I. et al. Vitamin D status is associated with arterial stiffness and vascular dysfunction in healthy humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* **58**, 186–192 (2011).
51. Rammos, C. et al. Macrophage migration inhibitory factor is associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal disease. *Int. J. Cardiol.* **168**, 5249–5256 (2013).
52. Secrest, A. M., Prince, C. T., Costacou, T., Miller, R. G. & Orchard, T. J. Predictors of and survival after incident stroke in type 1 diabetes. *Diab. Vasc. Dis. Res.* **10**, 3–10 (2013).
53. Gonzalez-Juanatey, C. et al. HLA-DRB1 status affects endothelial function in treated patients with rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.* **114**, 647–652 (2003).
54. Bergholm, R. et al. Impaired responsiveness to NO in newly diagnosed patients with rheumatoid arthritis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 1637–1641 (2002).
55. Palomino-Morales, R. et al. A1298C polymorphism in the *MTHFR* gene predisposes to cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R71 (2010).
56. Palomino-Morales, R. et al. Interleukin-6 gene -174 promoter polymorphism is associated with endothelial dysfunction but not with disease susceptibility in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **27**, 964–970 (2009).
57. Liang, K. P. et al. Autoantibodies and the risk of cardiovascular events. *J. Rheumatol.* **36**, 2462–2469 (2009).
58. Marder, W. et al. Interleukin 17 as a novel predictor of vascular function in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1550–1555 (2011).
59. Amaya-Amaya, J. et al. Novel risk factors for cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Immunol. Res.* **56**, 267–286 (2013).
60. Fenton, S. A. M. et al. Sitting time is negatively related to microvascular endothelium-dependent function in rheumatoid arthritis. *Microvasc. Res.* **117**, 57–60 (2018).
61. Roubille, C. et al. 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.* **74**, 480–489 (2015).
62. Arosio, E. et al. Forearm haemodynamics, arterial stiffness and microcirculatory reactivity in rheumatoid arthritis. *J. Hypertens.* **25**, 1273–1278 (2007).
63. Sandoo, A. et al. Lack of association between asymmetric dimethylarginine and in vivo microvascular and macrovascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **30**, 388–396 (2012).
64. Sandoo, A., Kitas, G. D., Carroll, D. & Veldhuijzen van Zanten, J. J. C. S. 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.* **14**, R117 (2012).
65. Sandoo, A. et al. Classical cardiovascular disease risk factors associate with vascular function and morphology in rheumatoid arthritis: a six-year prospective study. *Arthritis Res. Ther.* **15**, R203 (2013).
66. Sandoo, A., Carroll, D., Metsios, G. S., Kitas, G. D. & Veldhuijzen van Zanten, J. J. The association between microvascular and macrovascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R99 (2011).
67. Faccini, A., Kaski, J. C. & Camici, P. G. Coronary microvascular dysfunction in chronic inflammatory rheumatoid diseases. *Eur. Heart J.* **37**, 1799–1806 (2016).
68. Klimek, E. et al. Alterations in skin microvascular function in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **65**, 77–91 (2017).
69. Turiel, M. et al. Non-invasive assessment of coronary flow reserve and ADMA levels: a case-control study of early rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology* **48**, 834–839 (2009).
70. Foster, W., Lip, G. Y. H., Raza, K., Carruthers, D. & Blann, A. D. An observational study of endothelial function in early arthritis. *Eur. J. Clin. Invest.* **42**, 510–516 (2012).
71. van Eijk, I. C., Serné, E. H., Dijkmans, B. A. C., Smulders, Y. & Nurmohamed, M. Microvascular function is preserved in newly diagnosed rheumatoid arthritis and low systemic inflammatory activity. *Clin. Rheumatol.* **30**, 1113–1118 (2011).
72. Verhoeven, F. et al. Glucocorticoids improve endothelial function in rheumatoid arthritis: a study in rats with adjuvant-induced arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* **188**, 208–218 (2017).
73. Verhoeven, F. et al. Diclofenac but not celecoxib improves endothelial function in rheumatoid arthritis: a study in adjuvant-induced arthritis. *Atherosclerosis* **266**, 136–144 (2017).
74. 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.* **62**, 630–634 (2003).
75. Hänsel, S., Lässig, G., Pistrosch, F. & Passauer, J. Endothelial dysfunction in young patients with long-term rheumatoid arthritis and low disease activity. *Atherosclerosis* **170**, 177–180 (2003).
76. Mäki-Petäjä, K. M. et al. Inducible nitric oxide synthase activity is increased in patients with rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction. *Int. J. Cardiol.* **129**, 399–405 (2008).
77. Alomari, M. A. et al. Vascular function and handgrip strength in rheumatoid arthritis patients. *ScientificWorldJournal* **2012**, 580863 (2012).
78. Ciftci, O. et al. Impaired coronary microvascular function and increased intima-media thickness in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* **198**, 332–337 (2008).
79. Recio-Mayoral, A. et al. Chronic inflammation and coronary microvascular dysfunction in patients without risk factors for coronary artery disease. *Eur. Heart J.* **30**, 1837–1843 (2009).
80. Kakuta, K. et al. Chronic inflammatory disease is an independent risk factor for coronary flow velocity reserve impairment unrelated to the processes of coronary artery calcium deposition. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **29**, 173–180 (2016).
81. Ikonomidis, I. et al. Increased benefit of interleukin 1 inhibition on vascular function, myocardial deformation, and twisting in patients with coronary artery disease and coexisting rheumatoid arthritis. *Circ. Cardiovasc. Imag.* **7**, 619–628 (2014).
82. Anyfanti, P. et al. Subendocardial viability ratio in patients with rheumatoid arthritis: comparison with healthy controls and identification of prognostic factors. *Clin. Rheumatol.* **36**, 1229–1236 (2017).
83. Foster, W., Carruthers, D., Lip, G. Y. H. & Blann, A. D. Inflammation and microvascular and macrovascular endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: effect of treatment. *J. Rheumatol.* **37**, 711–716 (2010).
84. Provan, S. A. et al. Remission is the goal for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional comparative study. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 812–817 (2011).
85. Santos, M. J. et al. Early vascular alterations in SLE and RA patients — a step towards understanding the associated cardiovascular risk. *PLoS ONE* **7**, e44668 (2012).
86. Pieringer, H., Stuby, U., Pohanka, E. & Biesenbach, G. Augmentation index in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis treated with infliximab. *Clin. Rheumatol.* **29**, 723–727 (2010).
87. Pieringer, H. et al. Heart rate, ejection duration and subendocardial viability ratio in patients with rheumatoid arthritis as compared to controls. *Int. J. Rheum. Dis.* **17**, 39–43 (2014).
88. Heffernan, K. S., Karas, R. H., Patvardhan, E. A., Jafri, H. & Kuvin, J. T. Peripheral arterial tonometry for risk stratification in men with coronary artery disease. *Clin. Cardiol.* **33**, 94–98 (2010).
89. Dimitroulas, T., Sandoo, A., Hodson, J., Smith, J. P. & Kitas, G. D. In vivo microvascular and macrovascular

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

endothelial function is not associated with circulating dimethylarginines in patients with rheumatoid arthritis: a prospective analysis of the DRACCO cohort. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **76**, 331–337 (2016).
90. Galarraga, B., Khan, F., Kumar, P., Pullar, T. & Belch, J. J. F. C-reactive protein: the underlying cause of microvascular dysfunction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **47**, 1780–1784 (2008).
91. Galarraga, B., Belch, J. J. F., 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.* **37**, 521–528 (2010).
92. Shrivastava, A. K., Singh, H. V., Raizada, A. & Singh, S. K. C-Reactive protein, inflammation and coronary heart disease. *Egypt. Heart J.* **67**, 89–97 (2015).
93. Datta, D., Ferrell, W. R., Sturrock, R. D., Jadhav, S. T. & Sattar, N. Inflammatory suppression rapidly attenuates microvascular dysfunction in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* **192**, 391–395 (2007).
94. Sandoo, A. et al. Anti-TNFα therapy may lead to blood pressure reductions through improved endothelium-dependent microvascular function in patients with rheumatoid arthritis. *J. Hum. Hypertens.* **25**, 699–702 (2011).
95. Toutouzas, K. et al. Myocardial ischaemia without obstructive coronary artery disease in rheumatoid arthritis: hypothesis-generating insights from a cross-sectional study. *Rheumatology* **52**, 76–80 (2013).
96. Dimitroulas, T., Hodson, J., Sandoo, A., Smith, J. & Kitas, G. D. Endothelial injury in rheumatoid arthritis: a crosstalk between dimethylarginines and systemic inflammation. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 32 (2017).
97. 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.* **17**, 385–390 (2007).
98. Rongen, G. A. et al. Vasodilator function worsens after cessation of tumour necrosis factor inhibitor therapy in patients with rheumatoid arthritis only if a flare occurs. *Clin. Rheumatol.* **37**, 909–916 (2018).
99. Hjeltnes, G. et al. Relations of serum COMP to cardiovascular risk factors and endothelial function in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate and TNF-α inhibitors. *J. Rheumatol.* **39**, 1341–1347 (2012).
100. Hjeltnes, G. et al. Serum levels of lipoprotein(a) and E-selectin are reduced in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate or methotrexate in combination with TNF-α-inhibitor. *Clin. Exp. Rheumatol.* **31**, 415–421 (2013).
101. Sandoo, A. & Kitas, G. D. The impact of abatacept treatment on the vasculature in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **33**, 589 (2015).
102. Ruiz-Limón, P. et al. Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation. *Transl Res.* **183**, 87–103 (2017).
103. Petersons, C. J. et al. Low dose prednisolone and insulin sensitivity differentially affect arterial stiffness and endothelial function: An open interventional and cross-sectional study. *Atherosclerosis* **258**, 34–39 (2017).
104. Radhakutty, A. et al. Effect of acute and chronic glucocorticoid therapy on insulin sensitivity and postprandial vascular function. *Clin. Endocrinol.* **84**, 501–508 (2016).
105. Verhoeven, F., Prati, C., Maguin-Gaté, K., Wendling, D. & Demougeot, C. Glucocorticoids and endothelial function in inflammatory diseases: focus on rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 258 (2016).
106. Marder, W. et al. The peroxisome proliferator activated receptor-γ pioglitazone improves vascular function and decreases disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J. Am. Heart Assoc.* **2**, e000441 (2013).
107. Ormseth, M. J. et al. Reversing vascular dysfunction in rheumatoid arthritis: improved augmentation index but not endothelial function with peroxisome proliferator–activated receptor γ agonist therapy. *Arthritis Rheumatol.* **66**, 2331–2338 (2014).
108. Tam, L.-S. et al. Effects of rosuvastatin on subclinical atherosclerosis and arterial stiffness in rheumatoid arthritis: a randomized controlled pilot trial. *Scand. J. Rheumatol.* **40**, 411–421 (2011).
109. Arts, E. E. A. et al. Statins inhibit the antirheumatic effects of rituximab in rheumatoid arthritis: results from the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring (DREAM) registry. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 877–878 (2011).
110. Crowson, C. S. et al. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease. *Am. Heart J.* **166**, 622–628. e1 (2013).
111. Metsios, G. S. et al. Individualised exercise improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 748–751 (2014).
112. Sandoo, A., van Zanten, J. J., Toms, T. E., Carroll, D. & Kitas, G. D. Anti-TNFα therapy transiently improves high density lipoprotein cholesterol levels and microvascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *BMC Musculoskelet. Disord.* **13**, 127 (2012).
113. Gonzalez-Juanatey, C. et al. Active but transient improvement of endothelial function in rheumatoid arthritis patients undergoing long-term treatment with anti-tumor necrosis factor alpha antibody. *Arthritis Rheum.* **51**, 447–450 (2004).
114. Bernelot Moens, S. J. et al. Unexpected arterial wall and cellular inflammation in patients with rheumatoid arthritis in remission using biological therapy: a cross-sectional study. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 115 (2016).
115. Turiel, M. et al. Effects of long-term disease-modifying antirheumatic drugs on endothelial function in patients with early rheumatoid arthritis. *Cardiovasc. Ther.* **28**, e53–64 (2010).
116. Ranganathan, P. et al. Vitamin D deficiency, interleukin 17, and vascular function in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **40**, 1529–1534 (2013).
117. Nordestgaard, B. G. et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur. Heart J.* **31**, 2844–2853 (2010).
118. Fleck, C., Schweitzer, F., Karge, E., Busch, M. & Stein, G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clin. Chim. Acta* **336**, 1–12 (2003).
119. Zsuga, J. et al. Dimethylarginines at the crossroad of insulin resistance and atherosclerosis. *Metabolism* **56**, 394–399 (2007).
120. Kiechl, S. et al. Asymmetric and symmetric dimethylarginines are of similar predictive value for cardiovascular risk in the general population. *Atherosclerosis* **205**, 261–265 (2009).
121. Mangiacapra, F. et al. Relationship of asymmetric dimethylarginine (ADMA) with extent and functional severity of coronary atherosclerosis. *Int. J. Cardiol.* **220**, 629–633 (2016).
122. Vitiello, L. et al. Microvascular inflammation in atherosclerosis. *IJC Metab. Endocr.* **3**, 1–7 (2014).
123. Hjeltnes, G. et al. Anti-CCP and RF IgM: predictors of impaired endothelial function in rheumatoid arthritis patients. *Scand. J. Rheumatol.* **40**, 422–427 (2011).
124. 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.* **16**, 202 (2014).
125. Dooley, L. M. et al. Endothelial dysfunction in an ovine model of collagen-induced arthritis. *J. Vasc. Res.* **51**, 90–101 (2014).
126. Dooley, L. M. et al. Effect of mesenchymal precursor cells on the systemic inflammatory response and endothelial dysfunction in an ovine model of collagen-induced arthritis. *PLoS ONE* **10**, e0124144 (2015).
127. Totoson, P. et al. Microvascular abnormalities in adjuvant-induced arthritis: relationship to macrovascular endothelial function and markers of endothelial activation. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 1203–1213 (2015).
128. Agca, R. et al. EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 17–28 (2017).
129. Gómez-Vaquero, C. et al. SCORE and REGICOR function charts underestimate the cardiovascular risk in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **15**, R91 (2013).
130. Arts, E. E. A. et al. Prediction of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: performance of original and adapted SCORE algorithms. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 674–680 (2016).
131. Kalaria, R. N. Cerebrovascular disease and mechanisms of cognitive impairment: evidence from clinicopathological studies in humans. *Stroke* **43**, 2526–2534 (2012).
132. Oláh, C. et al. Assessment of intracranial vessels in association with carotid atherosclerosis and brain vascular lesions in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 213 (2017).
133. Rodriguez-Rodriguez, L. et al. Rheumatoid arthritis: genetic variants as biomarkers of cardiovascular disease. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 182–201 (2015).

Author contributions
C.D. and R.B. researched data for the article and wrote the article. C.D. provided substantial contribution to the discussion of its content. All authors reviewed and/or edited the article before submission.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Publisher's note
Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary information
Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41584-018-0022-8.

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

Partie 2 : Travaux personnels

1. Objectifs de la thèse

Les données de la littérature présentées précédemment montrent une implication d'une DE jouant un rôle prépondérant dans le risque CV du patient PR, mais suggèrent que des différences existent selon le lit vasculaire considéré, en termes de cinétique d'apparition de la DE, de mécanismes ou de réponse aux traitements. Alors que l'impact positif des bDMARDS au niveau de la DE est bien étayé [359,407], l'effet du MTX, qui est le traitement de référence de la PR, présente des divergences dans la littérature [313,408]. De plus, alors que des études expérimentales sur modèle animal de rat AIA ont permis de bien caractériser les mécanismes impliqués dans la DE aortique [382,383], les mécanismes qui sous-tendent les atteintes de la circulation coronaire et cérébrale, deux territoires cliniquement pertinents chez le patient PR, sont inconnus.

Ce travail de thèse a eu pour objectifs de caractériser les effets du MTX sur la DE au niveau de l'aorte (artère de conductance), et de caractériser la DE au niveau des artères cérébrales et coronaires dans le modèle AIA. Le choix du modèle AIA est guidé par les travaux antérieurs du laboratoire qui montrent la présence d'une DE aortique mais également microvasculaire trois semaines après le début de l'arthrite [382,383,386].

La première étude a eu pour but de déterminer l'effet du MTX sur la fonction endothéliale aortique et de comprendre les mécanismes impliqués dans les effets observés.

Cette étude a fait l'objet d'une publication acceptée dans *Clinical and Experimental Rheumatology* en 2019 (facteur d'impact 3,201).

La deuxième étude a eu pour but d'explorer la fonction endothéliale des artères cérébrales moyennes, de caractériser les mécanismes impliqués, puis d'étudier l'effet d'un traitement chronique par inhibiteur d'arginase sur la DE cérébrale.

Cette étude a fait l'objet d'une publication acceptée dans *Translational Stroke Research* en 2019 (facteur d'impact 8,266).

La troisième étude a eu pour but de déterminer la pertinence du modèle AIA pour mimer la DE coronaire et la susceptibilité augmentée à l'ischémie cardiaque du patient PR.

Cette étude fait l'objet d'un manuscrit à soumettre.

2 Travaux personnels

2.1 1ère étude

Le méthotrexate n'améliore pas la fonction endothéliale dans la polyarthrite rhumatoïde : étude chez le modèle rat d'arthrite induite à l'adjuvant

Article publié dans *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2019; 37: 81-88 (FI : 3,201)

2.1.1 Contexte et objectifs

Comme précédemment mentionné, le patient PR, comparé à la population générale, présente une mortalité CV augmentée secondaire à une DE. Cette dernière apparaît donc comme une cible pertinente pour réduire le risque CV du patient PR. Les DMARDs, par leurs effets anti-inflammatoires, pourraient être des traitements efficaces pour réduire cette DE. Une méta-analyse récente montre que le MTX, traitement de fond de première intention de la PR, permet de réduire le risque de survenue d'incidents CV de 28 % [197], mais les mécanismes impliqués dans ses effets bénéfiques ne sont pas connus, notamment l'effet du MTX sur la DE.

En effet, l'équipe d'Hänsel *et al.* rapporte la persistance d'une DE chez des patients PR pourtant efficacement traités par MTX [408], ce qui a été confirmé par deux autres études ne montrant pas d'amélioration de la FMD en cas de PR efficacement traitée par MTX [311,348]. En revanche, d'autres études rapportent une amélioration de la DE par traitement au MTX chez des patients PR [313,409]. De plus, il a été montré que le MTX diminuait l'expression endothéliale des E-sélectines et des ICAM-1 [343].

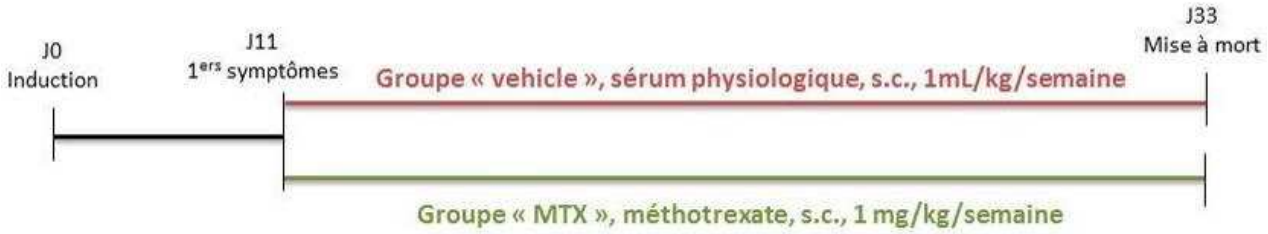
Aucune donnée n'est disponible dans des modèles animaux de PR. Les rares études qui se sont intéressées à l'effet du MTX sur la fonction endothéliale ont été conduites sur des animaux non-arthritiques. Elles rapportent un effet délétère du MTX [410,411], via l'inhibition de la régénération de

la BH_4 [412]. C'est pourquoi notre étude a eu pour but d'étudier les effets endothéliaux et les mécanismes impliqués lors d'un traitement curatif par MTX dans le modèle de rat AIA.

2.1.2 Méthodologie

Les expériences ont été menées chez des rats AIA, qui ont été traités dès l'apparition des symptômes 11 jours après l'induction par :

- méthotrexate, par voie sous-cutanée, à dose de 1 mg/kg/semaine pendant 21 jours, nommé groupe « MTX » ;
- sérum physiologique, par voie sous-cutanée, à dose de 1 mL/kg/semaine pendant 21 jours, nommé groupe « Vehicle ».



A J33, l'aorte thoracique a été prélevée pour étudier la fonction endothéliale sur anneaux d'aorte isolés, *via* l'étude de la relaxation à l'acétylcholine. L'étude des mécanismes impliqués dans les effets du MTX sur la FE a été faite par incubation des anneaux avec :

- un inhibiteur de NOS, le L-NAME (N_w-nitro-L-arginine methyl ester, 10^{-4} M) ;
- deux inhibiteurs des canaux potassiques, l'apamine et la charybdotoxine (10^{-7} M) pour évaluer la part des EDHF ;
- un inhibiteur sélectif des COX-2, le NS-398 (10^{-5} M) ;
- un inhibiteur de l'arginase, la nor-NOHA (N_w-hydroxy-nor-L-arginine, 10^{-4} M) ;
- un analogue de la superoxyde dismutase, le Tempol (10^{-4} M).

Les effets du traitement par MTX sur les facteurs de risque CV ont été évalués par mesure de la masse corporelle, de la pression artérielle, du rythme cardiaque, de la glycémie et des taux circulants de cholestérol total, triglycérides, et homocystéine. Il a également été dosé le taux de BMP-4 (*bone morphogenetic protein 4*), protéine impliquée dans le métabolisme osseux et induisant une inflammation vasculaire et une DE [413]. Les paramètres inflammatoires ont été

évalués par dosage des taux sériques de TNFα et d'IL-1β. De même, les effets du traitement sur l'atteinte osseuse ont été évalués par radiographie X des pattes arrières.

2.1.3 Principaux résultats

Nos résultats montrent que :

- Le traitement par MTX réduit la sévérité clinique et l'inflammation systémique, mais est sans effet sur le score radiographique.
- Le traitement n'améliore pas significativement la fonction endothéliale, mais ne la détériore pas.
- En dépit de son absence d'effet sur la DE, le MTX modifie certains aspects de la réactivité endothéliale en améliorant l'activité des NOS et en réduisant la production d'anions superoxydes. En revanche, le traitement n'a pas d'effet ni sur l'hyperactivité des COX-2 et de l'arginase, ni sur la voie des EDHF.

A l'exception du taux circulant de BMP-4 qui est augmenté par le traitement, le MTX ne modifie pas les autres paramètres biologiques mesurés.

Methotrexate did not improve endothelial function in rheumatoid arthritis: a study in rats with adjuvant-induced arthritis

R. Bordy[1], F. Verhoeven[1,2], M. Tournier-Nappey[1], D. Wendling[2,3], C. Demougeot[1], P. Totoson[1]

[1]PEPITE EA4267, FHU INCREASE, Univ. Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France;
[2]Service de Rhumatologie, CHRU Besançon, Besançon, France;
[3]EA 4266, Univ. Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

Abstract

Objective

Rheumatoid arthritis is associated with an increased cardiovascular risk, secondary to endothelial dysfunction. There is accumulating evidence that methotrexate reduces cardiovascular risk in rheumatoid arthritis, but the mechanisms involved are still unknown. In this study, we aimed to determine the effect of methotrexate on endothelial function and traditional cardiovascular risk factors in the adjuvant-induced arthritis (AIA) rat model.

Methods

On the first signs of arthritis, methotrexate (1 mg/kg/week, s.c.) or saline (Vehicle) was administered to AIA for 3 weeks. Endothelial function was studied in aortic rings relaxed with acetylcholine in the presence or not of inhibitors of nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, arginase, EDHF and superoxide anions production. Arthritis and radiological scores, blood pressure and blood levels of cytokines, triglycerides, cholesterol, homocysteine and BMP-4 were measured.

Results

Although methotrexate significantly reduced the arthritis score, it had no effect on Ach-induced relaxation. As regards mechanisms, methotrexate increased nitric oxide synthase activity and reduced the superoxide anions production but did not change arginase, cyclooxygenase-2 and EDHF pathways. Methotrexate did not change the radiological score or blood pressure, lipid, glucose and homocysteine levels. By contrast, methotrexate significantly reduced plasma IL-1β and TNF-α levels and increased serum BMP-4 level.

Conclusion

Despite a reduction of clinical and biological inflammation, methotrexate did not improve endothelial function in AIA rats. Overall data suggest that mechanisms other than the ED reduction are likely involved, and remain to be elucidated to better understand the cardiovascular benefits of methotrexate in rheumatoid arthritis.

Key words
adjuvant-induced arthritis, endothelial dysfunction, methotrexate, mechanisms

Romain Bordy, PharmD, PhD student
Frank Verhoeven, MD, PhD
Maude Tournier-Nappey, BS
Daniel Wendling, MD, PhD
*Céline Demougeot, PharmD, PhD**
*Perle Totoson, PharmD, PhD**

**These authors contributed equally to this work.*

Please address correspondence to:
Dr Céline Demougeot,
PEPITE EA4267,
UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques,
19 rue Ambroise Paré, bâtiment S,
25030 Besancon cedex, France.
E-mail: cdemouge@univ-fcomte.fr

Received on January 12, 2018; accepted in revised form on April 16, 2018.

© Copyright CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2019.

Competing interests: none declared.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA), one of the most common chronic autoimmune diseases, is associated with a 2-fold increased mortality (1). One of the leading causes of excess mortality in RA patients is cardiovascular (CV) diseases due to accelerated atherogenesis (2). The risk of incident CVD is increased by 50% in RA patients, even in the early stage of the disease (3). Therefore, the reduction of increased morbidity and mortality from CV diseases associated with RA is currently acknowledged as a major goal of the global strategy for management of RA patients (4). The reasons explaining the excessive CV risk are not fully understood. Although traditional CV risk factors account for some of this risk, systemic inflammation, dysregulated immunity, iatrogenic factors or RA-dependent factors are likely to play a role (5, 6). Evidence from clinical studies showed that endothelial dysfunction (ED), the "*sine qua non*" condition for atherosclerosis appearance, is the key promoter of CVD in RA (7) and as such is a seminal target for reducing CV risk in RA (8).

Methotrexate (MTX), a dihydrofolate reductase inhibitor, has been used as a first-line Disease-modifying antirheumatic drug (DMARDs) in the treatment of RA for decades. Although initial retrospective cohort study found that patients with known CVD had a higher risk of death after a MTX treatment (9), a recent meta-analysis suggested that MTX decreased the overall CV risk in RA (1, 10-12). Surprisingly, although a better understanding of the effect of drugs on the CV disease in RA will allow a fine-tuned use of different DMARDs in order to obtain optimal control of CV risk, the mechanisms by which MTX may reduce the CV risk in RA is still indefinite (3). Regarding the effect of MTX on ED specifically, the available data in the literature are sparse and controversial. In a recent cohort of 33 RA patients, ED was found in RA patients treated with DMARDs including MTX as compared to control subjects (13). Likewise, Hansel et al. found that MTX-treated RA patients had a reduced endothelial function as compared to control subjects (39). Another study reported no change in the endothelial function in RA patients after a short-term treatment with DMARDs including MTX (14). By contrast other studies reported that MTX improved the endothelial function in RA patients (15, 16). A recent study reported that MTX enhanced the microvascular endothelial function but that the effect was more pronounced at 6 weeks than at 6 months of treatment (17). Because these clinical studies in RA patients have a lot of confounding factors, animal models of RA are useful to specifically study the impact of one medication on the endothelial function. Previous studies identified the presence of aortic ED in the widely-used model of adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats (18), due to decreased EDHF availability, increased arginase and cyclo-oxygenase-2 (COX-2) activity as well excessive superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) production (19), with a prominent role of the cross-talk between endothelial COX-2/Nitric oxide Synthase/Arginase/$O_2^{\cdot-}$ pathways (20). By using the same model, the benefits of etanercept or high dose of glucocorticoids for improving the endothelial function were recently demonstrated (21).

In the present study, the effect of MTX on the endothelial function was studied on isolated aortic rings on day 33 after arthritis induction in AIA rats (*i.e.* at a time when ED had been previously observed in this model (18)), and the mechanisms involved were dissected. The effect of MTX on the disease severity and systemic inflammation was assessed by measurement of arthritis and radiographic scores and plasma IL-1β and TNF-α, respectively. We also measured the blood pressure, heart rate, blood glucose, serum lipid and plasma homocysteine levels to assess whether the treatment modified CV risk factors, as well as serum BMP-4 levels (bone morphogenetic protein 4) to understand the link between the bone biology and the endothelial function after MTX therapy.

Methods

Animals

Six weeks old male Lewis rats (n=30) were purchased from Janvier (Le Gen-

est 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°2015-001-CD-5PR of Franche-Comté University (Besançon, France), and complied with the "Animal Research: Reporting In Vivo Experiments" ARRIVE guidelines.

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 characterised by a rapid onset and progression of a robust and easily measurable polyarthritis, characterised by severe erythema and diffuse soft tissue swelling with complete ankyloses and malformations in the paws, reduced locomotor activity, frequently associated to ears and tail inflammation, weight loss, anorexia and diarrhea. 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 for each rat.

Analysis of radiographic parameters

Radiographs of hind paws were performed with a Block Matching Algorithm High Resolution Digital X Ray (40mV, 10mA) – D3A Medical Systems (Orleans, France). A score of 0-20 was determined for each paw using a grading scale modified by Ackerman *et al*. (23). This score takes into account: the soft tissue swelling; the osteoporosis; the loss of cartilage; the bone erosion; and the heterotopic ossification. This score used the scale: 0 (normal); 1 (weak); 2 (mild); 3 (moderate); 4 (severe) abnormalities in the tissue for each of the five characteristics previously described. The maximum score for each rat is 40.

Drug treatment

On the day of the first inflammatory symptoms (*i.e*. at day 11-12 post-immunisation), AIA rats were randomised in two groups. One group received MTX (Sigma-Aldrich, ref: M9929) at a dose of 1 mg/kg/week (s.c.) ("MTX", n=15) for 3 weeks ("sub-chronic" treatment). Another group received phosphate buffer saline at 1 mL/kg/week (s.c.) for 3 weeks ("Vehicle", n=15). The dose chosen corresponds to a dose that resulted in a significant reduction in arthritis severity in the AIA model (24, 25).

Tissue collection, blood pressure and heart rate measurements

Twenty-one days after the treatment initiation, rats were anaesthetised with pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). Arterial systolic (SBP), diastolic (DBP), 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 rectal temperature control. Blood was then withdrawn from the abdominal aorta and centrifuged to obtain serum and plasma, divided into aliquots and stored at -80°C until analysis. Thoracic aortas were removed and immediately used for vascular reactivity studies.

Vascular reactivity

At the end of the treatment period, thoracic aorta was excised, cleaned of connective tissue, and cut into rings of ~2 mm in length. Rings were suspendedin Krebs solution (mmoles/litre: NaCl 118, KCl 4.65, $CaCl_2$ 2.5, KH_2PO_4 1.18, $NaHCO_3$ 24.9, $MgSO_4$ 1.18, glucose 12, pH 7.4), maintained at 37°C and continuously aerated with 95% O_2, 5% CO_2, for isometric tension recording in organs chambers, as previously described (26). To test viability, rings were contracted by concentrated KCl Krebs solution (100 mmoles/litre). In some rings, the endothelium was mechanically removed. The completeness of the endothelial denudation was confirmed by the absence of relaxation to the endothelium-dependent agonist acetylcholine (Ach, 10^{-6} moles/litre). After a 90-min-equilibration period under a resting tension of 2g, to determine whether MTX improved the endothelial function, rings with intact endothelium were constricted with phenylephrine (PE, 10^{-6} moles/litre), and the endothelium-dependent relaxation to Ach (10^{-11}-10^{-4} moles/litre) was compared between MTX and the vehicle group. To investigate the contribution of NOS, $O_2^{\cdot-}$, EDHF, arginase, and COX-2, rings were previously incubated for 1 hour with the non-selective NOS inhibitor N_W-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10^{-4} moles/litre), the superoxide dismutase mimetic (SOD) Tempol (10^{-4} moles/litre), the Ca^{2+}-dependent K^+ channel inhibitors apamin (10^{-7} moles/litre) and charybdotoxin (10^{-7} moles/litre), and for 30 minutes with the arginase inhibitor N_w-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA, 10^{-4} moles/litre) and the selective COX-2 inhibitor (NS-398, 10^{-5} moles/litre) respectively. Endothelium-denuded rings were used to determine the vasoconstrictive response to norepinephrine (NE, 10^{-11}-10^{-4} moles/litre) and the vasorelaxant response to the NO-donor sodium nitroprusside (SNP, 10^{-11}-10^{-4} moles/litre) after preconstruction with PE 10^{-6} moles/litre.

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). Plasma levels of pro-inflammatory cytokines (interleukin 1β (IL-1β) and Tumor Necrosis Factor α (TNF-α)) were measured by using Milliplex magnetic bead panel kits (eBioscience, Vienne, Austria) that were analysed using a Luminex MAGPIX system (Luminex Corporation; Houston, TX) and Milliplex Analyst software (Millipore; St. Charles, MO). Plasma levels of homocysteine (HCy) and serum levels of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) were measured by using ELISA kits (Cusabio, Hubei, China). The limits of

Table I. Effect of MTX on physiological and biological parameters.

	Vehicle	MTX
Body weight (g)	222 ± 4	227 ± 4
SBP (mm Hg)	107 ± 6	110 ± 13
DBP (mm Hg)	72 ± 5	70 ± 10
Heart ate (bpm)	261 ± 12	273 ± 18
Total cholesterol (g/L)	0.99 ± 0.03	0.89 ± 0.05
Triglycerides (g/L)	0.47 ± 0.04	0.48 ± 0.04
Blood glucose (g/L)	1.11 ± 0.04	1.09 ± 0.04
TNF-α (pg/mL	41.5 ± 5.2	22.3 ± 2.1**
IL-1β (pg/mL)	102.5 ± 14.5	48.5 ± 4.9**
BMP-4 (pg/mL)	5.19 ± 0.69	8.11 ± 1.46*
Homocysteine (nmol/mL)	1.67 ± 0.25	1.20 ± 0.10

All parameters were measured in AIA rats at day 33 post-immunisation after 21 days of treatment (s.c) with saline (vehicle) or methotrexate (1 mg/kg/week). SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure. Values are expressed as means ± SEM (n=8 to 15 rats per group), *p<0.05, **p<0.01,

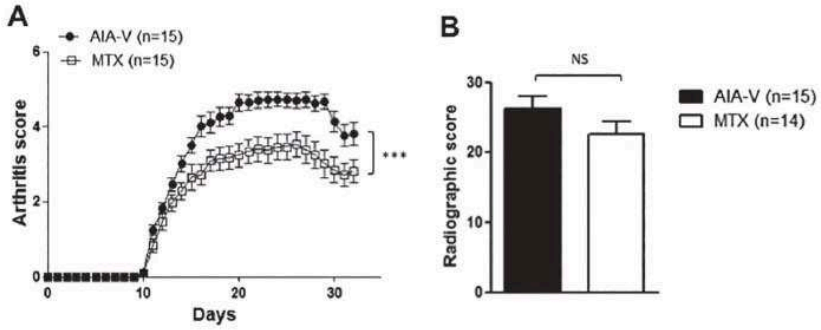


Fig. 1. Evolution of arthritis in vehicle and methotrexate-treated rats.
Arthritis scores were plotted over time after AIA induction in rats treated with methotrexate (MTX) and compared to saline-treated rats (AIA-V) (**A**). Radiographic scores were measured at the end of the treatment period (21 days after the onset of arthritis) (**B**). Values are the mean ±SEM (n=14-15 rats/group). ***p<0.001, NS: not significant.

detection provided by the manufacturer for IL-1β, TNF-α, BMP-4 and HCy were 13, 3.78 and 3.9 pg/mL, and 0.78 nmol/mL, respectively.

Data and statistical analysis

Values are presented as means ± SEM. Data were analysed using GraphPad Prism software (v. 5.3). Contractile responses to NE were expressed as the percentage of the maximum response to KCl 100 mmoles/litre. Relaxant responses to SNP and Ach were expressed as the percentage of relaxation of the contractile response to PE 10^{-6} moles/litre. Concentration-responses curves to Ach, SNP and NE in vehicle and MTX were compared by 2-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures. In each group, concentration-response curves to Ach with or without a specific inhibitor were compared by 2-way ANOVA for repeated measures. Comparison between two values was assessed by unpaired Student t-test or a Mann-Whitney U-test when data were not normally distributed. The analysis of the relationship between two parameters was determined by using linear regression analysis, and a Spearman's correlation coefficient was calculated between these variables. p<0.05 was considered statistically significant.

Results

Effects of MTX on the clinical and biological parameters

MTX did not influence body weights as compared to the vehicle (222±4 *vs.* 227±2, p=0.371, Table I). MTX significantly reduced arthritis score (Fig. 1A) but did not change radiologic score (Fig. 1B). SBP, DBP, heart rate, glycaemia, lipid and HCy levels were unchanged by MTX as compared to the Vehicle (Table I). Conversely MTX significantly reduced plasma IL-1β (-53%

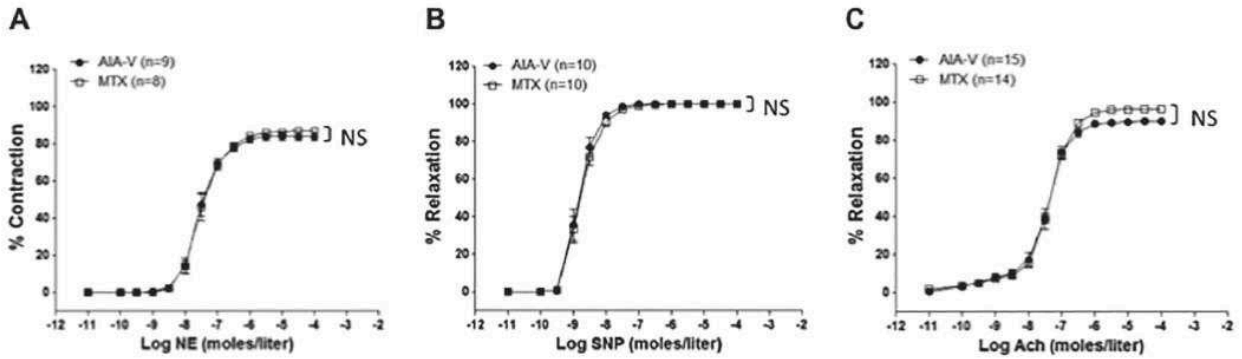


Fig. 2. Vascular reactivity to vasodilators and vasoconstrictive agents in AIA treated with methotrexate. Experiments were performed on thoracic aortic rings harvested at the end of the treatment period (21 days after the onset of arthritis) from AIA rats with saline (Vehicle) or with methotrexate (MTX, 1 mg/kg/week). NE induced-constriction was performed on endothelium-denuded aortic rings (**A**). Concentration-response curves of SNP were obtained on endothelium-denuded aortic rings preconstricted with PE 10-6 moles/litre (**B**). Ach induced-relaxation was studied on endothelium-intact aortic rings preconstricted with PE 10^{-6} moles/litre (**C**). Values are the mean ± SEM (n=8-15 aortic rings from 15 rats per group). NS: not significant; NE: norepinephrine; SNP: sodium nitroprusside.

vs. Vehicle, $p<0.05$) and TNF-α levels (-46% *vs*. Vehicle, $p<0.01$) (Table I). Serum BMP-4 levels were below the detection limit in 33% of the samples from the Vehicle and MTX groups. Of interest, BMP-4 levels were significantly increased after the MTX treatment (+56% *vs*. Vehicle, $p<0.05$, Table I).

MTX did not change the endothelium-independent responses to the relaxing and constricting agents

To ascertain that the effect of MTX of the endothelial function was not influenced by the impaired response of VSMCs to the vasoconstrictive stimulus or to the relaxant effect of NO, the effect of MTX on NE-induced vasoconstriction and on SNP-induced vasodilation was determined on endothelium-denuded aortic rings. Results demonstrated that the response to the NE (Fig. 2A) or to NO-donor SNP (Fig. 2B) showed no difference between MTX and Vehicle rats.

MTX did not improve the endothelial function in AIA while changing some endothelial pathways

To determine whether MTX modified the endothelial function, the concentration-response curves to Ach, an endothelium-dependent relaxant agonist, were compared between MTX and vehicle-treated AIA rats. As shown in Fig. 2C, concentration-effects curves of Ach were not significantly different between MTX- and vehicle-treated rats.

As MTX was previously found to improve (27) or deteriorate (27) endothelial relaxing pathways, we tested the hypothesis that MTX induced contradictory effects on endothelial biology. Actually, despite its lack of effect on the endothelial function, certain endothelial pathways were modified by MTX but not all. Incubation of rings with L-NAME significantly blunted Ach-associated relaxation in both vehicle (Fig. 3A) and MTX group (Fig. 3B), but the effect of L-NAME was greater in MTX compared to the vehicle (% reduction of Emax: 89±2 *vs*. 75±3 in vehicle, $p=0.001$) thus indicating that NOS activity was enhanced by MTX. As arginase and NOS compete for the same substrate, L-arginine, to determine whether

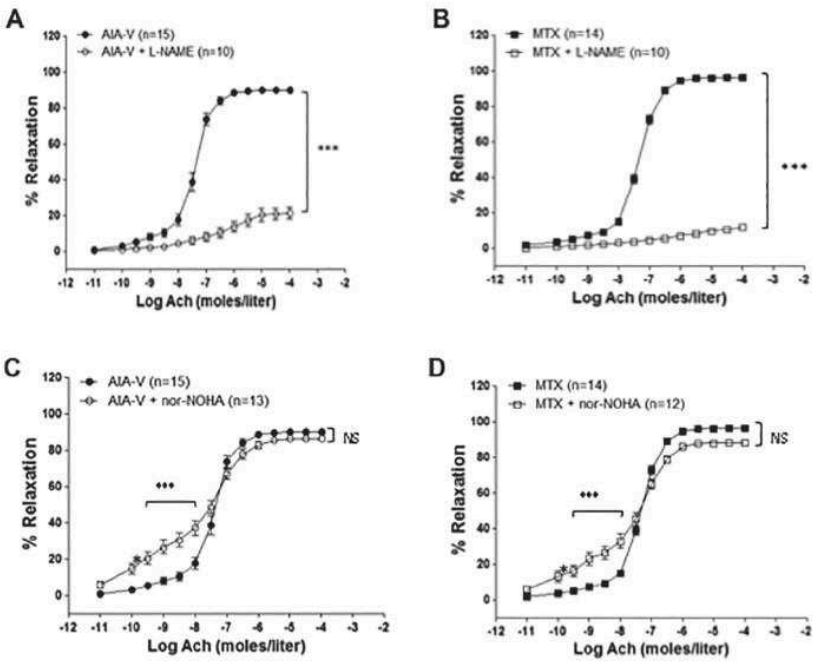


Fig. 3. Effects of methotrexate on NOS/arginase pathways. Experiments were performed on thoracic aortic rings harvested at the end of the treatment period (21 days after the onset of arthritis) from AIA rats with saline (Vehicle) or with methotrexate (MTX, 1 mg/kg/week). Cumulative concentration-responses curves of Ach were obtained after incubation or not with L-NAME at 10^{-4} moles/litre (**A, B**), and nor-NOHA at 10^{-4} moles/litre (**C, D**). Values from the concentration-response curves are the mean ± SEM (n= 10-15 rings from 15 rats per group). ***$p<0.001$, NS: not significant.

increased NOS activity was secondary to decreased arginase activity, rings were incubated with the arginase inhibitor nor-NOHA. As shown in Fig. 3C and D, the effect of nor-NOHA was not different between the vehicle- and MTX-treated rats, showing that MTX did not change the arginase activity. In Vehicle AIA, as a reflection of increased $O_2^{\cdot-}$ production, Tempol significantly improved Ach-induced vasorelaxation (Fig. 4A). The treatment of AIA with MTX abolished the impact of Tempol on Ach-induced relaxation (Fig. 4B). As regards COX-2 activity, in agreement with the excessive deleterious activation of COX-2 in vessels from AIA rats (20), the selective COX-2 inhibitor NS-398 significantly enhanced Ach-induced relaxation in aortas from vehicle-treated animals (Fig. 4C). In MTX-treated rats, NS-398 still enhanced the Ach-induced vasorelaxation showing that the COX-2 activity had not been reduced by the treatment (Fig. 4D). A deficit in EDHF production was present in Vehicle AIA since apamin and charybdotoxin did not reduce Ach-induced vasodilation (Fig. 4E). MTX did not improve the blunted EDHF production as it did not change the effect of apamin and charybdotoxin (Fig. 4F). In summary, MTX increased the NOS activity and decreased the $O_2^{\cdot-}$ production but had no effect on the vascular EDHF production, COX-2 and arginase activity.

To discard the possibility that the dose of MTX used in the present study (1 mg/kg/week) was sub-optimal for inducing an effect on the endothelial function, the Ach-induced relaxation was further investigated in an additional group of AIA rats (n=15) treated with MTX at 2 mg/kg/week (s.c.). As shown in Figure 5, this higher dose significantly reduced the arthritis score (Fig. 5A), but did not change the relaxation induced by Ach as compared to the vehicle-treated rats (Fig. 5B).

Of note, no correlation was found between arthritis score and Emax of Ach ($r= 0.308$, $p=0.068$) (all AIA rats).

Discussion

Although the endothelial dysfunction is acknowledged as the early vascular

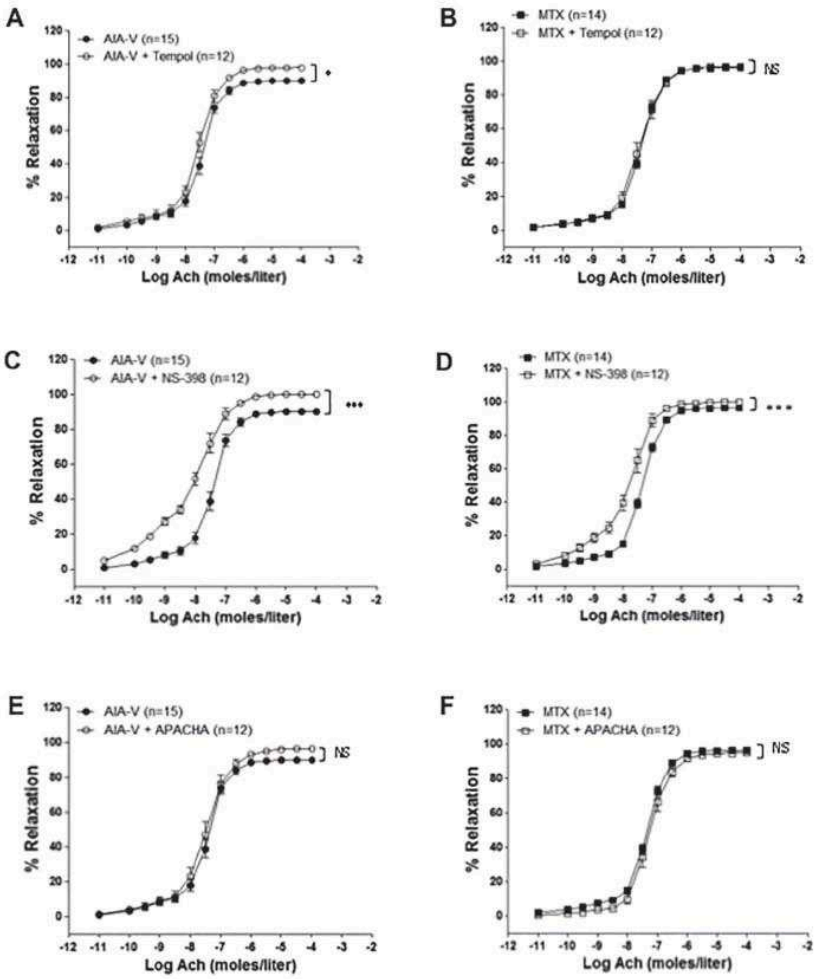


Fig. 4. Effects of methotrexate on COX-2 pathway, superoxide anions and EDHF productions. Experiments were performed on thoracic aortic rings harvested at the end of the treatment period (21 days after the onset of arthritis) from AIA rats with saline (Vehicle) or with methotrexate (MTX, 1 mg/kg/week). Cumulative concentration-responses curves of Ach were obtained after incubation or not with Tempol at 10^{-4} moles/litre (**A, B**), NS-398 at 10^{-5} moles/litre (**C, D**), and apamin and charybdotoxin at 10^{-7} moles/litre each (**E, F**). Values from the concentration-response curves are the mean ± SEM (n=12-15 rings from 15 rats per group). *p<0.05, ***p<0.001, NS: not significant.

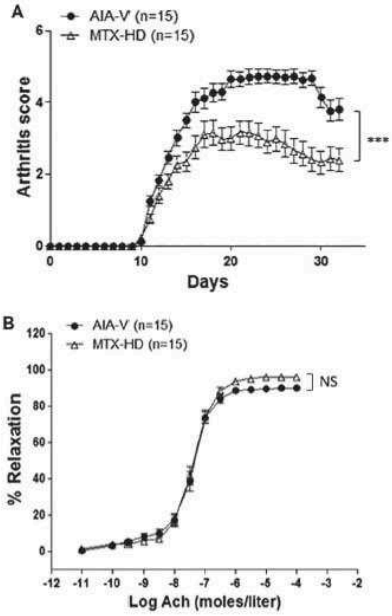


Fig. 5. Effect of high dose of methotrexate on arthritis evolution and vascular reactivity to acetylcholine. Arthritis scores were plotted over time after AIA induction in rats treated with methotrexate high-dose (MTX-HD, 2 mg/kg/week) and compared to saline–treated rats (AIA-V) (**A**). At the end of the treatment, concentration-response curve of Ach were obtained on endothelium-intact aortic rings preconstricted with PE 10^{-6} moles/litre (**B**). Values are the mean ± SEM (n=15 aortic rings from 15 rats per group).
***p<0.001, NS: not significant.

event leading to atherogenesis and in turn increased risk of CV morbidity and mortality in RA patients (8, 29), only a few studies were designed to identify the therapeutic options able to reduce this vascular impairment. MTX, the cornerstone of RA treatment, was suggested to reduce CV risk in RA but whether its potential benefits rely on positive effects on the vascular function is currently unknown. Because clinical studies led to inconsistent results, the use of animal models of arthritis is a benchmark choice to address this question as they offer the opportunity to avoid the numerous confounding factors present in clinical studies. By using the AIA model, the present study revealed that a curative treatment with MTX failed to improve the endothelial function in AIA. Of note, MTX did not *deteriorate* the endothelial function *in vivo*, whereas MTX used at concentrations corresponding to serum concentrations in RA was previously reported *in vitro* to decrease the endothelial cell proliferation and viability (28) and to promote their apoptosis (30). Moreover MTX administered to rats with no pathological condition at 0.35 mg/kg/day for 2 weeks was able to induce ED (31). The study of the effect of MTX on the major endothelial pathways revealed that MTX induced some changes in impaired vascular pathways, but only partly: it decreased $O_2^{-\bullet}$ production and enhanced NOS activity but did normalised neither COX-2 or arginase activities nor EDHF production. From a therapeutic perspective, our data suggest that a combination of actions on endothelial pathways is required to improve ED in arthritis, as previously suggested in studies in the AIA model reporting that the beneficial effects of etanercept (21) or high dose of prednisolone (32) on ED were underpinned by combined effects on NOS, arginase, COX-2 and $O_2^{-\bullet}$ pathways. Conversely, a low dose of prednisolone that increased NOS activity and downregulated $O_2^{-\bullet}$ pathways without changing arginase and COX-2 activities failed to improve the endothelial function (32), as observed in the present study with MTX. From a pathophysiological perspective overall data highlight a seminal role of the COX-2/arginase pathways in RA-associated ED.

Even though the reasons for premature CVD in RA are not fully clarified, inflammation is suspected to play a seminal role (33, 34). Consistent with this, cytokines such as IL-6 are strongly correlated with endothelium activation markers and reduction of its concentration attenuates atherogenesis in active RA (35, 36). Thus, one possible explanation for the lack of effect of MTX on ED was that the reduction of inflammation was insufficient. Our data revealed that it was not the case as MTX significantly reduced arthritis severity as well circulating pro-inflammatory cytokines. These results are consistent with the previously reported lack of association between the cumulative inflammation and the endothelial function in RA patients (37–39). Likewise, a recent meta-analysis indicated that despite a decrease in biological inflammation, anti-TNF-α therapy induced no changes in ED (40). More recently, in line with our results, a 6-month-treatment with MTX in patients with inflammatory rheumatic diseases was found to decrease disease activity, CRP and ESR, but to have no effect on pentraxin 3, a systemic marker of the endothelial dysfunction (41). These data also resonate with those of Hansel *et al*. (42) showing that young RA patients with a low disease activity, treated by MTX, suffered from ED. Actually overall results do not argue against a contribution of inflammation to ED but rather highlight the complexity of the relationship between these two parameters and argue against the use of "conventional" circulating markers of inflammation to predict the endothelial function in RA. Besides inflammation, traditional CV risk factors also contribute, albeit partly, to ED in RA (43). Among them, hyperhomocysteinaemia (HyperHCy), an independent CV risk factor, has been associated with atherosclerotic vascular diseases and ischaemic heart attacks due to HCy-induced ED (44). As hyperHCy is a possible side effect of MTX due to its mode of action, we tested the hypothesis that MTX-induced HyperHcy may explain the lack of effect of MTX on ED. The results showed that MTX did not change HCy levels. As regards other traditional CV risk factors that are known to contribute to the excess of CV risk in RA (45), our data revealed that MTX changed neither blood pressure, glycaemia nor cholesterol and triglycerides levels, thus excluding these parameters as culprits for the lack of effect of MTX on ED.

An interesting result of our study is that MTX decreased clinical arthritis but had no effect on joint damage as attested by the lack of difference of radiological score between the vehicle- and MTX-treated AIA groups. The most likely hypothesis is the short duration of MTX treatment in our conditions (3 weeks). Given that a burgeoning literature suggests a link between bone metabolism alterations and ED in RA (46-48), and as BMP-4 was reported to induce vascular inflammation, ED and atherosclerosis (49), we explored the effect of MTX on circulating BMP-4 levels. Our results revealed that MTX significantly enhanced serum BMP-4 levels in AIA. Even though BMP-4 has never been measured in the serum of RA patients, this result is in line with the finding that MTX, contrary to the other DMARDs, increased BMP gene expression in peripheral blood mononuclear cells in RA patients (50). Thus, further studies are now needed to determine whether this impairment might explain the lack of effect of MTX on ED.

In conclusion, the present study demonstrated that a treatment with MTX did not change endothelial function in arthritis. Importantly, and contrary to data obtained in "non inflammatory" conditions (28, 31), MTX did not worsen the endothelial function. Our data do not undermine the benefits of MTX on CVR in RA but indicate that mechanisms other than the reduction in ED are likely involved, such as the effects on the lipoprotein function (51) or the decreased prothrombotic propensity (52). From a therapeutic perspective, they suggest that MTX-treated patients might benefit from add-on endothelium-protective therapies to hope normalising the CV risk of RA patients against the general population.

Acknowledgements

The authors thank Dr J. Moretto for the analysis of pro-inflammatory cytokines levels, Dr C. Moussard for the cholesterol and triglycerides levels measurements and Mrs M. Coster for checking the English language of the manuscript text. The authors thank the FHU InCREASe for the Oral Communication Award which allowed them to have the Homocysteine ELISA kit.

References

1. SOUBRIER M, CHAMOUX NB, TATAR Z, COUDERC M, DUBOST J-J, MATHIEU S: Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2014; 81: 298-302.
2. VAN HALM VP, PETERS MJL, VOSKUYL AE *et al.*: Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease: a cross-sectional study, the CARRE Investigation. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1395-400.
3. SHEN J, SHANG Q, TAM L-S: Targeting inflammation in the prevention of cardiovascular disease in patients with inflammatory arthritis. *Transl Res J Lab Clin Med* 2016; 167: 138-51.
4. PETERS MJL, SYMMONS DPM, MCCAREY D *et al.*: EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 325-31.
5. GILES JT: Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: Current perspectives on assessing and mitigating risk in clinical practice. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2015; 29: 597-613.
6. MASON JC, LIBBY P: Cardiovascular disease in patients with chronic inflammation: mechanisms underlying premature cardiovascular events in rheumatologic conditions. *Eur Heart J* 2015; 36: 482-489c.
7. DAIBER A, STEVEN S, WEBER A *et al.*: Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol* 2017; 174: 1591-19.
8. STEYERS CM, MILLER FJ: Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 11324-49.
9. LANDEWÉ RB, VAN DEN BORNE BE, BREEDVELD FC, DIJKMANS BA: Methotrexate effects in patients with rheumatoid arthritis with cardiovascular comorbidity. *Lancet* 2000; 355: 1616-7.
10. DE VECCHIS R, BALDI C, PALMISANI L: Protective effects of methotrexate against ischemic cardiovascular disorders in patients treated for rheumatoid arthritis or psoriasis: novel therapeutic insights coming from a meta-analysis of the literature data. *Anatol J Cardiol* 2016; 16: 2-9.
11. ROUBILLE C, RICHER V, STARNINO T *et al.*: 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: 480-9.
12. MICHA R, IMAMURA F, WYLER VON BALLMOOS M *et al.*: Systematic review and meta-analysis of methotrexate use and risk of

cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2011; 108: 1362-70.
13. MÄKI-PETÄJÄ KM, DAY L, CHERIYAN J *et al.*: Tetrahydrobiopterin supplementation improves endothelial function but does not alter aortic stiffness in patients with rheumatoid arthritis. *J Am Heart Assoc* 2016; 5: pii: e002762.
14. FOSTER W, CARRUTHERS D, LIP GYH, BLANN AD: Inflammation and microvascular and macrovascular endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: effect of treatment. *J Rheumatol* 2010; 37: 711-6.
15. TURIEL M, TOMASONI L, SITIA S *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.
16. 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: R51.
17. DEYAB G, HOKSTAD I, WHIST JE *et al.*: Methotrexate and anti-tumor necrosis factor treatment improves endothelial function in patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 232.
18. 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: 2309-17.
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: 202.
20. TOTOSON P, MAGUIN-GATÉ K, NAPPEY M, WENDLING D, DEMOUGEOT C: Endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and correlation with circulating markers of systemic inflammation. *PloS One* 2016; 11: e0146744.
21. TOTOSON P, MAGUIN-GATÉ K, PRIGENT-TESSIER A *et al.*: Etanercept improves endothelial function via pleiotropic effects in rat adjuvant-induced arthritis. *Rheumatology* (Oxford) 2016; 55: 1308-17.
22. SAKAGUCHI N, TAKAHASHI T, HATA H *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. ACKERMAN NR, ROOKS WH, 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.
24. SIMJEE SU, JAWED H, QUADRI J, SAEED SA: Quantitative gait analysis as a method to assess mechanical hyperalgesia modulated by disease-modifying antirheumatoid drugs in the adjuvant-induced arthritic rat. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: R91.
25. LE GOFF B, SOLTNER E, CHARRIER C *et al.*: A combination of methotrexate and zoledronic acid prevents bone erosions and systemic bone mass loss in collagen induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R185.
26. BAGNOST T, BERTHELOT A, BOUHADDI M *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: 1110-8.
27. THORNTON CC, AL-RASHED F, CALAY D *et al.*: Methotrexate-mediated activation of an AMPK-CREB-dependent pathway: a novel mechanism for vascular protection in chronic systemic inflammation. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 439-48.
28. ANNUSSEK T, SZUWART T, KLEINHEINZ J, KOIKY C, WERMKER K: *In vitro* inhibition of HUVECs by low dose methotrexate - insights into oral adverse events. *Head Face Med* 2014; 10: 19.
29. LIBBY P: Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *Am J Med* 2008; 121: S21-31.
30. MERKLE CJ, MOORE IM, PENTON BS *et al.*: Methotrexate causes apoptosis in postmitotic endothelial cells. *Biol Res Nurs* 2000; 2: 5-14.
31. SANKRITYAYAN H, MAJUMDAR AS: Curcumin and folic acid abrogated methotrexate induced vascular endothelial dysfunction. *Can J Physiol Pharmacol* 2016; 94: 89-96.
32. VERHOEVEN F, PRATI C, MAGUIN-GATÉ K, WENDLING D, DEMOUGEOT C: Glucocorticoids and endothelial function in inflammatory diseases: focus on rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2016; 18: 258.
33. WONG BW, MEREDITH A, LIN D, McMANUS BM: The biological role of inflammation in atherosclerosis. *Can J Cardiol* 2012; 28: 631-41.
34. GONZALEZ-GAY MA, LLORCA J, GARCIA-UNZUETA MT *et al.*: High-grade inflammation, circulating adiponectin concentrations and cardiovascular risk factors in severe rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26: 596-603.
35. DESSEIN PH, JOFFE B: Suppression of circulating interleukin-6 concentrations is associated with decreased endothelial activation in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 161-7.
36. DESSEIN PH, SOLOMON A, WOODIWISS AJ, NORTON GR, TSANG L, GONZALEZ-GAY MA: Marked independent relationship between circulating interleukin-6 concentrations and endothelial activation in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 510243.
37. 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.
38. KLIMEK E, SKALSKA A, KWAŚNY-KROCHIN B *et al.*: Differential associations of inflammatory and endothelial biomarkers with disease activity in rheumatoid arthritis of short duration. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 681635.
39. VANDHUICK T, ALLANORE Y, BORDERIE D *et al.*: Early phase clinical and biological markers associated with subclinical atherosclerosis measured at 7 years of evolution in an early inflammatory arthritis cohort. *Clin Exp Rheumatol* 2016; 34: 58-67.
40. 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.
41. DEYAB G, HOKSTAD I, WHIST JE *et al.*: Anti-rheumatic treatment is not associated with reduction of pentraxin 3 in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis. *PloS One* 2017; 12: e0169830.
42. HÄNSEL S, LÄSSIG G, PISTROSCH F, PASSAUER J: Endothelial dysfunction in young patients with long-term rheumatoid arthritis and low disease activity. *Atherosclerosis* 2003; 170: 177-80.
43. 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: 2143-54.
44. LAI WKC, KAN MY: Homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Ann Nutr Metab* 2015; 67: 1-12.
45. WELCH GN, LOSCALZO J: Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 1042-50.
46. PARK Y-J, KIM J-Y, PARK J, CHOI J-J, KIM W-U, CHO C-S: Bone erosion is associated with reduction of circulating endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* (Hoboken NJ) 2014; 66: 1450-60.
47. DESSEIN PH, LÓPEZ-MEJIAS R, GONZÁLEZ-JUANATEY C *et al.*: Independent relationship of osteoprotegerin concentrations with endothelial activation and carotid atherosclerosis in patients with severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2014; 41: 429-36.
48. SALAZAR VS, GAMER LW, ROSEN V: BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol* 2016; 12: 203-21.
49. MIRIYALA S, GONGORA NIETO MC, MINGONE C *et al.*: Bone morphogenic protein-4 induces hypertension in mice: role of noggin, vascular NADPH oxidases, and impaired vasorelaxation. *Circulation* 2006; 113: 2818-25.
50. GRCEVIC D, JAJIC Z, KOVACIC N *et al.*: Peripheral blood expression profiles of bone morphogenetic proteins, tumor necrosis factor-superfamily molecules, and transcription factor Runx2 could be used as markers of the form of arthritis, disease activity, and therapeutic responsiveness. *J Rheumatol* 2010; 37: 246-56.
51. RONDA N, GRECO D, ADORNI MP *et al.*: Newly identified antiatherosclerotic activity of methotrexate and adalimumab: complementary effects on lipoprotein function and macrophage cholesterol metabolism. *Arthritis Rheumatol* (Hoboken NJ) 2015; 67: 1155-64.
52. BEINSBERGER J, HEEMSKERK JWM, COSEMANS JMEM: Chronic arthritis and cardiovascular disease: altered blood parameters give rise to a prothrombotic propensity. *Semin Arthritis Rheum* 2014; 44: 345-52.

2.2 2ème étude

L'arginase vasculaire est une cible pertinente pour améliorer la dysfonction endothéliale cérébrovasculaire en cas de polyarthrite rhumatoïde : étude dans le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant

Article publié dans *Translational Stroke Research*, 2019 [epub] (FI : 8,266)

2.2.1 Contexte et objectifs

La PR est associée à une augmentation du risque de maladies cérébrovasculaires, notamment d'AVC qui constitue la deuxième cause de mortalité [75], mais également de troubles cognitifs, de démences et de dépressions [75,110,114,117]. Dans la population générale, il est établi qu'une dysfonction endothéliale cérébrale peut contribuer à ces pathologies [414,415]. En cas de PR, l'existence d'une DE cérébrale n'a jamais été mise en évidence. Elle est suggérée par une seule étude qui a montré une diminution de la réserve cérébrovasculaire chez le patient PR [298]. Toutefois, une baisse de la réserve cérébrovasculaire peut être due à une DE, mais également à des atteintes athérosclérotiques. Les mécanismes impliqués dans cette potentielle DE cérébrale ne sont pas connus eux non plus.

L'arginase (EC 3.5.3.1) est une enzyme métabolisant la L-arginine en L-ornithine et urée [416]. Ses deux isoformes (arginase I, cytosolique, et arginase II, mitochondriale) sont exprimées par les cellules endothéliales. Dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires et métaboliques, l'augmentation d'activité de l'arginase contribue à la DE via une compétition de substrat avec l'eNOS [416], conduisant au découplage de cette dernière [269]. Par ailleurs, à cause de cette hyperactivité, l'accumulation d'ornithine, dégradée en polyamines et L-proline, conduit à une augmentation de la synthèse de collagène, conduisant à une fibrose augmentée [416].

Des données antérieures du laboratoire ont montré une augmentation de la voie de l'arginase impliquée dans la DE aortique [292], et un effet bénéfique d'un traitement chronique par inhibiteur d'arginase [382]. En accord avec ces données, il a été montré récemment que le patient PR présente une augmentation de l'activité arginase sanguine par rapport aux sujets sains [417].

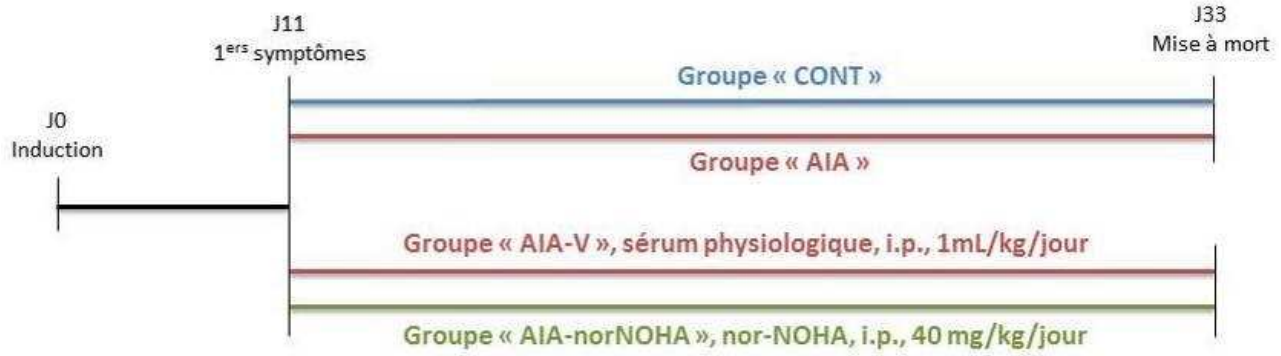
Le premier objectif de cette étude est d'explorer la fonction endothéliale cérébrale dans le modèle AIA, et d'étudier les mécanismes NO-dépendants incluant le rôle de l'arginase. Il est en effet connu que la régulation de la fonction endothéliale cérébrale, et donc du tonus et du débit sanguin cérébral, est majoritairement NOS-dépendante. Ainsi, nous supposons qu'une augmentation de l'activité de l'arginase pourrait induire une baisse de la biodisponibilité en NO et donc conduire à une DE.

Le deuxième objectif a été d'étudier les effets d'un traitement systémique par un inhibiteur d'arginase sur la DE cérébrale.

2.2.2 Méthodologie

Les expériences ont été menées sur deux séries expérimentales :

- une première série sans intervention thérapeutique chez des rats contrôles, nommés groupe « CONT », et chez des rats arthritiques, nommés groupe « AIA » ;
- une deuxième série avec intervention thérapeutique chez des rats AIA traités dès l'apparition des symptômes à J11 par :
    - sérum physiologique (Véhicule) à dose de 1mL/kg/jour par voie intra-péritonéale pendant 21 jours, nommés groupe « AIA-V » ;
    - nor-NOHA à dose de 40 mg/kg/jour par voie intra-péritonéale pendant 21 jours, nommés groupe « AIA-norNOHA ».



A J33, 2 segments des artères cérébrales moyennes ont été prélevés :

- l'un a été conservé pour une étude immunohistochimique visant à mesurer l'expression de la eNOS, l'arginase 2, et la $p47^{phox}$, une sous-unité membranaire et cytosolique de la NOX,

principale enzyme de production d'anions superoxydes à l'origine du stress oxydant vasculaire ;

- l'autre a été immédiatement utilisé pour l'étude de la réactivité vasculaire après montage en conditions pressurisées sur l'artériographe de Halpern. Il a été étudié :
    - l'aspect structurel et biomécanique du vaisseau avec l'évaluation du tonus myogénique de repos, du tonus myogénique actif, de la surface de la section transversale, du ratio média/lumière et des courbes tension/déformation.
    - l'aspect fonctionnel du vaisseau avec étude cumulative d'agents vasorelaxants endothélium-dépendants (Ach, bradykinine (BK), ADP), endothélium-indépendants (nitroprussiate de sodium [SNP]) et vasoconstrictants (sérotonine).

L'étude des mécanismes impliqués dans la FE a été faite par mesure de la relaxation à l'Ach après incubation des segments d'ACM avec :

- un inhibiteur de NOS, le L-NAME (N_w-nitro-L-arginine methyl ester, 10^{-4} M) ;
- le cofacteur des NOS, la tétrahydrobioptérine (BH_4, 10^{-7} M) ;
- un inhibiteur de l'arginase, la nor-NOHA (N_w-hydroxy-nor-L-arginine, 10^{-4} M) ;
- un analogue de la superoxyde dismutase, le Tempol (10^{-4} M).

La sévérité de l'arthrite a été évaluée par mesure du score arthritique, du score radiographique des pattes arrière et des taux sériques de TNFα et d'IL-1β.

2.2.3 Principaux résultats

Nos résultats montrent que, au niveau des ACM, l'arthrite induite à l'adjuvant :

- ne provoque aucune altération des aspects structurels et biomécaniques ;
- ne provoque pas d'altération de la réponse contractile ni de la réponse relaxante endothélium-indépendante ;
- provoque une baisse de la relaxation endothélium-dépendante à l'Ach, à la BK et à l'ADP.

L'étude des mécanismes a montré que la DE est secondaire à une moindre activité NOS, à un déficit en BH_4, une augmentation de l'activité d'arginase et une surproduction d'anions superoxydes. Les études immunohistochimiques ont confirmé l'existence d'une surexpression endothéliale d'arginase 2 et de $p47^{phox}$.

Le traitement chronique par nor-NOHA ne modifie pas la sévérité de l'atteinte arthritique. Pour autant, il restaure totalement la fonction endothéliale au niveau des ACM du rat AIA, via une augmentation de l'activité NOS, une correction du déficit en BH_4 et une baisse de la production d'anions superoxydes.

Author's personal copy

Translational Stroke Research
https://doi.org/10.1007/s12975-019-00699-7

ORIGINAL ARTICLE

Vascular Arginase Is a Relevant Target to Improve Cerebrovascular Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis: Evidence from the Model of Adjuvant-Induced Arthritis

Romain Bordy[1] · Aurore Quirié[2] · Christine Marie[2] · Daniel Wendling[3,4] · Perle Totoson[1] · Céline Demougeot[1]

Received: 27 November 2018 / Revised: 6 February 2019 / Accepted: 7 March 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Emerging data revealed that rheumatoid arthritis (RA) is associated with higher risk of cerebrovascular diseases. Whereas cerebral endothelial dysfunction is acknowledged as a critical aspect of cerebrovascular diseases, its presence in RA and the mechanisms involved are currently unknown. By using the model of rat adjuvant-induced arthritis (AIA), the present study investigated cerebrovascular reactivity in pressurized middle cerebral arteries (MCA) on day 33 post-immunization. The results revealed that arthritis induced a dramatic decrease in the vasodilatory response to acetylcholine (ACh), ADP, and bradykinin (n = 7–9 arteries, $p < 0.0001$). By using nor-NOHA, L-NAME, BH_4, and Tempol, the results showed that the reduced response to ACh relied on arginase overactivation ($n = 8$), low NOS activity ($n = 8$), BH_4 deficiency ($n = 9$), and excessive superoxide production ($n = 9$). Immunohistological analysis revealed an endothelial upregulation of arginase 2 ($p < 0.05$, n = 5–6) and NADPH oxidase ($p < 0.05$, n = 5–7) while eNOS expression was unchanged in AIA ($n = 6$). To assess whether arginase inhibition may be a relevant therapeutic, AIA rats were treated with an arginase inhibitor (nor-NOHA, 40 mg/kg/day, i.p., $n = 20$ rats) daily from day 10 to day 33 post-immunization. The treatment alleviated the impaired response of MCA to endothelium-dependent agonists, through an increase in NOS signaling and a suppression of BH_4 deficiency and superoxide overproduction. By contrast, it did not change the course of arthritis. In conclusion, arthritis induced a cerebrovascular endothelial dysfunction involving an imbalance in the arginase/NOS pathway. Arginase inhibition appears as a promising therapy beyond anti-rheumatic drugs for reducing the risk of cerebrovascular diseases in RA.

Keywords Arthritis · Middle cerebral artery · Endothelial dysfunction · Arginase

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common systemic autoimmune disease with the leading cause of death being due to cardiovascular (CV) and cerebrovascular complications [1]. The reasons for the excess CV risk in RA are not fully understood but a role of endothelial dysfunction (ED) is largely suspected [2, 3]. Consistently, animal and clinical studies showed that RA is associated with ED in vascular beds from the peripheral vasculature, including conduit arteries, which is the predominant location of atheroma plaques development [4], and resistance arteries [5], which supply oxygen and nutrients to the tissues and control inflammation and repair in the tissues. Surprisingly, the presence of ED in the cerebrovasculature has never been investigated in RA while RA is not only associated with a higher risk of stroke with OR ranging from 1.73 to 2.12 compared with the general population [6], but also with a higher risk of cognitive impairments,

Perle Totoson and Céline Demougeot contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s12975-019-00699-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Céline Demougeot
cdemouge@univ-fcomte.fr

[1] PEPITE EA 4267, FHU INCREASE, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

[2] INSERM UMR1093-CAPS, UFR Sciences de Santé, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

[3] EA 4266 « Agents Pathogènes et Inflammation », FHU INCREASE, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

[4] Service de Rhumatologie, CHU Minjoz, 25000 Besancon, France

Published online: 18 March 2019

Author's personal copy

dementias, or depression [6–10], i.e., brain diseases in which endothelial-based abnormalities reside center stage [11].

The production of nitric oxide (NO) by endothelial NO synthase is of utmost importance in the regulation of cerebrovascular function by endothelial cells [11]. Through this mechanism, endothelium normally exerts a chronic dilator influence on vessels throughout the brain, ranging from large cerebral arteries to small arterioles within the parenchyma [12–15]. In the peripheral vasculature, data from animal studies identified upregulation of the arginase pathway as a seminal mechanism of ED [16]. Indeed, vascular arginase competes with eNOS for their common substrate, L-arginine, thereby reducing NO production, promoting eNOS uncoupling, and leading to subsequent ED. Using the clinically relevant model of adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats, vascular arginase 2 upregulation was found to contribute to ED in aorta [17, 18], and a chronic treatment with an arginase inhibitor reversed aortic ED independently on disease activity and inflammation [19]. Nevertheless, whether arginase is involved in the control of endothelial function in cerebral arteries is currently unknown.

The present study tested the hypothesis that arthritis is associated with cerebral ED and that arginase upregulation and the subsequent decrease in NO production acts as a contributing event. For this purpose, vasoreactivity experiments were performed on middle cerebral arteries (MCA) collected from control and AIA rats, treated or not with an arginase inhibitor at a dosage previously shown to reverse ED in the peripheral vasculature [19].

Material and Methods

Details of the experimental procedure are provided in the Supplementary information.

Animals

Six-week-old male Lewis rats ($n = 100$) were purchased from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Animals were kept under a 12-h–12-h light-dark cycle and allowed free access to food and water. The experimental procedures were approved by the local committee for ethics in animal experimentation no. 2015-001-CD-5PR of Franche-Comté University (Besançon, France) and complied with the "Animal Research: Reporting In Vivo Experiments" ARRIVE guidelines.

Induction, Clinical, and Radiographic 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, clinically characterized by severe erythema and diffuse soft swelling with complete ankyloses, paw malformations, reduced locomotor activity, frequently associated with ears and tail inflammation, weight loss, anorexia, and diarrhea [20]. Rats were weighed and monitored 7 days per week for clinical signs of arthritis. The scoring system was employed as follows [21]: 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. A group of non-arthritic age-matched rats was used as controls and received saline at the base of the tail.

Tissue Collection

On day 33 after arthritis induction, a time at which ED was previously observed in conduit and resistance vessels of the systemic circulation from AIA [17, 22], rats were anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). Blood was withdrawn from the abdominal aorta and centrifuged at 3000*g* to obtain plasma stored at − 80 °C until analysis. Brain was immediately removed and placed in oxygenated ice-cold Krebs solution (mmol/L: NaCl 118, KCl 4.65, $CaCl_2$ 2.5, KH_2PO_4 1.18, $NaHCO_3$ 24.9, $MgSO_4$ 1.18, glucose 6, pH 7.4). First branch-free segments of left and right MCA most proximal to the circle of Willis were isolated. Immediately, one was embedded in OCT (Leica Biosystems, Richmond, USA) and frozen for immunohistochemical analyses while the other was used for vascular reactivity studies. Hind paws were harvested for radiographic analysis.

Radiographic Ex Vivo Analysis of Joints of Ankle and Foot

Radiographs of hind paws were performed with a block-matching algorithm high-resolution digital X-ray (40 mV, 10 mA)—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. [23], as described in details in Supplemental data. The maximum score for each rat is 40.

MCA Preparation for Vascular Reactivity

Isolated MCAs were cannulated on two glass micropipettes (diameter 100–125 μm) and secured with silk thread (diameter 20 μm) in a pressure myograph (Living System Instrumentation, Burlington, VT, USA) filled with Krebs solution warmed to 37 °C and oxygenated with 95% O_2, 5%

Author's personal copy

CO_2. Arteries were then pressurized to 80 mmHg in no flow condition, i.e., at ~ 80% of the animal's mean arterial pressure to approximate in vivo perfusion pressure (~ 100 mmHg) [24–26]. The chamber was placed atop an inverted microscope connected to a video camera and a calibrated video dimension analyzer to obtain lumen diameter and wall thickness measurements in micrometers (Living System Instrumentation, Burlington, VT, USA). Vessels were kept to equilibrate for 40 min to allow the development of myogenic tone. Before beginning the reactivity experiments, viability of the arteries was tested by the vasoconstriction to a high KCl Krebs solution (100 mmol/L). All the vessels included in the study generated a constriction to high KCl superior to 40%. Then MCAs were washed to baseline and constricted with serotonin (5-HT, 10^{-6} mol/L) before testing the presence of endothelium with bradykinin (BK, 10^{-6} mol/L). A dilatory response of at least 10% was considered indicative of a functional endothelium.

Endothelial Function and Mechanisms

Endothelial function was evaluated in MCAs from AIA and control rats by the vasodilatory response to acetylcholine (ACh) used as an endothelium-dependent agonist. For this purpose, pressurized MCAs were constricted with 5-HT (10^{-6} mol/L) and relaxed with cumulative concentrations of ACh (10^{-12}–10^{-4} mol/L). The relaxant effect of a single dose of adenosine diphosphate (ADP, 10^{-6} mol/L) and BK (10^{-6} mol/L), two other endothelium-dependent agonists, was also studied. To insure that the differences observed with ACh were not due to an impaired response of smooth muscle cells to NO, serotonin pre-constricted MCAs were relaxed with cumulative concentrations of a NO donor, sodium nitroprusside (SNP, 10^{-12}–10^{-4} mol/L). To determine the role of arginase, NO synthase, tetrahydrobiopterin (BH_4, cofactor of eNOS), and superoxide anions ($O_2^{-\circ}$) in ED, MCAs were incubated for 30 min before the cumulative concentration-response curve of ACh with the arginase inhibitor N_w-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA, 10^{-4} mol/L), the NOS inhibitor N_w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10^{-4} mol/L), BH_4 (10^{-7} mol/L), and the superoxide dismutase (SOD) mimetic Tempol (10^{-4} mol/L), respectively. To investigate the effect of arthritis on basal NOS activity, MCAs from control and AIA rats at basal tone were incubated with L-NAME (10^{-5} mol/L) and the subsequent contraction (calculated as % contraction = $((ID_0\text{-}ID_{time}) \times 100)/(ID_0)$ where ID_0 and ID_{time} are the internal diameter at the begin of the incubation and at each time (every 5 min), respectively) was recorded for 30 min.

Immunohistochemical Analysis

To determine whether ED in MCA from AIA rats relied on changes in endothelial protein synthesis, expressions of eNOS, arginase 2, and $p47^{phox}$ (a cytosolic-bound component of NADPH oxidase, a vascular enzyme upregulated in peripheral vessels from AIA and responsible for high $O_2^{-\circ}$ production [27, 28]) were assessed in MCAs from control and AIA rats by immunohistochemistry, as described in details in Supplemental Methods. Frozen MCA sections were exposed to eNOS, arginase 2, or $p47^{phox}$ antibody in the presence of an antibody directed against von Willebrand factor (vWF) used as a specific marker of endothelial cells. Slides were mounted with a medium with DAPI (a nuclear marker) and analyzed by using an epifluorescent microscope. Endothelial staining was quantified by using an automated method with ImageJ software.

Myogenic Tone, Structure, and Mechanical Properties

Myogenic tone was determined after increasing pressure by 20-mmHg steps from 0 to 160 mmHg in control and AIA rats. The structural properties of MCA were also evaluated by calculating the wall-to-lumen ratio (M/L ratio) and the cross-sectional area (CSA). The mechanical properties were assessed by calculating stress-strain relationships and the tangential elastic modulus β. Details of the methods are available in Supplemental data.

Drug Treatment

On the day of the first inflammatory symptoms (i.e., at day 10–11 post-immunization), AIA rats were randomized in two groups. One group received nor-NOHA (Bachem, France) at a dose of 40 mg/kg/day (i.p.) (AIA-norNOHA, $n = 20$) for 3 weeks, and the other group received saline at 1 mL/kg/day (i.p.) for 3 weeks (AIA-Vehicle, $n = 20$). Nor-NOHA is a potent selective arginase inhibitor interfering neither with NOS activity [29] nor with L-arginine uptake [30]. This dose regimen was chosen because it was previously shown to decrease AIA-induced aortic ED with no effect on arthritis severity [19], to improve endothelial function in peripheral resistance arteries from spontaneously hypertensive rats (SHR) with an effect superior to that of 10 mg/kg/day [31] but without apparent side effects and no change in plasma urea levels in SHR [31].

Plasma Cytokine Levels

Plasma levels of proinflammatory cytokines (interleukin-1β (IL-1β) and tumor necrosis factor-α (TNFα)) were measured by using Milliplex magnetic bead panel kits (eBioscience, Vienne, Austria) that were analyzed with a Luminex MAGPIX system (Luminex Corporation; Houston, TX) and Milliplex Analyst software (Millipore; St. Charles, MO). The limits of detection provided by the manufacturer for IL-1β and TNFα were 13 and 3.78 pg/mL, respectively.

Author's personal copy

Table 1 Basic characteristics

	Control	AIA	AIA-Vehicle	AIA-norNOHA
Body weight (g)	321 ± 1	222 ± 1*	228 ± 4*	222 ± 3*
Arthritis score	–	4.2 ± 0.0	4.1 ± 0.3	4.4 ± 0.2
Radiological score	–	28 ± 1	24 ± 5	27 ± 6
Plasma IL-1β (pg/mL)	37.1 ± 9	109.9 ± 26.8*	102.0 ± 15.2*	97.4 ± 18.3*
Plasma TNFα (pg/mL)	10.4 ± 2.1	41.1 ± 10.6*	38.0 ± 4.5*	30.1 ± 4.7*

Values are expressed as means ± SEM ($n = 9$ to 30 per group)

*$p < 0.05$ vs. controls

Data and Statistical Analysis

Values are presented as means ± SEM. Data were analyzed using GraphPad Prism software (version 5.3). Contractile responses to 5-HT were expressed as the percentage of the maximum response to KCl 100 mmol/L (calculated as % vasoconstriction = $((ID_{resting} - ID_{KCl}) \times 100)/(ID_{KCl})$ where $ID_{resting}$ and ID_{KCl} are the internal diameter after resting and after KCl constriction, respectively). Relaxant responses to ACh, ADP, BK, and SNP were expressed as the percentage

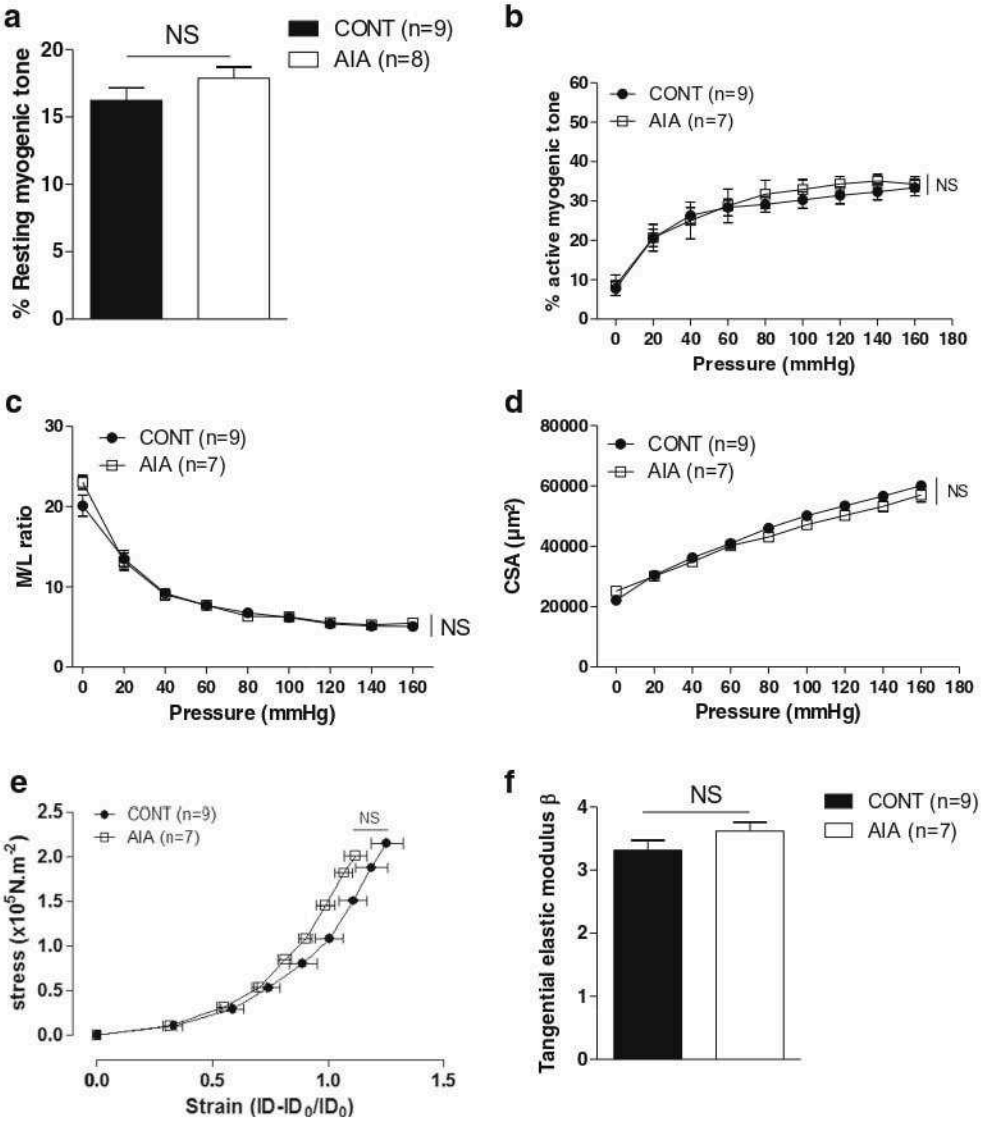


Fig. 1 Myogenic tone, structural, and mechanical properties of middle cerebral arteries from control (CONT) and arthritis (AIA) rats. Resting (**a**) and active (**b**) myogenic tone, media-to-lumen (M/L) ratio (**c**), the cross-sectional area (CSA) (**d**), strain/stress curve (**e**), and tangential elastic modulus β (**f**) were determined on day 33 post-immunization. Values are means ± SEM from n = number of artery segments from 7 to 9 rats per group. NS non-significant

Author's personal copy

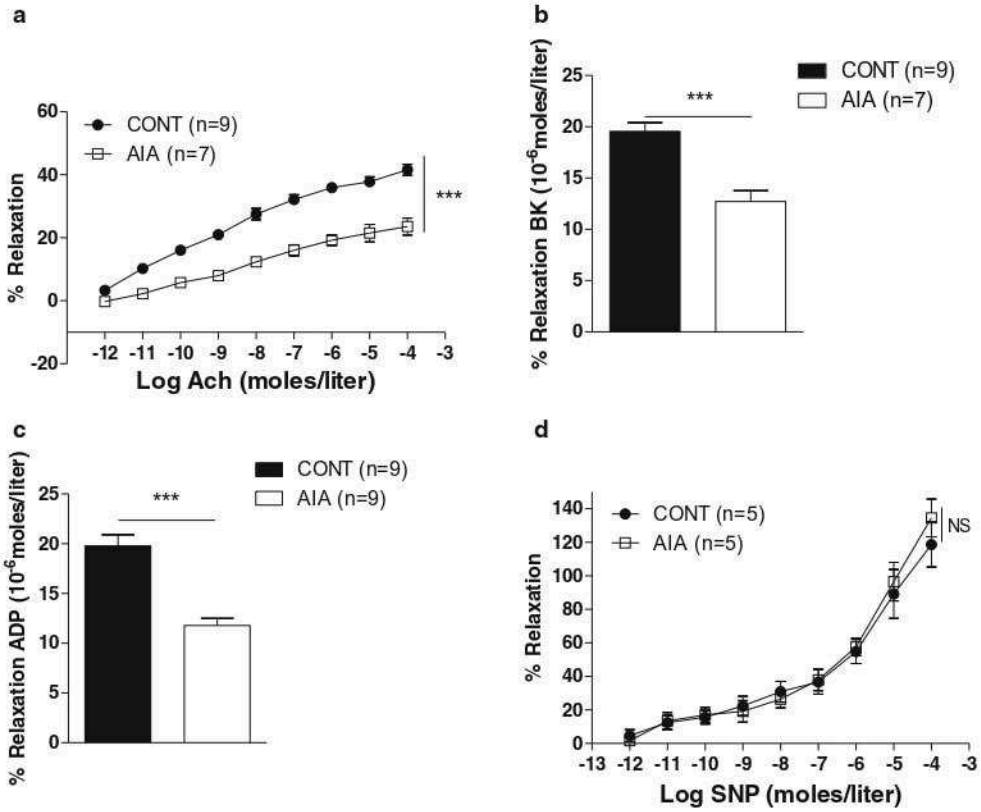


Fig. 2 Vascular reactivity to endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators. Experiments were performed on middle cerebral arteries from control (CONT) and arthritis (AIA) rats on day 33 post-immunization. Arteries were constricted with serotonin (10^{-6} mol/L) and relaxed with **a** cumulative concentrations of acetylcholine (ACh) or **d** sodium nitroprusside (SNP), or a unique concentration (10^{-6} mol/L) of **b** bradykinin (BK) and **c** adenosine diphosphate (ADP). Values are means ± SEM from n = number of artery segments from 5 to 9 rats per group. ***$p < 0.0001$. NS non-significant

of relaxation of the contractile response to 5-HT 10^{-6} mol/L. Concentration-response curves (control vs. AIA, or ACh with or without a specific inhibitor) were compared by two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures. Of note, as the concentration-response curves did not fit with the non-linear model of "symmetrical sigmoidal shape," Emax and EC50 could not be calculated. Comparison between two values was assessed by the unpaired Student t test or Mann-Whitney U test when data were not normally distributed. The relationship between endothelial function and another variable was investigated using Spearman's correlation coefficient; endothelial function was then expressed as the response to ACh evaluated from the values of areas under the curve (AUCs) of ACh-mediated dilation that were calculated from the individual concentration-response curves. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Basic Characteristics

As shown in Table 1, AIA rats exhibited a severe arthritis as reflected by high arthritis and radiological scores and higher levels of proinflammatory cytokines as compared to control rats.

Myogenic Tone, Myogenic Response, Structural, and Mechanical Properties of MCA

As shown in Fig. 1, resting myogenic tone, active myogenic tone, M/L ratio, CSA, stress-strain curve, and tangential elastic modulus β were not different between AIA and control rats. These data indicate that AIA had no effect on myogenic tone, structure, or stiffness of MCA, as previously observed in peripheral vessels [22].

Endothelial Function in MCA

The contractile response of MCAs to 5-HT (66 ± 4% in control and 72 ± 3% in AIA rats) and high KCl (47 ± 1% in control and 45 ± 2% in AIA rats) was not significantly different between controls and AIA rats, indicating that AIA did not impair the contractile machinery. These data also suggested that basal NOS activity was not impaired in AIA rats. Consistent with this hypothesis, as shown in supplemental Figure S1, increased tone in response to L-NAME incubation was not different between AIA and control rats. By contrast, AIA induced a lower relaxant response to ACh as compared to controls (Fig. 2a). Confirming the presence of ED, a significant impaired relaxation to BK and ADP was also observed in AIA as compared to controls (Fig. 2b, c). Of note, evidence that AIA did not alter the relaxant response of vascular smooth muscle cells to the NO donor SNP (Fig. 2d) ascertained that

Author's personal copy

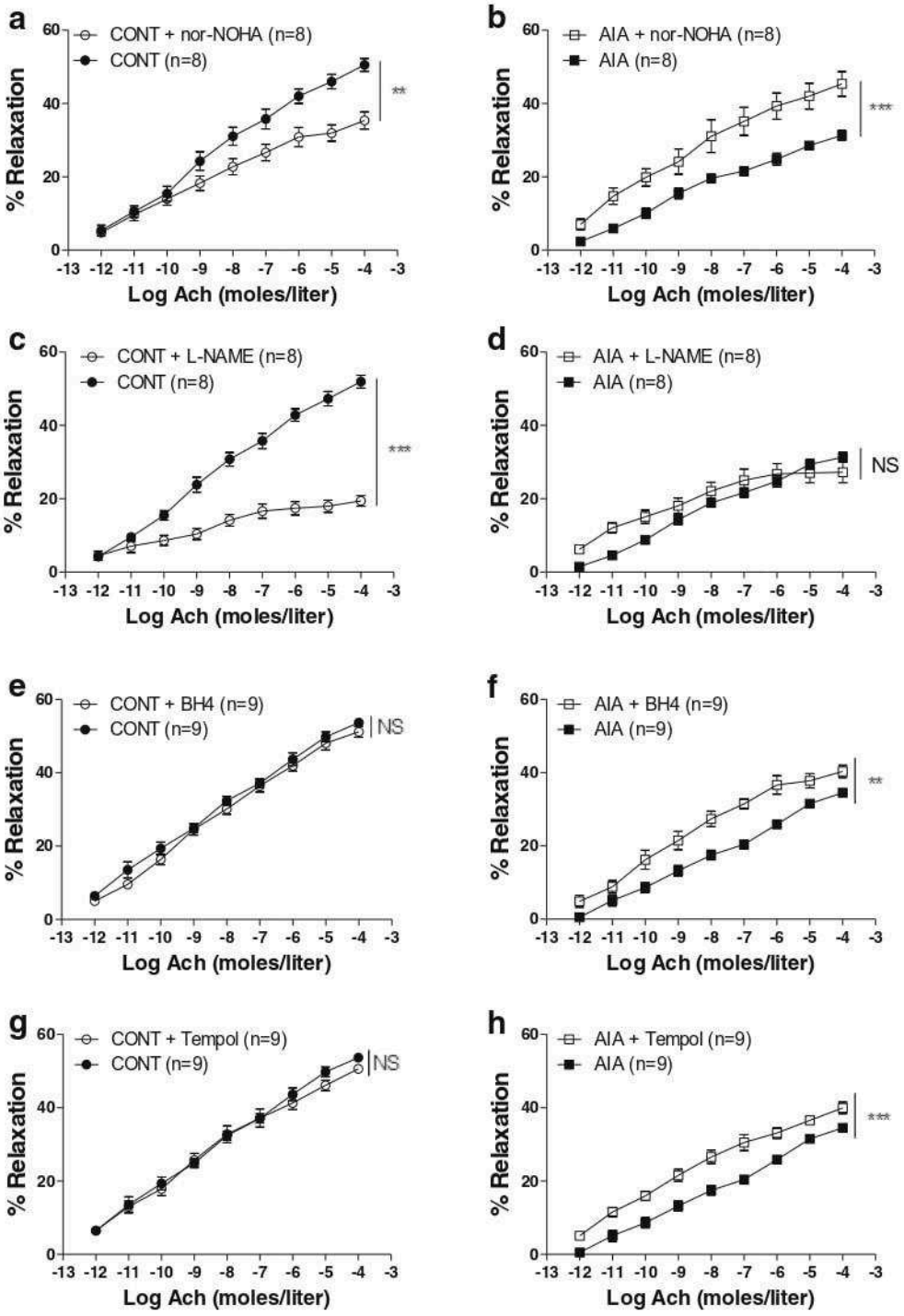


Fig. 3 Role of NOS/arginase/superoxide pathways in endothelial dysfunction. Experiments were conducted on middle cerebral arteries from control (CONT) and arthritis (AIA) rats on day 33 post-immunization. Cumulative concentration-response curves of ACh were obtained after incubation or not with nor-NOHA at 10^{-4} mol/L (**a**, **b**), L-NAME at 10^{-4} mol/L (**c**, **d**), BH_4 at 10^{-7} mol/L (**e**, **f**), or Tempol at 10^{-4} mol/L (**g**, **h**). Values are means ± SEM from n = number of artery segments from 8 to 9 rats per group. NS non-significant. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.0001$

AIA-induced decreased responses to endothelium-dependent agonists were indeed the consequence of ED.

Role of Arginase in Cerebrovascular Endothelial Dysfunction

As a reflection of an overactivated arginase, incubation of MCAs with the arginase inhibitor nor-NOHA significantly enhanced ACh-induced relaxation in AIA but not in controls in which an opposite effect was observed (Fig. 3a, b). Arginase overactivation translated into a dramatic reduction of eNOS activity as evidenced by the effect of L-NAME. L-NAME is a competitive NOS inhibitor used here to indirectly determine the intensity of ACh-induced NOS activation: the more the NOS is activated, the more the effect of L-NAME on vasodilation is. In control rats (Fig. 3c), consistent with a high

Author's personal copy

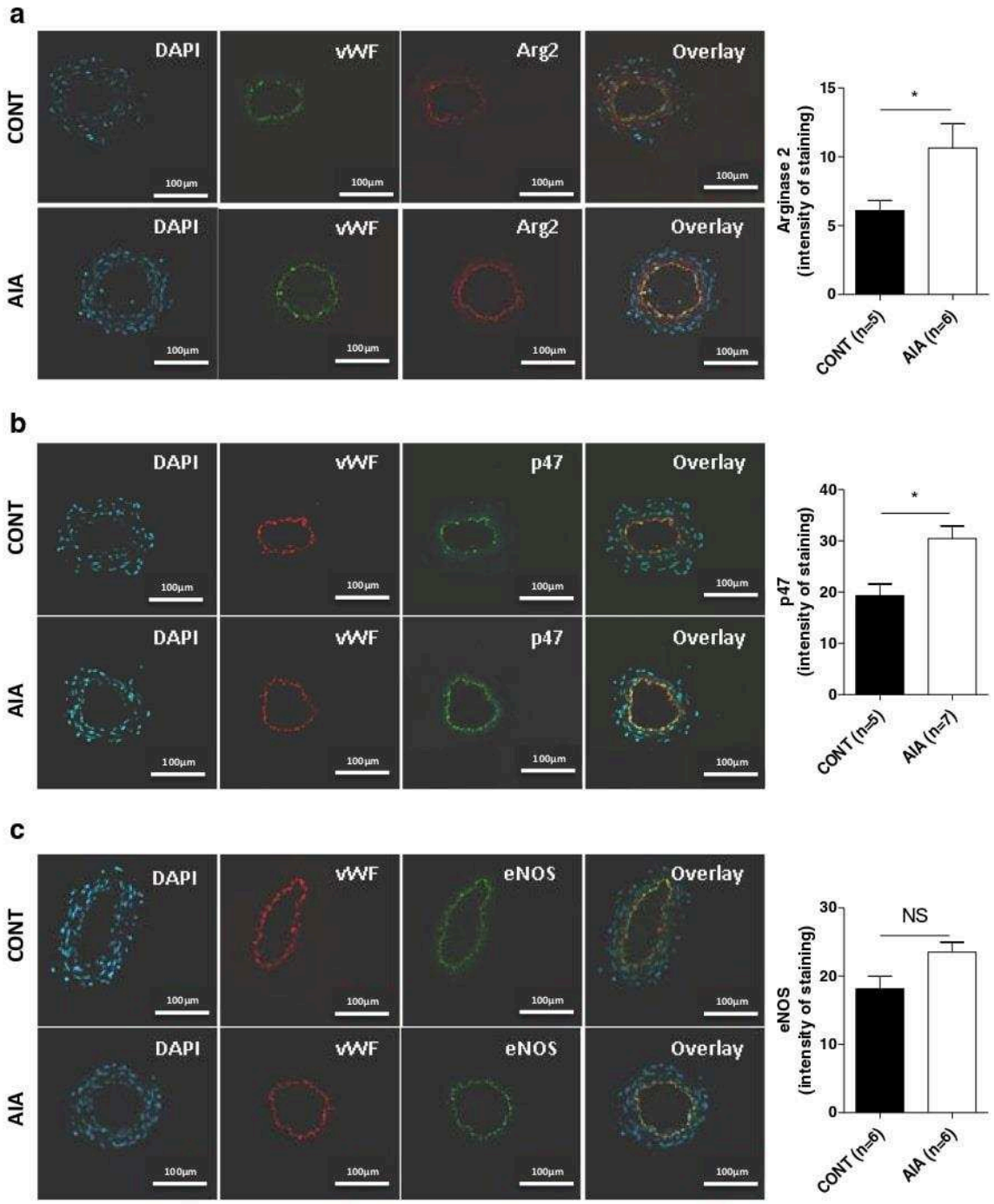
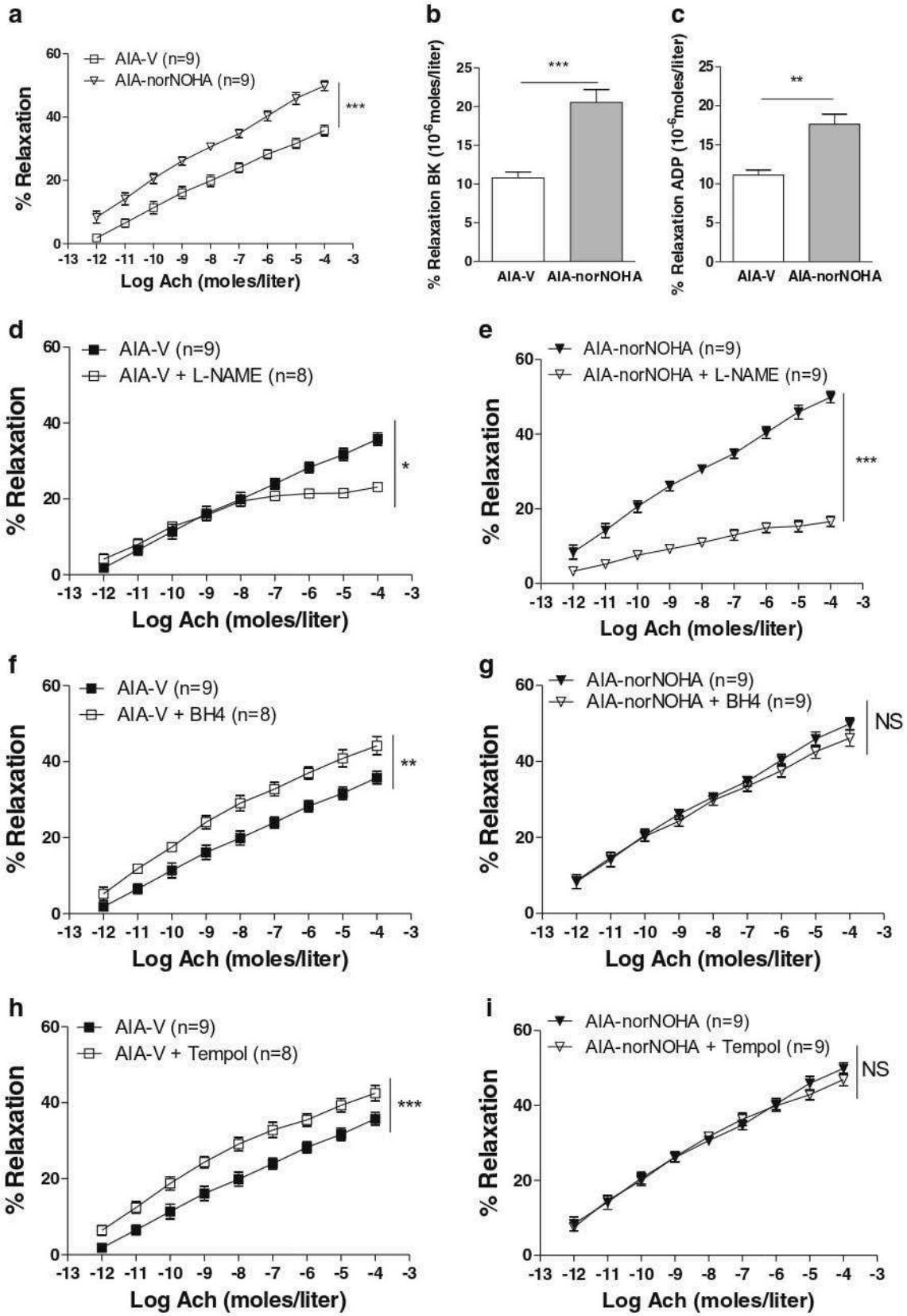


Fig. 4 AIA increased endothelial expression of arginase and NADPH oxidase. Experiments were conducted on middle cerebral arteries from control (CONT) and arthritis rats (AIA) on day 33 post-immunization. Representative images of protein immunohistochemistry staining for arginase 2 (**a**), p47phox (**b**), and eNOS (**c**) (scale bar 100 μm). DAPI is a nuclear marker (blue), and von Willebrand factor (vWF) is a marker of endothelial cells (green or red). Histograms represent the quantification of fluorescence intensity staining. Values are means ± SEM from n = number of artery segments from 5 to 7 rats per group. NS non-significant. *$p < 0.05$

NOS activation, L-NAME significantly blunted ACh-induced relaxation. By contrast, the inhibitor did not reduce ACh-induced relaxation in MCA from AIA rats (Fig. 3d), indicating that NOS activity was very low in these arteries, at least low enough to be fully inhibited by L-NAME at 10^{-4} mol/L. Furthermore, in favor of a BH_4 deficiency in AIA, incubation of MCAs with BH_4 significantly increased ACh relaxation in AIA (Fig. 3f) while it had no effect in controls (Fig. 3e). The same result on ACh-induced relaxation was obtained after incubation of MCAs with the SOD mimetic Tempol (Fig. 3g, h), indicating a deleterious $O_2^{-\circ}$ overproduction in AIA.

Author's personal copy



Author's personal copy

◀ **Fig. 5** Treatment with an arginase inhibitor markedly improved endothelial function. Experiments were conducted on middle cerebral arteries from arthritis rats daily treated with vehicle (AIA-V) or nor-NOHA (AIA-norNOHA) at the dose 40 mg/kg/day (i.p.) from day 10 to day 33 post-immunization. After constriction with serotonin (10^{-6} M), the vasodilating response to **a** cumulative concentrations of acetylcholine (ACh), **b** bradykinin (BK, 10^{-6} mol/L), and **c** adenosine diphosphate (ADP, 10^{-6} mol/L) was measured. Cumulative concentration-response curves of ACh were obtained after incubation or not with L-NAME at 10^{-4} mol/L (**d**, **e**), BH_4 at 10^{-7} mol/L (**f**, **g**), or Tempol at 10^{-4} mol/L (**h**, **i**). Values are means ± SEM from n = number of artery segments from 8 to 9 rats per group. NS non-significant. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.0001$

To determine whether the functional abnormalities observed in MCAs were related to impaired expression of the corresponding proteins, expression of arginase, eNOS, and p47 were studied by immunohistochemistry in AIA and controls. As shown in Fig. 4, arginase 2 was expressed in vWF-positive cells collected from control rats indicating a constitutive endothelial expression of the enzyme (Fig. 4a). AIA led to a strong endothelial upregulation of arginase 2 (+ 75% vs. controls, $p < 0.05$, Fig. 4a) but also of p47 (+ 58% vs. controls, $p < 0.05$, Fig. 4b) while it did not change eNOS expression (Fig. 4c).

Effect of a Chronic Treatment with an Arginase Inhibitor

To investigate the potential value of arginase inhibition to alleviate cerebrovascular ED in RA, reactivity of MCA was studied in AIA rats that received daily nor-NOHA from the first signs of inflammation for 3 weeks. Consistent with previous findings [19], treatment with the arginase inhibitor changed neither disease severity nor systemic inflammation (plasma levels of TNFα and IL-1β) as compared to AIA rats that received vehicle (Table 1). As regards the vascular reactivity of pressurized MCAs, no difference in passive myogenic tone, vascular response to 5-HT, or high KCl was observed between AIA-Vehicle and AIA-nor-NOHA (data not shown). By contrast, the arginase inhibitor dramatically enhanced the vasorelaxant response to ACh, BK, and ADP (Fig. 5a–c). More precisely, arginase inhibition fully reversed cerebral ED as attested by the value of vasodilation in response to ACh at 10^{-4} mol/L in the AIA-norNOHA group (48 ± 1%) that was even slightly but significantly greater than the value of vasodilation in response to ACh at 10^{-4} mol/L in the non-AIA control group from the first set of experiments (42 ± 1%, $p < 0.05$). Evidence that nor-NOHA enhanced the effect of L-NAME (Fig. 5e) and abolished the effects of both BH_4 (Fig. 5g) and Tempol on ACh-associated relaxation (Fig. 5i) supported arginase overactivation as a culprit for AIA-induced reduction in NOS activity, BH_4 deficiency, and $O_2^{-\circ}$ overproduction. Of note, endothelial function as assessed from AUC of ACh in both AIA-Vehicle and AIA-nor-NOHA rats did not correlate with arthritis scores ($r = 0.113$, $p = 0.518$, $n = 35$), plasma levels of IL-1β ($r = -0.068$, $p = 0.776$, $n = 20$), or TNFα ($r = -0.243$, $p = 0.288$, $n = 21$).

Discussion

Using the AIA model, the present study provided two novel findings. First, arthritis resulted in endothelial dysfunction of MCA. Second, this dysfunction was fully reversed by administration of the arginase inhibitor nor-NOHA, an effect disconnected from arthritis severity or biological inflammation.

Previous studies in animal models and RA patients identified the presence of ED in multiple vascular beds from the macro- and microcirculation [5] but only focused interest on the peripheral vasculature. The present results revealed that ED extends to the cerebral vasculature in AIA as evidenced by reduced endothelium-dependent relaxation of MCA, a resistance vessel of the cerebral circulation. They resonate with a recent study that reported decreased cerebrovascular reserve in RA patients [32]. Our present results also provided convincing arguments for a role of endothelial arginase upregulation in arthritis-induced cerebral ED. Indeed, arthritis led to a robust endothelial upregulation and overactivation of arginase 2, and arginase inhibition either ex vivo or in vivo fully reversed cerebral ED. As overly active arginase was previously reported to contribute to AIA-induced ED in aorta [18], it is tempting to propose vascular arginase upregulation as a "systemic" pathological state of endothelial cells in arthritis and arginase inhibition as an attractive strategy to prevent ED, either peripheral or cerebral, in RA patients. Consistent with this hypothesis, RA patients exhibited high circulating arginase activity as compared to healthy subjects [33]. However, whether changes in circulating arginase activity mirror changes in endothelial arginase activity remains to be determined.

The present study provided details on the connection between arginase overactivation and cerebral ED. As increased arginase activity in MCA from AIA coincided with a low NOS activity, BH_4 deficiency, and $O_2^{-\circ}$ overproduction, it is likely that overactive arginase contributed to eNOS uncoupling through a decrease in L-arginine availability. Indeed, in conditions where the substrate L-arginine is inadequate, or if the cofactor BH_4 is not available, eNOS becomes uncoupled and reduces molecular oxygen instead of L-arginine, producing $O_2^{-\circ}$ instead of NO [17, 34]. In turn, $O_2^{-\circ}$ may oxidize BH_4 to BH_2, thus reinforcing uncoupling [34]. In favor of this hypothesis are the results of the in vivo study in which the arginase inhibitor efficiently alleviated cerebral ED through a decrease in $O_2^{-\circ}$ and a recovery of normal eNOS activity and BH_4 availability. However, eNOS uncoupling is probably not the unique source of $O_2^{-\circ}$ in cerebral arteries in AIA, and increased expression of NADPH oxidase may also be involved as evidenced by higher expression of this enzyme in AIA compared to controls. Of note, in MCA from control

Author's personal copy

rats, nor-NOHA unexpectedly did not improve but decreased ACh-induced relaxation. Even though nor-NOHA is considered to be neither a substrate nor an inhibitor of NOS [29, 35], one hypothesis might be that, at least in cerebral arteries and in physiological conditions, nor-NOHA may compete or inhibit NOS. Given that the guanidinium group of nor-NOHA binds to arginase by displacing the metal-bridging hydroxide ion of the enzyme and asymmetrically joining to the binuclear manganese cluster [36], another hypothesis might be that, rather than binding to the hydroxyl group of arginase, the guanidinium group of nor-NOHA may bind to other active enzymes that can interfere with the relaxant effect of ACh.

A point that remains to be solved concerns the mechanisms involved in arthritis-induced endothelial arginase upregulation in MCA. Arginase upregulation was a recognized response to proinflammatory cytokine exposure [16] or inflammatory conditions [37, 38]. However, this mechanism was unlikely in AIA as cerebral ED correlated neither with arthritis score nor with cytokine levels. More convincing, restoration of cerebral ED by arginase inhibition occurred without reduction of arthritis severity. The disconnection between cerebral ED and inflammation in AIA is in accordance with clinical studies showing that a better control of RA disease activity and systemic inflammation did not change the prevalence of ischemic cerebrovascular disease. Current data from large cohorts of RA patients indicated that the available anti-rheumatic pharmacotherapy alone, albeit effective on arthritis severity, seems unlikely to equally reduce the risk of stroke [39–41] or to improve cognitive impairments, dementias, or depression [42]. In a small cohort of RA women [38], treatment with biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) (including anti-TNFα) or with a conventional DMARD (methotrexate) that both efficiently controlled disease activity did not restore the cerebrovascular reserve capacity to the level of healthy patients. In addition, in a retrospective study that investigated the prevalence of RA patients among patients with acute ischemic cerebrovascular disease taking into account the evolution of anti-rheumatic treatments between 2002 and 2018 [43], the results showed that a better control of RA disease activity and systemic inflammation assessed by CRP levels from 2010 to 2018 did not change the prevalence of RA patients among patients with acute ischemic cerebrovascular disease as compared to 2002–2010. Moreover, the increased circulating arginase activity observed in RA patients [33] was unrelated to disease activity. By contrast, high levels of $O_2^{-\circ}$ delivered from uncoupled eNOS and NAPDH oxidase might contribute to increase arginase activity as oxidative species were reported to increase arginase activity/expression in endothelial cells [42].

In conclusion, the present study suggested that the high risk of stroke and cognitive impairment in RA patients could relate to the presence of ED in the cerebrovasculature and that this risk might be controlled by treatment with an arginase inhibitor. It is noteworthy that arginase inhibition was previously found not only to reduce the deleterious effects of stroke [44] but also to increase brain levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [45], a neurotrophin playing a seminal role in cognition including neuroplasticity, learning, and memory [46]. In arthritis, arginase inhibition restored ED, either cerebral or peripheral, but did not reduce disease activity. From a translational perspective, as the available clinical data suggested that achieving low arthritis activity or remission would not guarantee the normalization of cerebral endothelial function, arginase inhibitors would be useful as a vascular-specific add-on therapy in RA patients, whatever their anti-rheumatic therapy. Finally, this study identified the AIA model as a relevant model for screening future treatments of RA-related cerebrovascular dysfunction.

Acknowledgements The authors thank M. Nappey-Tournier for her technical assistance for tissue collection.

Authors' Contributions RB, DW, PT, and CD planned and conceived the study. RB, AQ, and PT performed experiments. RB, CM, PT, and CD interpreted the data. 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.

Compliance with Ethical Standards

The experimental procedures were approved by the local committee for ethics in animal experimentation no. 2015-001-CD-5PR of Franche-Comté University (Besançon, France) and complied with the "Animal Research: Reporting In Vivo Experiments" ARRIVE guidelines.

Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Aviña-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. https://doi.org/10.1002/art.24092.
2. England BR, Thiele GM, Anderson DR, Mikuls TR. Increased cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: mechanisms and implications. BMJ. 2018;361:k1036. https://doi.org/10.1136/bmj.k1036.
3. Prati C, Demougeot C, Guillot X, Godfrin-Valnet M, Wendling D. Endothelial dysfunction in joint disease. Joint Bone Spine. 2014;81:386–91. https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2014.01.014.
4. Arida A, Protogerou AD, Kitas GD, Sfikakis PP. Systemic inflammatory response and atherosclerosis: the paradigm of chronic inflammatory rheumatic diseases. Int J Mol Sci. 2018;19:1890. https://doi.org/10.3390/ijms19071890.
5. Bordy R, Totoson P, Prati C, Marie C, Wendling D, Demougeot C. Microvascular endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. 2018;14:404–20. https://doi.org/10.1038/s41584-018-0022-8.

Author's personal copy

6. Wiseman SJ, Ralston SH, Wardlaw JM. Cerebrovascular disease in rheumatic diseases: a systematic review and meta-analysis. Stroke. 2016;47:943–50. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.012052.
7. Atzeni F, Pipitone N, Iaccarino L, Masala IF, Weiss R, Alciati A, et al. Rheumatic diseases and autoimmune vascular dementia. Autoimmun Rev. 2017;16:1265–9. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.10.011.
8. Wolfe F. Fatigue assessments in rheumatoid arthritis: comparative performance of visual analog scales and longer fatigue questionnaires in 7760 patients. J Rheumatol. 2004;31:1896–902.
9. Meade T, Manolios N, Cumming SR, Conaghan PG, Katz P. Cognitive impairment in rheumatoid arthritis: a systematic review. Arthritis Care Res. 2018;70:39–52. https://doi.org/10.1002/acr.23243.
10. Shin SY, Katz P, Wallhagen M, Julian L. Cognitive impairment in persons with rheumatoid arthritis. Arthritis Care Res. 2012;64:1144–50. https://doi.org/10.1002/acr.21683.
11. Hu X, De Silva TM, Chen J, Faraci FM. Cerebral vascular disease and neurovascular injury in ischemic stroke. Circ Res. 2017;120:449–71. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308427.
12. Elhusseiny A, Hamel E. Muscarinic-but not nicotinic-acetylcholine receptors mediate a nitric oxide-dependent dilation in brain cortical arterioles: a possible role for the M5 receptor subtype. J Cereb Blood Flow Metab. 2000;20:298–305. https://doi.org/10.1097/00004647-200002000-00011.
13. Baumbach GL, Sigmund CD, Faraci FM. Structure of cerebral arterioles in mice deficient in expression of the gene for endothelial nitric oxide synthase. Circ Res. 2004;95:822–9. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000146279.11923.14.
14. Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. Physiol Rev. 1998;78:53–97. https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.53.
15. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. Pharmacol Rev. 2009;61:62–97. https://doi.org/10.1124/pr.108.000547.
16. Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, Narayanan SP, Caldwell RB. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. Physiol Rev. 2018;98:641–65. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2016.
17. 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;16:202. https://doi.org/10.1186/ar4450.
18. 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;63:2309–17. https://doi.org/10.1002/art.30391.
19. 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. https://doi.org/10.1186/ar3860.
20. Oliver SJ, Brahn E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. J Rheumatol Suppl. 1996;44:56–60.
21. 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. https://doi.org/10.1038/nature02119.
22. Totoson P, Maguin-Gaté 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 Rheum. 2015;67:1203–13. https://doi.org/10.1002/art.39065.
23. Ackerman NR, Rooks WH, 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. https://doi.org/10.1002/art.1780221208.
24. Verhoeven F, Totoson P, Marie C, Prigent-Tessier A, Wendling D, Tournier-Nappey M, et al. Diclofenac but not celecoxib improves endothelial function in rheumatoid arthritis: a study in adjuvant-induced arthritis. Atherosclerosis. 2017;266:136–44. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.09.033.
25. Brooks SD, DeVallance E, d'Audiffret AC, et al. Metabolic syndrome impairs reactivity and wall mechanics of cerebral resistance arteries in obese Zucker rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2015;309:H1846–59. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00691.2015.
26. Anwar MA, Eid AH. Determination of vascular reactivity of middle cerebral arteries from stroke and spinal cord injury animal models using pressure myography. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2016;1462:611–24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3816-2_33.
27. Haruna Y, Morita Y, Komai N, Yada T, Sakuta T, Tomita N, et al. Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis: vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase and uncoupled endothelial nitric oxide synthase. Arthritis Rheum. 2006;54:1847–55. https://doi.org/10.1002/art.21891.
28. 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;56:1827–35. https://doi.org/10.1002/art.22632.
29. Tenu JP, Lepoivre M, Moali C, Brollo M, Mansuy D, Boucher JL. Effects of the new arginase inhibitor N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine on NO synthase activity in murine macrophages. Nitric Oxide Biol Chem. 1999;3:427–38. https://doi.org/10.1006/niox.1999.0255.
30. Topal G, Topal J-LG, Brunet A, et al. Mitochondrial arginase II modulates nitric-oxide synthesis through nonfreely exchangeable L-arginine pools in human endothelial cells. J Pharmacol Exp Ther. 2006;318:1368–74. https://doi.org/10.1124/jpet.106.103747.
31. 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;26:1110–8. https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3282fcc357.
32. Oláh C, Kardos Z, Sepsi M, Sas A, Kostyál L, Bhattoa HP, et al. Assessment of intracranial vessels in association with carotid atherosclerosis and brain vascular lesions in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2017;19:213. https://doi.org/10.1186/s13075-017-1422-x.
33. Chandrasekharan UM, Wang Z, Wu Y, Wilson Tang WH, Hazen SL, Wang S, et al. Elevated levels of plasma symmetric dimethylarginine and increased arginase activity as potential indicators of cardiovascular comorbidity in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2018;20:123. https://doi.org/10.1186/s13075-018-1616-x.
34. Luo S, Lei H, Qin H, Xia Y. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. Curr Pharm Des. 2014;20:3548–53. https://doi.org/10.2174/13816128113196660746.
35. Daghigh F, Fukuto JM, Ash DE. Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, NG-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase. Biochem Biophys Res Commun. 1994;202:174–80. https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1909.
36. Cox JD, Cama E, Colleluori DM, Pethe S, Boucher JL, Mansuy D, et al. Mechanistic and metabolic inferences from the binding of substrate analogues and products to arginase. Biochemistry. 2001;40:2689–701. https://doi.org/10.1021/bi002318+.

Author's personal copy

37. Quirié A, Demougeot C, Bertrand N, Mossiat C, Garnier P, Marie C, et al. Effect of stroke on arginase expression and localization in the rat brain. Eur J Neurosci. 2013;37:1193–202. https://doi.org/10.1111/ejn.12111.
38. Akazawa Y, Kubo M, Zhang R, Matsumoto K, Yan F, Setiawan H, et al. Inhibition of arginase ameliorates experimental ulcerative colitis in mice. Free Radic Res. 2013;47:137–45. https://doi.org/10.3109/10715762.2012.756980.
39. Tam H-W, Chen C-M, Leong P-Y, Chen CH, Li YC, Wang YH, et al. Methotrexate might reduce ischemic stroke in patients with rheumatoid arthritis: a population-based retrospective cohort study. Int J Rheum Dis. 2018;21:1591–9. https://doi.org/10.1111/1756-185X.13267.
40. Roubille C, Richer V, Starnino T, McCourt C, McFarlane A, Fleming P, et al. 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;74:480–9. https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206624.
41. Matcham F, Galloway J, Hotopf M, Roberts E, Scott IC, Steer S, et al. The impact of targeted rheumatoid arthritis pharmacologic treatment on mental health: a systematic review and network meta-analysis. Arthritis Rheum. 2018;70:1377–91. https://doi.org/10.1002/art.40565.
42. Chandra S, Romero MJ, Shatanawi A, Alkilany AM, Caldwell RB, Caldwell RW. Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. Br J Pharmacol. 2012;165:506–19. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01584.x.
43. Hashimoto H, Kawamura M, Yukami T, Ishihara M, Bamba Y, Kaneshiro S, et al. Etiology of acute ischaemic cerebrovascular disease associated with rheumatoid arthritis: changes with progression of anti-inflammatory therapy. Eur J Neurol. 2018;12:1462–9. https://doi.org/10.1111/ene.13751.
44. Barakat W, Fahmy A, Askar M, El-Kannishy S. Effectiveness of arginase inhibitors against experimentally induced stroke. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2018;391:603–12. https://doi.org/10.1007/s00210-018-1489-1.
45. Pedard M, Demougeot C, Prati C, Marie C. Brain-derived neurotrophic factor in adjuvant-induced arthritis in rats. Relationship with inflammation and endothelial dysfunction. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry. 2018;82:249–54. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.11.006.
46. Lu B, Nagappan G, Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. Handb Exp Pharmacol. 2014;220:223–50. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_9.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

2.3 3ème étude

Le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant est un modèle pertinent pour mimer la dysfonction endothéliale coronarienne et les atteintes myocardiques dans la polyarthrite rhumatoïde

2.3.1 Contexte et objectifs

Cette troisième étude s'intéresse à la DE au niveau des artères coronaires et à la susceptibilité myocardique à l'ischémie en cas d'arthrite. En effet, la première cause de mortalité dans la PR est l'ischémie myocardique avec une augmentation de 68 % de l'incidence d'IDM par rapport à la population générale [75]. Deux aspects mécanistiques sont suspectés : une DE coronarienne et une atteinte fonctionnelle cardiaque.

Concernant le versant dysfonctionnel de l'endothélium, il a été mis en évidence chez le patient PR une DE épicardique avec la présence de plaques d'athérome, mais aussi une DE microvasculaire suggérée par la présence d'une ischémie atypique en l'absence d'obstruction coronaire [78]. Cette hypothèse est confirmée par plusieurs études cliniques qui montrent par le biais de la CFR la présence d'une DE à l'étage coronarien [187,188,190,418,419]. Aucune donnée n'est disponible concernant les mécanismes impliqués dans la DE coronarienne, et aucun marqueur de cette atteinte n'a été identifié. Au niveau expérimental, une seule étude a rapporté l'existence d'une dysfonction endothéliale coronarienne dans un modèle CIA réalisé chez le mouton [420], mais aucune étude ne s'est intéressée aux modèles murins.

Cette DE coronarienne pourrait conduire à une augmentation du risque d'IDM *via* le développement athéromateux ou *via* une ischémie silencieuse en raison de l'atteinte microvasculaire [78]. De plus, il est également retrouvé chez le patient PR des anomalies myocardiques (indépendante de la DE coronarienne) qui pourraient conduire à une exagération de la susceptibilité à l'ischémie myocardique (fibrose, inflammation, …) [95,96]. En accord avec ces données, il est démontré que le risque d'IC est fortement augmenté chez le patient PR par rapport à la population générale [75], et est plus fréquemment associée à une fraction d'éjection préservée par rapport aux patients IC non-PR [90]. Le patient PR présente une dysfonction systolique et/ou diastolique [86,91], avec des atteintes structurales (hypertrophie cardiaque, remodelage, fibrose) et fonctionnelles (dysfonction ventriculaire gauche) [91–93,96]. D'un point de vue expérimental, il a été

rapporté chez le rat AIA, en comparaison à des rats contrôles, une augmentation de l'inflammation cardiaque et du stress oxydant [421–423]. En effet, il est montré une infiltration des cellules immunitaires au sein du tissu cardiaque qui vont sécréter *in situ* des cytokines pro-inflammatoires, qui vont entretenir l'inflammation cardiaque et augmenter la production de ROS au sein du cardiomyocyte [424]. De plus, les cellules immunitaires (PNN et macrophages) contiennent une enzyme, la myéloperoxidase (MPO) aux propriétés pro-oxydatives et pro-inflammatoires qui va également entretenir l'inflammation et l'oxydation cardiaques locales [425]. Ainsi, la MPO est un bon marqueur de l'inflammation cardiaque puisqu'elle reflète l'infiltration immunitaire locale. En plus de cela, il a été rapporté une fibrose plus importante dans le ventricule gauche chez le rat AIA par rapport aux contrôles [421], provoquée par les cytokines pro-inflammatoires TNFα, IL-1β et IL-6 conduisant à l'augmentation de la synthèse et du dépôt de collagène provoquant la fibrose et le remodelage ventriculaire [426,427]. En accord avec ces données, il a été montré dans un modèle de souris transgénique surexprimant le TNFα le développement progressif d'une fibrose myocardique, d'une dysfonction diastolique et d'un remodelage cardiaque [428]. Ces anomalies ont été confirmées par des études dans le modèle murin CIA [429] et chez des singes spontanément arthritiques [89]. Toutefois, la susceptibilité à l'ischémie myocardique chez le rat AIA n'a encore jamais été explorée.

Aussi, l'Ang II semble être impliquée dans l'hyperproduction de ROS, l'inflammation et la fibrose cardiaques. Dans ce sens, il a été montré dans le modèle AIA que l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion (ramipril, 10 mg/kg/j) réduit ces trois anomalies [421], et à l'inverse, l'activation du récepteur AT_1 chez la souris conduit à exacerbation de ces trois anomalies [430].

L'objectif de cette étude a été de déterminer la pertinence du modèle AIA pour l'étude de la dysfonction vasculaire coronaire et de la susceptibilité à l'ischémie cardiaque en cas de PR.

2.3.2 Méthodologie

Les expériences ont été menées sur des rats contrôles et des rats AIA. A J33 post-induction les rats sont mis à mort :

- une série expérimentale a été dédiée à l'étude de la fonction coronaire. Pour ce faire des coronaires épicardiques isolées ont été montées en conditions isométriques sur le myographe de Mulvany afin d'en étudier :
    - la réactivité à différents agents vasoconstricteurs (sérotonine, noradrénaline, phényléphrine, endothéline-1, angiotensine II et U46619, un analogue du thromboxane A2)
    - la fonction endothéliale en réponse à des doses cumulatives d'Ach.

  Cette série a également été utilisée afin de prélever le plasma pour en doser les taux d'endothéline-1 et angiotensine II plasmatiques par ELISA.

- une deuxième série expérimentale a été utilisée pour l'étude de la fonction cardiaque et de la réponse à l'ischémie sur cœur isolé perfusé selon la méthode de Langendorff, soumis à 30 minutes d'ischémie suivies de 30 minutes de reperfusion. Il a été évalué :
    - le débit coronaire ;
    - la zone infarcie en fin de reperfusion avec la coloration au chlorure de triphényltétrazolium (TTC) ;
    - les taux de lactate déshydrogénase (LDH) et de créatine phosphokinases (CPK) dans les effluents coronaires, marqueurs de la souffrance myocardique ;
    - l'activité des myéloperoxidases (MPO) myocardiques comme reflet de l'infiltration leucocytaire au niveau myocardique ;
    - l'hypertrophie cardiaque.

Les expériences de cette deuxième série ont été réalisées par Maxime Hector, le Dr Sylvie Devaux et le Dr Johnny Moretto.

2.3.3 Principaux résultats

Nos résultats montrent que les rats atteints d'arthrite induite à l'adjuvant présentent, en comparaison avec le groupe contrôle :

- une DE coronarienne attestée par une diminution de la relaxation à l'Ach ;
- des taux plasmatiques en ET-1 et Ang II augmentés, négativement corrélés avec la FE ;
- une inflammation cardiaque attestée par un taux tissulaire augmenté de l'activité des MPO myocardiques ;
- une hypertrophie cardiaque montrée par une augmentation du rapport entre la masse cardiaque et la masse corporelle totale ;
- une susceptibilité accrue à l'ischémie myocardique augmentée attestée par une augmentation de taille de la zone infarcie et une augmentation des taux de LDH et CPK dans les effluents coronaires.

Adjuvant-induced arthritis is a relevant model to mimic coronary endothelial dysfunction and myocardial impairments in rheumatoid arthritis

Romain Bordy (MSc, PharmD)[1], Johnny Moretto (PhD, PharmD)[1],

Sylvie Devaux (PhD, PharmD)[1], Daniel Wendling (PhD, MD)[2,3],

Karena Moretto-Riedweg (MSc, PharmD)[4], Céline Demougeot (PhD, PharmD)[1*],

Perle Totoson (PhD, PharmD)[1,#*]

*contribute equally to the work

[1] PEPITE EA 4267, FHU INCREASE, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000, Besançon, France

[2] EA 4266 EPILAB, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000, Besançon, France

[3] Service de Rhumatologie, CHU Minjoz, F-25000 BESANCON, France.

[4] Laboratoire de Biochimie Médicale, CHU Minjoz, F-25000 BESANCON, France.

[#] **Corresponding author:**

Dr. Perle TOTOSON

PEPITE EA 4267, 19 rue Ambroise Paré, bâtiment S, 25030 BESANCON cedex, FRANCE.

Tel: (33) 3 63 08 23 29

E-mail address: perle.totoson@univ-fcomte.fr

Total word count of the manuscript: 3.478/4.200

Running title: coronary dysfunction and myocardial impairment in adjuvant-induced arthritis.

Abstract 236words

Objective. Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by increased cardiovascular (CV) mortality primarily due to heart diseases, but the mechanisms involved are poorly understood. The present study aimed to characterize coronary and cardiac impairments as well as myocardial susceptibility to ischemia in the rat model of adjuvant-induced arthritis.

Methods. On day 33 post-immunization, coronary reactivity was assessed in isolated arteries. Cardiac function was studied in isolated perfused hearts, before and after global ischemia/reperfusion. The severity of ischemic insult was evaluated by measure of infarct size and LDH and CPK levels in coronary effluents. Cardiac inflammation was determined by cardiac TNF-α levels and myeloperoxidase (MPO) activity. Plasma angiotensin II (Ang-II) and endothelin-1 (ET-1) levels were also measured.

Results. Compared to non-arthritic control rats, coronary arteries from AIA had a reduced ACh-induced relaxation, which negatively correlated with plasma levels of ET-1 and Ang-II. Hearts from AIA displayed higher TNFα and myeloperoxidase (MPO) levels as well cardiac hypertrophy. Although cardiac function at baseline was not different from controls, AIA had lower cardiac functional recovery, higher infarct size and increased LDH and CPK levels after ischemia/reperfusion.

Conclusions. The rat AIA model displays coronary endothelial dysfunction associated with cardiac hypertrophy, inflammation, leading to a reduced myocardial tolerance to ischemia. This model might be useful for deciphering the pathophysiology and pharmacology of CV dysfunction in RA. Present data identified plasma levels of Ang-II and ET-1 as putative biomarkers of CV risk in RA.

Key words: adjuvant-induced arthritis - coronary dysfunction - heart dysfunction - ischemia/reperfusion

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune and inflammatory disease that destroys the joint synovial membrane, cartilage and bone. Patients with RA have increased cardiovascular (CV) mortality with respect to the general population (1,2), primarily due to coronary heart diseases (3). A recent prospective population-based cohort study concluded that RA patients had higher rates of myocardial infarction (adjusted incidence rate ratio [aIRR] = 1.43), coronary death (aIRR = 1.60), heart failure (aIRR = 1.61), and cardiac arrest (aIRR = 2.26) (4). Additionally, myocardial infarction in case of RA is mostly silent (5) which likely explains the fatal character of these CV events. Despite advances in the treatments of RA and a better control of disease activity, CV-related mortality remains elevated in comparison with the general population (1,2).

Ischemic heart disease is both the consequence of blunted coronary perfusion secondary to coronary endothelial dysfunction (ED) associated or not to stenosis, and increased susceptibility of myocardial tissue to ischemia (6). A few studies reported an impairment in coronary flow reserve, a measure of both obstructive coronary artery disease and microvascular dysfunction, in RA patients (7). Surprisingly, whereas murine models of arthritis, mainly the rat adjuvant-induced arthritis (8), have proven efficacy to decipher mechanisms underlying endothelial dysfunction in various peripheral vascular beds, studies are lacking with respect to ED on the coronary vasculature. Regarding the myocardial function and structure, RA patients with long-standing disease (9–12) and free from heart diseases (13) exhibited diastolic and/or systolic dysfunction (14,15), increased ventricular wall thickening and fibrosis (11,16). The pathogenesis of cardiac complications in RA is poorly understood, but the presence of traditional CV risks factors cannot fully explain the increased risk (2). A role of myocardial inflammation has been suspected (11,17) as RA patients showed high levels of adhesion molecules, TNF-α and IL-1β in cardiomyocytes and cardiac microvessels (11,17,18). Surprisingly, even though a few studies in animal models of arthritis

identified the presence of myocardial oxidative stress (19,20), fibrosis (21), myocardial inflammation (21) and cardiac remodeling (22,23), whether these models have an exaggerated vulnerability to myocardial ischemia is not known.

The aim of the present study was to determine if the widely-used model of adjuvant-induced arthritis (AIA) is relevant for mimicking coronary ED as well as cardiac impairments in RA. For this purpose, experiments were conducted in AIA rats at day 33 post-immunization, i.e. at a time at which macrovascular (aorta) and microvascular (mesenteric arteries) ED was previously observed (24). Vascular reactivity was studied in isolated coronary arteries, cardiac function and myocardial susceptibility to ischemia/reperfusion was explored in isolated perfused hearts, and cardiac hypertrophy and inflammation were measured. The use of endothelin-1 (ET-1) and angiotensin II (Ang-II) as putative circulating biomarkers of coronary ED was also investigated.

Material and methods

Animals

The experimental procedures were approved by the local committee for ethics in animal experimentation (2015-001-CD-5PR) of Franche-Comté University (Besançon, France), and complied with the "Animal Research: Reporting In Vivo Experiments" ARRIVE guidelines. Six-week-old male Lewis rats (n = 92) 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.

Experimental groups

Two series of independent experiments were performed: the first to study coronary vascular reactivity and the second for assessment of myocardial function and susceptibility to

ischemia/reperfusion. In each experimental series, rats were divided into two groups: AIA and control groups. Rat number by group and by series is summarized in **Table 1**.

Induction and clinical evaluation of arthritis model

Arthritis was induced in rats by a single intradermal injection at the tail of 120 µL of 10 $mg.mL^{-1}$ heat-killed Mycobacterium butyricum suspended in Freund's incomplete adjuvant, as described previously (25). Non-arthritic age-matched rats were used as controls and received saline at the base of the tail. Rats were daily weighed and scored for clinical signs of arthritis. Briefly, 0.1 point was given for each finger inflamed, 0.5 point for each weak and moderate arthritis of one big joint (ankle or wrist) and 1 point when this ankle/wrist inflammation is intense, resulting in a maximum possible arthritis score of 6 per rat (26).

Vascular reactivity of coronary arteries

On day 33 after arthritis induction, rats were anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). Blood was withdrawn from the abdominal aorta to obtain plasma and stored at -80°C until analysis. The heart was immediately excised and placed in oxygenated ice cold Krebs solution (in mM: 118 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 1.2 KH_2PO_4, 4.7 KCl, 2.5 $CaCl_2$, 1.2 $MgSO_4$ and 12 glucose) bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2, pH = 7.4). Left anterior descending (LAD) branch of epicardial coronary artery was carefully removed by dissecting the tissue around the vessel wall, and cut into ~2 mm-segments. LAD segments were mounted in a Mulvany's myograph (containing Krebs solution warmed to 37 °C and oxygenated with 95% O_2, 5% CO_2) and were threaded on two 25-µm diameter stainless steel wires. To measure isometric force, artery segments were connected to a Multi Myograph System (Model 610M v.2.2, DMT A/S, Denmark). Data were recorded using ChartTM Ver.7 (ADInstruments, France). Arteries were first allowed to equilibrate for 30 min. Thereafter, they were set to a normalized internal circumference L1 (0.9L100) in accordance to passive wall tension-internal circumference relationship under a passive transmural pressure of 100 mmHg, in order to

obtain optimal conditions for active tension development, as previously described (27). The viability of each segment was initially tested from its contractile capacity to depolarizing Krebs solution (100 mM KCl). Then, the presence of functional endothelium was confirmed by more than 50% relaxation to the endothelium-dependent agonist acetylcholine (ACh, 10^{-6} M) after pre-constriction with serotonin (5-HT, 10^{-5} M). In some vessels, endothelium was mechanically removed by gently rubbing inside the vessel with a small wire. The completeness of endothelial denudation was confirmed by the absence of relaxation to ACh (10^{-6} M). Arteries were again allowed to equilibrate 30 min before the start of the experiments.

Vasocontractile response was studied by exposing endothelium-denuded segments to incremental concentrations of serotonin (5-HT, 10^{-8}-10^{-4} M), endothelin-1 (ET-1, 10^{-10}-10^{-7} M) and angiotensin II (Ang-II, 10^{-11}-10^{-5} M). Endothelial function was evaluated in coronary arteries from AIA and control rats by the vasodilatory response to acetylcholine (ACh) used as an endothelium-dependent agonist. For this purpose, artery segments were constricted with serotonin (5-HT, 10^{-5} M), and relaxed with ACh (10^{-9}-10^{-4} M). To insure that the differences observed with ACh were not due to an impaired response of smooth muscle cells to nitric oxide (NO), 5-HT-pre-constricted arteries were relaxed with cumulative concentrations of a NO donor, sodium nitroprusside (SNP, 10^{-9}-10^{-4} M). Contractile responses elicited by an agonist were calculated as a percentage of the maximum response to 100 mM KCl. All relaxant responses were expressed as a percentage of the 5-HT induced contraction.

Blood measurements

To understand if circulating factors may reflect the coronary dysfunction, plasma levels of ET-1 and Ang-II were measured by ELISA kits (ADI-900-020A and ADI-900-204, Enzo Life Sciences,

124 respectively). The limits of detection provided by the manufacturers were 0.78 $pg.mL^{-1}$ and
125 3.9 $pg.mL^{-1}$, respectively.
126
127 Functional parameters and global ischemia/reperfusion (I/R) injury in isolated hearts
128 Thirty-three days after arthritis induction, rats were anesthetized with sodium pentobarbital
129 (60 $mg.kg^{-1}$ i.p.) and heparinized (sodium heparinate, 250 $IU.kg^{-1}$ i.v.). Thereafter, hearts were
130 rapidly excised and the ascending aorta was cannulated for retrograde perfusion to a Langendorff
131 system (28). Isolated hearts were perfused at a constant pressure (7.8 kPa) with Krebs–Henseleit
132 buffer (in mM: 118 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 1.2 KH_2PO_4, 4.5 KCl, 1.36 $CaCl_2$, 1.2 $MgSO_4$ and
133 11 glucose, pH 7.4, equilibrated by 95% O_2 and 5% CO_2). The heart temperature was continuously
134 controlled and maintained at 37°C throughout the experiment. An elastic water-filled latex balloon
135 (4x8 mm, EMKA Technologies, Paris, France) was inserted into the left ventricle (LV) and
136 connected to a pressure transducer (Becton Dickinson, Sandy, USA). The initial diastolic pressure
137 was individually adjusted between 2 and 8 mmHg to achieve maximal contractile performance (28).
138 Hemodynamic data were recorded and analyzed using a Data acquisition system (Gould TA 240
139 physiograph, Courtaboeuf, France).
140
141 After a 10-min stabilization period, parameters at baseline were monitored: heart rate (HR), left
142 ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEPD), +dP/dt and
143 −dP/dt (indexes of contraction and relaxation, respectively); and left ventricular developed pressure
144 (LVDP) was calculated as follows: LVDP=LVSP-LVEDP. Then, the heart was subjected to a 30-
145 min no-flow normothermic global ischemia by clamping the perfusion tubing connected to the
146 aortic cannula, followed by 30 min of reperfusion. All hemodynamic parameters were continuously
147 recorded at 2-min intervals during the whole reperfusion time. Functional recovery (FR) was used
148 as an index of cardiac function, and was determined by the pressure-rate product (HR x LVDP)

compared with pre-ischemic baseline values, as follows: [FR= ($LVDP_{TRx}$ x HR_{TRx}) / ($LVDP_{T10}$ x HR_{T10}) x 100] (where TR_x represents the xth min of reperfusion and T_{10} the 10 min pre-ischemic time). Finally, coronary flow (CF) was measured by timed measure of coronary effluent volume and was expressed in mL/min/g wet heart weight. Effluents were stored at -80°C until analysis.

Measure of cardiac hypertrophy, infarct size and severity of the ischemic injury

At the end of the reperfusion period, whole-hearts were removed from the Langendorff apparatus, carefully cleaned and weighted to calculate the heart weight to body weight ratio (HW/BW) as an index of cardiac hypertrophy. Thereafter, half of whole-hearts (n=8 in each group) were frozen at -20°C for 1h30. Frozen hearts were sliced into ~1 mm thick sections from apex to base, incubated with 1% triphenyltetrazolium chloride (TTC) in phosphate buffer at 37°C for 30 min then fixed with 10% formalin solution overnight and photographed. After TTC staining, the viable myocardium and infarcted area was stained in red and white, respectively. Relative infarct size was blindly determined with NIH Image J (National Institutes of Health, USA) for each heart as follows: (sum of infarct size on slices)/(sum of total size of slices) x 100 (29). The other half of hearts (n=8 in each group) was stored at -80°C until measurement of myeloperoxidase (MPO) activity. In addition, to assess the severity of the ischemic injury, leakage of creatine phosphokinase (CPK) and lactate deshydrogenase (LDH) was determined in post-ischemic cardiac effluents (2-min after reperfusion). Effluents were initially 5^{th} concentrated in Amicon™ Ultra concentrating vessels (Merck). Then, CPK and LDH levels were measured by spectrophotometry (Architect Ci8200, Abbot, France). The limits of detection were 5.0 $U.L^{-1}$.

Evaluation of cardiac inflammation

Cardiac MPO activity, a marker of tissue infiltration by polynuclear neutrophils and/or macrophages, was measured by using the o-dianisidine method as previously described with some

modifications (20). Briefly, myocardial tissues were homogenized with 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide in 50 mM potassium phosphate buffer, pH = 6.0. After 3 freeze-thawing-sonication cycles, homogenates were centrifuged (10 000 g for 10 min at 4°C) and enzyme activity was measured spectrophotometrically in the supernatant at 460 nm in presence of o-dianoside dihydrochloride and 0.05% hydrogen peroxide. Results were expressed as nmol o-dianosidine oxized.min^{-1}.mg $protein^{-1}$. In addition, levels of TNF-α were measured in cardiac effluents collected at baseline before ischemia, by using Milliplex magnetic bead panel kits (eBioscience, Vienne, Austria) that were analyzed with a Luminex MAGPIX system (Luminex Corporation; Houston, TX) and Milliplex Analyst software (Millipore; St. Charles, MO). The limit of detection provided by the manufacturer for TNF-α was 3.08 pg/mL.

Data and Statistical analysis

Values are presented as means±SEM. Data were analyzed using GraphPad Prism software (version 5.3). Concentration-responses curves obtained from coronary arteries and time-dependent curves of cardiac functional parameters were compared by 2-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures. When appropriate, the overall relaxant response to ACh expressed by the area under the curve (AUCs) was calculated. Comparison between two values was assessed by unpaired Student t test or Mann-Whitney U test when data were not normally distributed. The relationship between two parameters was tested by using linear regression analysis, and a Spearman's correlation coefficient was calculated between these variables. $P<0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

Basic characteristics, cardiac hypertrophy and plasma levels of ET-1 and Ang-II

As shown in **Table 1**, AIA rats exhibited a severe arthritis in both series of experiments, attested by high arthritis scores and body weight loss as compared to controls. Whatever the experimental

series, HW/BW ratio was significantly enhanced in AIA groups as compared to controls. Likewise, plasma levels of ET-1 and Ang-II were significantly higher in AIA. ET-1 and Ang-II levels positively correlated with arthritis scores ($r=0.646$, $p<10^{-4}$, $n=34$ and $r=0.449$, $p=0.00526$, $n=37$, respectively) and cardiac hypertrophy index ($r=0.665$, $p<10^{-4}$, $n=34$ and $r=0.426$, $p=0.0096$, $n=36$, respectively).

AIA was associated with coronary endothelial dysfunction that negatively correlated with circulating levels of ET-1 and Ang-II

The contractile response of coronary arteries to 5-HT, ET-1 or Ang-II was similar between controls and AIA rats (**Figure 1A-C**). By contrast, coronary arteries from AIA had a marked endothelial dysfunction as reflected by the reduced ACh-induced relaxation as compared to controls (**Figure 1D**). Vasodilating responses to the NO donor SNP were not different between the groups (**Figure 1E**). Of interest, endothelial function (expressed as AUC of ACh-induced cumulative curves) negatively correlated with plasma levels of ET-1 ($r=-0.362$, $p=0.04$, $n=31$) and Ang-II ($r=-0.449$, $p=0.007$, $n=34$).

AIA was associated with myocardial inflammation

As show in **Figure 2**, both cardiac MPO activity **(Figure 2A)** and TNF-α release in coronary effluents **(Figure 2B)** were significantly enhanced in AIA compared to controls.

Cardiac function was not impaired in AIA in baseline conditions

At baseline, as shown in **Figure 3**, no difference between AIA and control rats was observed whatever the cardiac functional parameter measured.

AIA was associated with a decrease in cardiac functional recovery after I/R

After I/R, coronary flow, heart rate, LVDP, LVEDP as well as the ±dP/dt indexes were similar in AIA and control groups during the reperfusion period (**Figure 3A-F**). By contrast, functional recovery was significantly reduced in AIA as compared to controls (**Figure 3G**, $p<0.001$).

AIA exacerbated myocardial injury induced by I/R

As compared to controls, a higher myocardial injury as revealed by a higher leakage of CPK and LDH from AIA hearts was observed at the beginning of reperfusion (**Figure 4A-B**). Moreover, arthritis was associated with a significantly greater infarct size (**Figure 4C-D**).

Discussion

The seminal findings provided by the present study are that the AIA model in rats 1) was associated with a coronary ED negatively correlated with plasma ET-1 and Ang-II levels, 2) induced both myocardial hypertrophy and inflammation, 3) exhibited a greater susceptibility to ischemia/reperfusion damages.

In the last decade, ED has been clearly demonstrated in RA patients as well as in animal models of RA (7). These studies mainly focused on vascular beds such as brachial or cutaneous arteries in humans, or aortic and mesenteric beds in murine models. Nevertheless, it is acknowledged that ED does not affect all arteries to the same extent/time course in RA (7), thus implying the study of each vascular bed separately. The present data demonstrated that ED was present in coronary arteries in AIA at the acute phase of arthritis, in agreement with the presence of impaired coronary reserve in RA patients (30,31). Our results also indicated that neither the response to contractile agonists nor the sensitivity of smooth muscle cells to NO was impaired in AIA, thus identifying the dysfunctional endothelium as a corner stone of the pathogenesis of coronary disease in RA. These

248 data resonate with a previous study conducted in sheep with collagen-induced arthritis reporting
249 decreased bradykinin-induced relaxation without change in response to SNP (32). Due to its
250 reversible nature, ED is a target of choice for reducing the CV risk and could potentially be used to
251 improve CV risk stratification in RA patients but this needs non-invasive tools for measuring
252 coronary ED. A few studies in RA patients reported a correlation between coronary function and
253 total cholesterol levels but not with HDL- and LDL-cholesterol ones (33), with plasma IL-1β levels
254 (34), but not with CRP (31,33,35) or circulating SDMA and ADMA levels (36), so no definite
255 conclusion can be drawn. In the present study, we focused on two mediators recognized for their
256 negative effects on CV function, ET-1 and Ang-II (37,38). Our results indicated that these two
257 mediators are elevated in AIA and that they negatively correlated with coronary ED. These results
258 are consistent with studies showing that a treatment by losartan and irbesartan improved in vivo and
259 ex vivo ED in AIA rats (39). These results, combined with the fact that the smooth muscle cells
260 reactivity to ET-1 and Ang-II was not impaired ex vivo in AIA, suggest that RA patients would
261 benefit from drugs that reduce the effects of high circulating levels of Ang-II such as blockers of
262 renin-angiotensin system (RAS) or ET-1 receptors antagonists. Whereas previous studies showed
263 that an angiotensin-converting-enzyme inhibitor improved endothelial function in RA patients (40),
264 no study investigated their effects on coronary dysfunction. Moreover, the effect of ET-1
265 antagonists has never been tested in RA. Our data also confirm the accuracy of EULAR guidelines
266 recommending blockers of RAS for treating hypertension in RA, and suggest that these treatments
267 might reduce the occurrence of coronary heart diseases (41). Further studies are needed to answer
268 this question.
269
270 In this study, AIA rats exhibited a high heart weight/ body ratio revealing the presence of a cardiac
271 hypertrophy. This results is congruent with similar data obtained in the same model (19), in mice
272 with collagen anti-body-induced arthritis (CAIA) (22) or in a non-human primate model with

spontaneous RA (21). These studies indicated that cardiac hypertrophy was secondary to a myocardial fibrosis. As fibroblasts are activated by inflammation, we investigated myocardial inflammation in AIA rats. The results showing high cardiac TNF-α release associated with a high tissue MPO activity demonstrated that hearts from AIA displayed an inflammatory state and are infiltrated by neutrophils and/or macrophages. These data are in line with the upregulated cardiac mRNA expression of TNF-α observed in the mice CAIA model (22), and with the increase in cytokines found in heart biopsies from RA patients (18). Altogether, the presence of a cardiac inflammation associated with hypertrophy indicated that AIA led to an acquired, subclinical, non-ischemic cardiomyopathy mimicking the myocarditis observed in RA patients (17). Fibrotic deposition usually disrupts the normal myocardial architecture leading to systolic and diastolic dysfunction in the heart, but this was not observed in AIA rats from this study. Nevertheless, our result is congruent with the lack of cardiac dysfunction measured by echography in a non-human primate model of RA associated with cardiac inflammation and hypertrophy (21), suggesting that cardiac damages start long before cardiac dysfunction becomes clinically detectable. Likewise, data from RA patients are controversial with respect to the presence of systolic and/or diastolic dysfunction, some studies reporting a dysfunction (12,42) and others showing no dysfunction either diastolic (43) or systolic (44).

Multiple studies demonstrated that the inflammatory process induced by I/R is one of the most links in the myocardial ischemia reperfusion injury (45). Surprisingly, whether a preexisting inflammation aggravates the vulnerability to I/R is poorly documented. In the present study, at the end of the reperfusion period, AIA had increased myocardial cell death as indicated by the high CPK and LDH leakage, associated with a greater infarct size and impaired functional recovery, thus indicating that the presence of myocardial inflammation is an aggravating element in case of I/R. Indeed, these differences between AIA and control rats cannot be the consequence of differences in

circulating factors or immune cells as the ex vivo isolated perfused heart does not account for the systemic factors contrary to models of I/R in vivo. These data suggest that the AIA model would be suitable for unraveling the mechanisms involved in cardiac impairments in RA, and to screen the effects of RA treatments on the cardiac vulnerability to ischemic disease. Indeed, the link with disease activity is currently unclear and whether the reduction of disease activity would translate into a reduction of myocardial inflammation/vulnerability to ischemic insult is not known. In the present study, infarct size was not correlated with arthritis score in AIA. Although various studies in RA patients reported a link between cardiac dysfunction and disease duration and/or severity (46,47), a recent study revealed that RA patients with continued low disease activity from 2 to 7 years had a persistent heart dysfunction and atherosclerosis as compared to controls (13). Likewise, in the late phase of the model of CAIA in mice, that resembles to medically controlled RA or RA in remission, mice still exhibited fibrosis, cardiac hypertrophy and inflammation when systemic inflammation has gone (22).

In conclusion, the present study indicated that the AIA model in rat is relevant for mimicking coronary endothelial dysfunction, cardiac hypertrophy and inflammation as well as exaggerated susceptibility to ischemic injury in RA. Of interest, the AIA model does not exhibit neither dyslipidemia (unpublished data) nor arterial hypertension (24) thus making it of particular interest for the study of the specific link between systemic inflammation and myocardial disease.

Declarations

- **Consent for publication (not applicable)**
- **Ethics approval and consent to participate**

The experimental procedures were approved by the local committee for ethics in animal experimentation no. 2015-001-CD-5PR of Franche-Comté University (Besançon, France) and complied with the "Animal Research: Reporting In Vivo Experiments" ARRIVE guidelines.

- **Abbreviations**

AIA = adjuvant-induced arthritis

Ang-II = angiotensin II

ANOVA = analysis of variance

AUC = area under the curve

CAIA = collagen anti-body-induced arthritis

CF = coronary flow

CPK = creatine phosphokinase

CV = cardiovascular

ED = endothelial dysfunction

ET-1 = endothelin-1

FR = functional recovery

HR = heart rate

HW/BW = heart weight to body weight

I/R = ischemia/reperfusion

LAD = left anterior descending

LDH = lactate deshydrogenase

LV = left ventricle

LVDP = left ventricular diastolic pressure

LVEPD = left ventricular end diastolic pressure

LVSP = left ventricular systolic pressure

MPO = myeloperoxidase activity

RA = rheumatoid arthritis

RAS = renin-angiotensin system

TTC = triphenyltetrazolium chloride

• **Acknowledgements**

We thank Maxime Hector, Dr Boris Manoury and Pr Véronique Leblais for their technical assistance.

• **Funding**

Institutional support was provided by the French Ministry for Higher Education and Research.

• **Availability of data and material**

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

• **Authors' contributions**

Conceived and designed the experiments: RB PT SD JM CD. Performed the experiments: RB SD KM JM. Analyzed the data: RB PT SD JM CD. Contributed reagents/materials/analysis tools: DW PT CD. 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.

• **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

371 **References**

372 1. Hoek J van den, Boshuizen HC, Roorda LD, Tijhuis GJ, Nurmohamed MT, Bos G a. M van den,
373 et al. Mortality in patients with rheumatoid arthritis: a 15-year prospective cohort study. Rheumatol
374 Int 2017;37:487–493.
375 2. Abhishek A, Nakafero G, Kuo C-F, Mallen C, Zhang W, Grainge MJ, et al. Rheumatoid arthritis
376 and excess mortality: down but not out. A primary care cohort study using data from Clinical
377 Practice Research Datalink. Rheumatology 2018;57:977–981.
378 3. Avina-Zubieta JA, Thomas J, Sadatsafavi M, Lehman AJ, Lacaille D. Risk of incident
379 cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies.
380 Ann Rheum Dis 2012;71:1524–1529.
381 4. Pujades-Rodriguez M, Duyx B, Thomas SL, Stogiannis D, Rahman A, Smeeth L, et al.
382 Rheumatoid Arthritis and Incidence of Twelve Initial Presentations of Cardiovascular Disease: A
383 Population Record-Linkage Cohort Study in England. PloS One 2016;11:e0151245.
384 5. Maradit-Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, et al.
385 Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a
386 population-based cohort study. Arthritis Rheum 2005;52:402–411.
387 6. Lim SL, Lam CSP, Segers VFM, Brutsaert DL, De Keulenaer GW. Cardiac endothelium-
388 myocyte interaction: clinical opportunities for new heart failure therapies regardless of ejection
389 fraction. Eur Heart J 2015;36:2050–2060.
390 7. Bordy R, Totoson P, Prati C, Marie C, Wendling D, Demougeot C. Microvascular endothelial
391 dysfunction in rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol 2018;14:404–420.
392 8. Totoson P, Maguin-Gaté K, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Mechanisms of endothelial
393 dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies. Arthritis Res Ther 2014;16:202.

394 9. Giles JT, Malayeri AA, Fernandes V, Post W, Blumenthal RS, Bluemke D, et al. Left ventricular
395 structure and function in patients with rheumatoid arthritis, as assessed by cardiac magnetic
396 resonance imaging. Arthritis Rheum 2010;62:940–951.
397 10. Myasoedova E, Davis JM, Crowson CS, Roger VL, Karon BL, Borgeson DD, et al. Brief
398 report: rheumatoid arthritis is associated with left ventricular concentric remodeling: results of a
399 population-based cross-sectional study. Arthritis Rheum 2013;65:1713–1718.
400 11. Kobayashi H, Kobayashi Y, Yokoe I, Akashi Y, Takei M, Giles JT. Magnetic Resonance
401 Imaging-Detected Myocardial Inflammation and Fibrosis in Rheumatoid Arthritis: Associations
402 With Disease Characteristics and N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide Levels. Arthritis Care
403 Res 2017;69:1304–1311.
404 12. Renjith AS, Marwaha V, Aggarwal N, Koshy V, Singal VK, Kumar KVSH. Prevalence of left
405 ventricular dysfunction in rheumatoid arthritis. J Fam Med Prim Care 2017;6:622–626.
406 13. Biskup M, Biskup W, Majdan M, Targońska-Stępniak B. Cardiovascular system changes in
407 rheumatoid arthritis patients with continued low disease activity. Rheumatol Int 2018;38:1207–
408 1215.
409 14. Aslam F, Bandeali SJ, Khan NA, Alam M. Diastolic dysfunction in rheumatoid arthritis: a
410 meta-analysis and systematic review. Arthritis Care Res 2013;65:534–543.
411 15. Pan L, Wang T. Features of cardiac remodeling in Patients with Acute Coronary Syndrome
412 Complicated with Rheumatoid Arthritis. Sci Rep 2017;7. Available at:
413 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5579266/. Accessed November 8, 2018.
414 16. Castaneda S, Gonzalez-Juanatey C, Gonzalez-Gay MA. Inflammatory Arthritis and Heart
415 Disease. Curr Pharm Des 2018;24:262–280.
416 17. Amigues I, Tugcu A, Russo C, Giles JT, Morgenstein R, Zartoshti A, et al. Myocardial
417 Inflammation, Measured Using 18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography-Computed

418 Tomography (FDG PET-CT) is Associated with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. Arthritis
419 Rheumatol Hoboken NJ 2018.
420 18. Grundtman C, Hollan I, Førre ØyT, Saatvedt K, Mikkelsen K, Lundberg IE. Cardiovascular
421 disease in patients with inflammatory rheumatic disease is associated with up-regulation of markers
422 of inflammation in cardiac microvessels and cardiomyocytes. Arthritis Rheum 2010;62:667–673.
423 19. Shi Q, Abusarah J, Baroudi G, Fernandes JC, Fahmi H, Benderdour M. Ramipril attenuates
424 lipid peroxidation and cardiac fibrosis in an experimental model of rheumatoid arthritis. Arthritis
425 Res Ther 2012;14:R223.
426 20. Schubert AC, Wendt MMN, Sá-Nakanishi AB de, Amado CAB, Peralta RM, Comar JF, et al.
427 Oxidative state and oxidative metabolism of the heart from rats with adjuvant-induced arthritis. Exp
428 Mol Pathol 2016;100:393–401.
429 21. Zeng F, Wen W, Cui W, Zheng W, Liu Y, Sun X, et al. Central role of RIPK1-VDAC1 pathway
430 on cardiac impairment in a non-human primate model of rheumatoid arthritis. J Mol Cell Cardiol
431 2018;125:50–60.
432 22. Pironti G, Bersellini-Farinotti A, Agalave NM, Sandor K, Fernandez-Zafra T, Jurczak A, et al.
433 Cardiomyopathy, oxidative stress and impaired contractility in a rheumatoid arthritis mouse model.
434 Heart 2018;104:2026–2034.
435 23. Dai H, Wang X, Yin S, Zhang Y, Han Y, Yang N, et al. Atrial Fibrillation Promotion in a Rat
436 Model of Rheumatoid Arthritis. J Am Heart Assoc 2017;6.
437 24. Totoson P, Maguin-Gaté K, Nappey M, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Microvascular
438 Abnormalities in Adjuvant-Induced Arthritis: Relationship to Macrovascular Endothelial Function
439 and Markers of Endothelial Activation. Arthritis Rheumatol 2015;67:1203–1213.
440 25. Bordy R, Verhoeven F, Tournier-Nappey M, Wendling D, Demougeot C, Totoson P.
441 Methotrexate did not improve endothelial function in rheumatoid arthritis: a study in rats with
442 adjuvant-induced arthritis. Clin Exp Rheumatol 2018.

443 26. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Altered thymic T-
444 cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. Nature
445 2003;426:454–460.
446 27. Skovsted GF, Pedersen AF, Larsen R, Sheykhzade M, Edvinsson L. Rapid functional
447 upregulation of vasocontractile endothelin ETB receptors in rat coronary arteries. Life Sci
448 2012;91:593–599.
449 28. Devaux S, Maupoil V, Berthelot A. Effects of cadmium on cardiac metallothionein induction
450 and ischemia–reperfusion injury in rats. Can J Physiol Pharmacol 2009;87:617–623.
451 29. Berne J-P, Lauzier B, Rochette L, Vergely C. Carbon Monoxide Protects Against Ischemia-
452 reperfusion Injury in Vitro via Antioxidant Properties. Cell Physiol Biochem 2012;29:475–484.
453 30. Recio-Mayoral A, Mason JC, Kaski JC, Rubens MB, Harari OA, Camici PG. Chronic
454 inflammation and coronary microvascular dysfunction in patients without risk factors for coronary
455 artery disease. Eur Heart J 2009;30:1837–1843.
456 31. Kakuta K, Dohi K, Sato Y, Yamanaka T, Kawamura M, Ogura T, et al. Chronic Inflammatory
457 Disease Is an Independent Risk Factor for Coronary Flow Velocity Reserve Impairment Unrelated
458 to the Processes of Coronary Artery Calcium Deposition. J Am Soc Echocardiogr 2016;29:173–
459 180.
460 32. Dooley LM, Abdalmula A, Washington EA, Kaufman C, Tudor EM, Ghosh P, et al. Effect of
461 mesenchymal precursor cells on the systemic inflammatory response and endothelial dysfunction in
462 an ovine model of collagen-induced arthritis. PloS One 2015;10:e0124144.
463 33. Anyfanti P, Triantafyllou A, Gkaliagkousi E, Triantafyllou G, Koletsos N, Chatzimichailidou S,
464 et al. Subendocardial viability ratio in patients with rheumatoid arthritis: comparison with healthy
465 controls and identification of prognostic factors. Clin Rheumatol 2017;36:1229–1236.
466 34. Ikonomidis I, Tzortzis S, Andreadou I, Paraskevaidis I, Katseli C, Katsimbri P, et al. Increased
467 Benefit of Interleukin 1 Inhibition on Vascular Function, Myocardial Deformation, and Twisting in

468 Patients with Coronary Artery Disease and Coexisting Rheumatoid Arthritis. Circ Cardiovasc
469 Imaging 2014;7:619–628.
470 35. Ciftci O, Yilmaz S, Topcu S, Caliskan M, Gullu H, Erdogan D, et al. Impaired coronary
471 microvascular function and increased intima-media thickness in rheumatoid arthritis.
472 Atherosclerosis 2008;198:332–337.
473 36. Dimitroulas T, Sandoo A, Hodson J, Smith JP, Kitas GD. In vivo microvascular and
474 macrovascular endothelial function is not associated with circulating dimethylarginines in patients
475 with rheumatoid arthritis: a prospective analysis of the DRACCO cohort. Scand J Clin Lab Invest
476 2016;76:331–337.
477 37. Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more
478 than a century of research. J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS 2006;7:3–14.
479 38. Jankowich M, Choudhary G. Endothelin-1 levels and cardiovascular events. Trends Cardiovasc
480 Med 2019.
481 39. Sakuta T, Morita Y, Satoh M, Fox DA, Kashihara N. Involvement of the renin-angiotensin
482 system in the development of vascular damage in a rat model of arthritis: effect of angiotensin
483 receptor blockers. Arthritis Rheum 2010;62:1319–1328.
484 40. Flammer AJ, Sudano I, Hermann F, Gay S, Forster A, Neidhart M, et al. Angiotensin-
485 converting enzyme inhibition improves vascular function in rheumatoid arthritis. Circulation
486 2008;117:2262–2269.
487 41. Agca R, Heslinga SC, Rollefstad S, Heslinga M, McInnes IB, Peters MJL, et al. EULAR
488 recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis
489 and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. Ann Rheum Dis
490 2016:annrheumdis-2016-209775.

491 42. Amigues I, Russo C, Giles JT, Tugcu A, Weinberg R, Bokhari S, et al. Myocardial
492 Microvascular Dysfunction in Rheumatoid Arthritis Quantitation by 13N-Ammonia Positron
493 Emission Tomography/Computed Tomography. Circ Cardiovasc Imaging 2019;12:e007495.
494 43. Abdul Muizz AM, Mohd Shahrir MS, Sazliyana S, Oteh M, Shamsul AS, Hussein H. A cross-
495 sectional study of diastolic dysfunction in rheumatoid arthritis and its association with disease
496 activity. Int J Rheum Dis 2011;14:18–30.
497 44. Rudominer RL, Roman MJ, Devereux RB, Paget SA, Schwartz JE, Lockshin MD, et al.
498 Independent association of rheumatoid arthritis with increased left ventricular mass but not with
499 reduced ejection fraction. Arthritis Rheum 2009;60:22–29.
500 45. Marchant DJ, Boyd JH, Lin DC, Granville DJ, Garmaroudi FS, McManus BM. Inflammation in
501 myocardial diseases. Circ Res 2012;110:126–144.
502 46. Midtbø H, Semb AG, Matre K, Kvien TK, Gerdts E. Disease activity is associated with reduced
503 left ventricular systolic myocardial function in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis
504 2017;76:371–376.
505 47. Targońska-Stępniak B, Biskup M, Biskup W, Majdan M. Diastolic dysfunction in rheumatoid
506 arthritis patients with low disease activity. Clin Rheumatol 2018.

Table 1. Basic characteristics, cardiac hypertrophy and blood measurements

	Coronary reactivity		Cardiac ischemia/reperfusion	
	Control	AIA	Control	AIA
Number of rats (n)	30	30	16	16
Arthritis score	-	4.1±0.3	-	2.9±0.3
Body weight (g)	320±6	223±7***	315±3	237±6**
HW/BW ratio (%)	0.291 ± 0.030	0.358 ± 0.005***	0.291±0.005	0.330±0.020*
Plasma ET-1 (pg/mL)	9.1 ± 0.4	12.6 ± 0.5*	n.d	n.d
Plasma Ang-II (pg/mL)	33.4 ± 2.0	47.6 ± 3.7*	n.d	n.d

Values are expressed as means ± SEM. *($p<0.05$), **($p<0.01$), *** ($p<0.001$) vs. corresponding controls. n.d.: not determined. HW/BW: heart weight to body weight, ET-1: endothelin-1, Ang-II : angiotensin II.

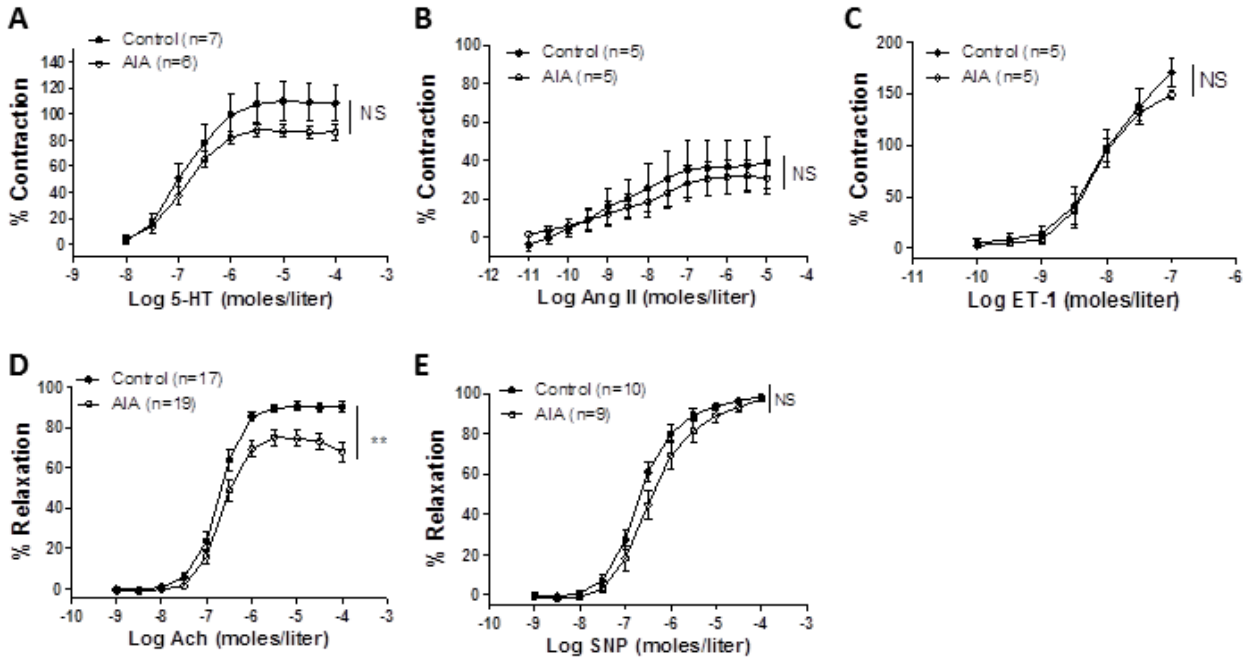


Figure 1. **Vascular reactivity to vasoconstrictive and vasorelaxant agents**

Experiments were performed on coronary arteries from control and arthritis (AIA) rats on day 33 post-immunization. Reactivity to vasoconstrictive agents was evaluated by exposure of arteries to (**A**) serotonin (5-HT), (**B**) angiotensin II (Ang-II) or (**C**) endothelin-1 (ET-1). Endothelium-dependent and endothelium-independent vasorelaxation was studied in arteries constricted with serotonin (3.10^{-6} M) and relaxed with (**D**) cumulative concentrations of acetylcholine (ACh) or (**E**) sodium nitroprusside (SNP), respectively. Values are means ± SEM from n=number of artery segments from 5 to 19 rats per group. ** ($p<0.01$), NS = non-significant.

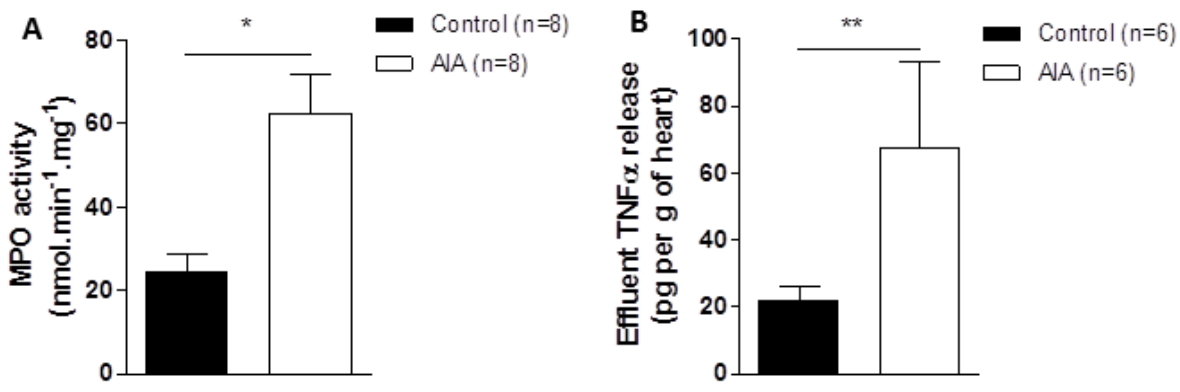


Figure 2. **Myocardial inflammation in AIA**

Experiments were performed in isolated perfused hearts from control and AIA rats on day 33 post-immunization. (**A**) Cardiac myeloperoxidase (MPO) activity at the end of ischemia/reperfusion, (**B**) TNF-α levels in coronary effluents before ischemia/reperfusion. Values are means±SEM from n= 6 to 8 rats per group. *($p<0.05$), ** ($p<0.01$).

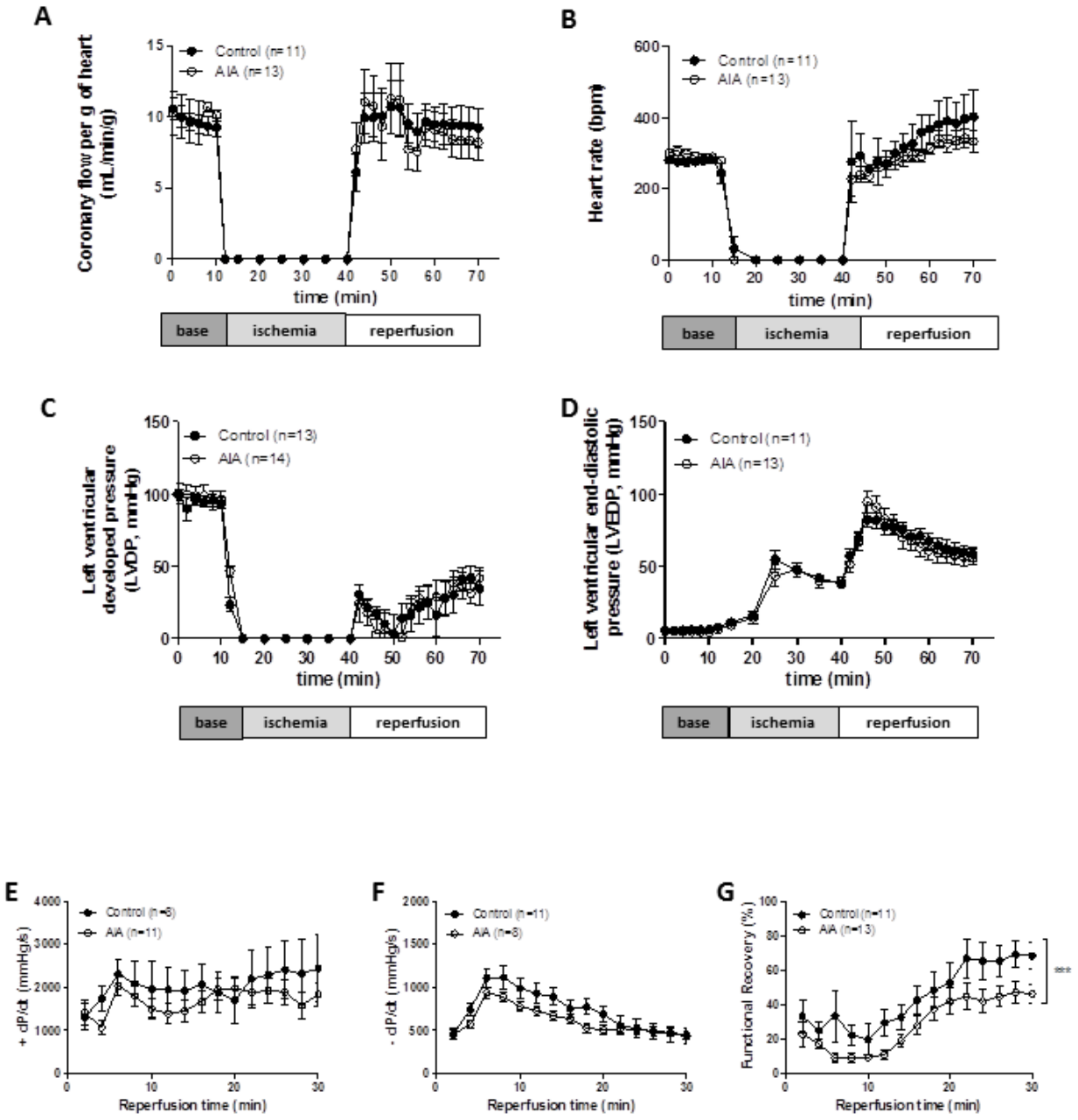


Figure 3. Myocardial function before and after ischemia/reperfusion

Experiments were performed in isolated perfused hearts from control and AIA rats on day 33 post-immunization. (**A**) coronary flow, (**B**) heart rate, (**C**) left ventricular developed and (**D**) end-diastolic pressures were registered at baseline and during the ischemia-reperfusion sequence. At the reperfusion, +dP/dt (**E**), -dP/dt (**F**) and functional recovery (**G**) were calculated as described in Methods. Values are means±SEM from n=number of isolated hearts from 8 to 13 rats per group. *** ($p<0.001$).

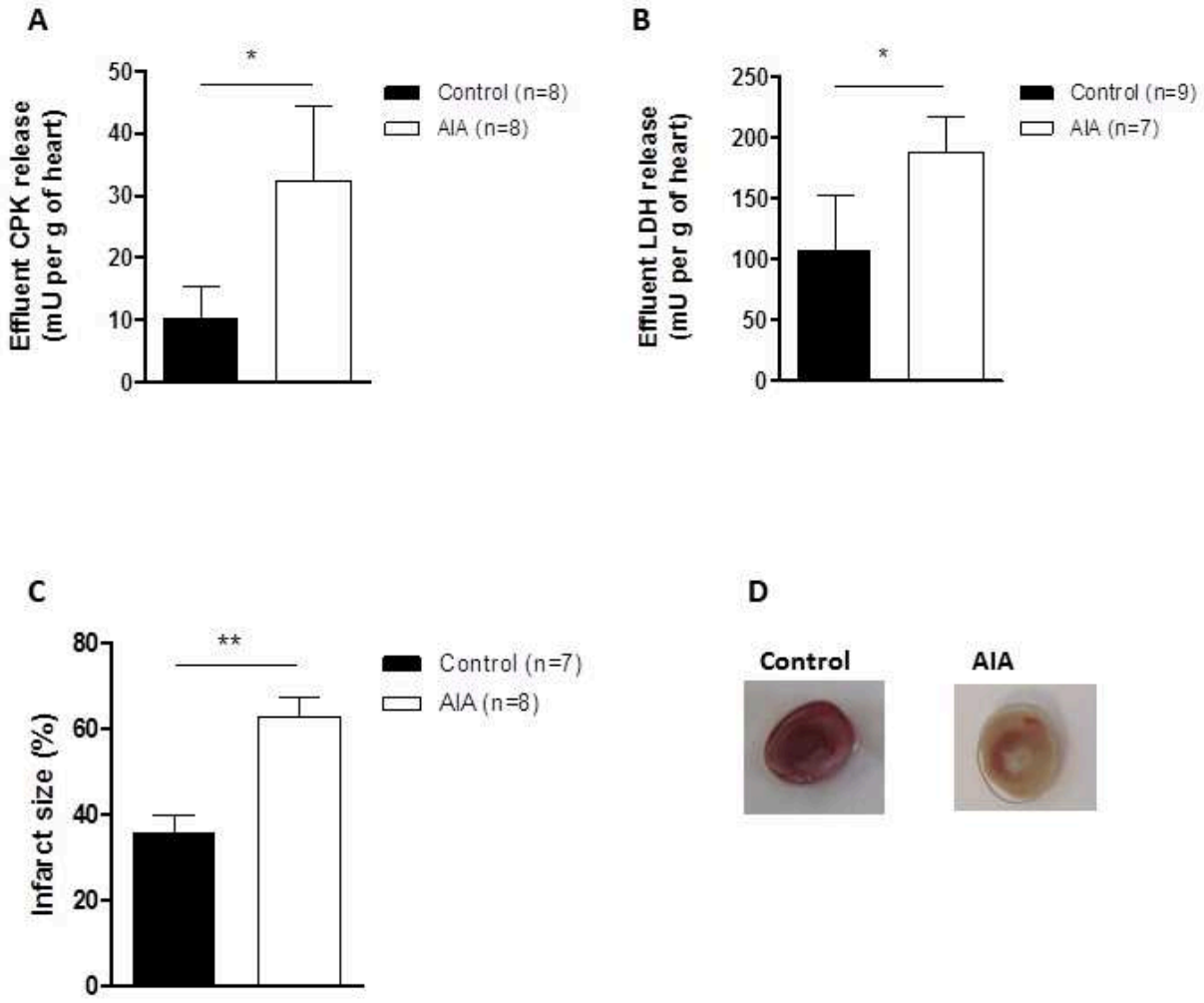


Figure 4. Post-ischemic myocardial injuries

Experiments were performed in isolated perfused hearts from control and AIA rats on day 33 post-immunization, after a global ischemia/reperfusion sequence. (**A**) Creatine phosphokinase (CPK) and (**B**) lactate dehydrogenase (LDH) levels in coronary effluents, (**C**) infarct size after TTC staining. (**D**) A Representative picture of TTC stained heart slice of each group is shown (viable myocardium in red and infarcted area in white). Values are means±SEM from 7 to 9 rats per group. * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$).

3ème partie : Discussion générale et perspectives

L'existence d'un sur-risque CV est actuellement bien établie chez le patient PR et représente un enjeu majeur de prise en charge pour réduire la surmortalité observée chez ces patients. Le nombre important de publications relatives à ce sur-risque (2 751 publications en juillet 2019 dans la base de PubMed) montre le grand intérêt porté par la communauté scientifique pour ce sujet. Toutefois, en dépit de ce nombre important, les mécanismes impliqués dans ce sur-risque sont mal définis et les recommandations des sociétés internationales de rhumatologues ne font pas l'objet d'une évaluation scientifique de haut niveau de preuve [59]. De plus, la majorité des travaux expérimentaux disponibles actuellement en cas de PR portent majoritairement sur les mécanismes de la DE macrovasculaire au niveau aortique.

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis d'explorer la physiopathologie et les mécanismes impliqués de la DE au niveau de territoires vasculaires pertinents d'un point de vue clinique, c'est-à-dire les lits coronaire et cérébral.

1. Effets du méthotrexate sur la dysfonction endothéliale aortique

La DE représente un élément précoce du risque CV, et sa prise en charge constitue donc un enjeu important [293]. Alors que beaucoup de données sont accessibles chez le patient PR concernant l'effet des biothérapies sur la DE [359,407], il existe très peu de données sur la thérapie de première intention la plus utilisée, le méthotrexate. De plus, aucune donnée ne s'est intéressée à l'impact du MTX sur la DE chez l'animal arthritique. Ainsi, dans la continuité des travaux effectués par le laboratoire chez le rat AIA sur les effets des traitements de la PR avec l'étanercept [388], les glucocoticoïdes [389] et les AINS [390], nous avons étudié les effets du MTX sur la DE aortique chez le rat AIA. De façon assez surprenante, il n'est pas montré d'effet positif du MTX sur la DE en dépit d'effets anti-inflammatoires avérés, tant sur le plan clinique (diminution du score arthritique) que biologique (diminution des taux sériques d'IL-1β et de TNFα). Cependant, et de façon rassurante, notre étude ne montre pas d'effet délétère du MTX sur la FE contrairement aux études menées chez des animaux en conditions non-inflammatoires dans lesquelles le MTX peut induire une

DE [410,411] ou *in vitro* sur cellules endothéliales montrant que le MTX conduit à une diminution de la prolifération et de la viabilité cellulaire [431] et favorise leur apoptose [432]. Malgré son incapacité à améliorer la FE des rats AIA, l'étude des voies de signalisation endothéliale montre que le MTX a induit certaines modifications. Ainsi, à la faible dose, le MTX a augmenté l'activité NOS et a diminué la production d'$O_2^{-\circ}$. Cependant, le traitement n'a pas été capable de réduire l'activité COX-2 ni de l'arginase, ni de restaurer la production d'EDHF. Ces résultats soulignent l'importance de ces voies de signalisation endothéliale (COX, arginase et EDHF) dans la physiopathologie de la DE associée à l'arthrite, et, d'un point de vue thérapeutique, ils montrent qu'une combinaison d'effets sur plusieurs voies endothéliales est nécessaire pour améliorer la FE en cas de PR. Ces résultats sont à rapprocher de résultats récents obtenus au laboratoire [388] qui montrent que l'effet bénéfique d'un anti-TNFα, l'etanercept, sur la FE du rat AIA passe par des effets combinés sur les voies des NOS, arginase, COX-2 et sur la production d'$O_2^{-\circ}$. A notre connaissance, notre étude est la première à montrer que le MTX ne modifie pas l'activité vasculaire de la COX-2, et rejoint les résultats d'études anciennes montrant que le MTX ne modifie pas le taux de PGE2 macrophagique chez le rat AIA [433]. Nos résultats qui montrent une augmentation sous MTX de l'activité NOS vasculaire sont intéressants à plusieurs égards. Premièrement, ils suggèrent que le MTX n'a pas induit d'anomalies vasculaires de synthèse et/ou de recyclage de BH_4, pourtant attendues par son mécanisme d'action. La BH_4 est un cofacteur nécessaire à l'activité de l'eNOS. Dans l'endothélium, la BH_4 est dégradée en BH_2, ultérieurement recyclée en BH_4 grâce à l'enzyme cible du MTX, la dihydrofolate réductase. Ainsi, l'inhibition de la régénération de la BH_4 par le MTX pourrait conduire à une réduction du ratio BH_4/BH_2 vasculaire [412], diminuer l'activité eNOS et induire ainsi une DE [434]. Même s'il serait nécessaire de réaliser le dosage de BH_4 et BH_2 vasculaire pour l'affirmer, nos résultats suggèrent qu'en conditions inflammatoires dans l'AIA, le MTX n'a probablement pas modifié le rapport BH_4/BH_2. Deuxièmement, nos résultats rejoignent ceux d'une étude récente menée chez la souris soumise à un modèle de lupus [207], qui ont montré que le MTX activait l'AMPK (*AMP-activated kinase*) vasculaire, enzyme connue pour augmenter l'activité eNOS [435], et induisait l'expression d'enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase. Ces données corroborent nos résultats concernant l'augmentation de l'activation NOS mais aussi la baisse de production d'$O_2^{-\circ}$ par le MTX. Cette étude n'ayant pas mesuré la FE, nous ne savons pas quel effet fonctionnel aurait eu le MTX grâce à ces mécanismes.

La dose choisie de 1 mg/kg/semaine s'appuie sur des études rapportant un bénéfice de cette dose sur le score arthritique dans le même modèle [436,437]. Dans le but d'observer un effet-dose sur la FE, nous avons testé une dose plus importante de 2 mg/kg/semaine. Cette forte dose a montré des effets bénéfiques sur le score arthritique. Toutefois aucun effet dose-dépendant n'a été observé ni sur le score arthritique, ni sur la DE, laissant supposer qu'un facteur 2 entre les doses est insuffisant pour observer ce type d'effet. Toutefois, la toxicité du MTX à des doses supérieures à 5 mg/kg/semaine chez le rongeur [438] ne permet pas d'utiliser des posologies plus importantes. Le traitement n'a pas non plus amélioré le score radiographique et n'a pas modifié la néoformation osseuse observée dans ce modèle [386], ce qui a déjà été décrit dans la littérature sur les modèles AIA [49,439] et CIA [437]. Cette discordance peut s'expliquer par la courte durée de traitement (seulement de 3 semaines) ou par la modalité de traitement en mode « curatif » et non « préventif » qui est souvent utilisé dans les études. En effet, le MTX a été débuté dès l'apparition des symptômes de l'arthrite, or des études montrent qu'un traitement dit « préventif », c'est-à-dire débuté avant l'apparition des symptômes dans les trois jours suivant l'induction, améliore le score radiographique des pattes des rats traités par rapport aux non-traités [436,440,441]. L'utilisation en mode « préventif » du MTX permettrait une augmentation de sa concentration intra-articulaire, qui inhiberait la formation d'ostéoprotégérine et donc diminuerait l'inflammation et la destruction osseuse dans le modèle AIA [206]. Il serait intéressant de confirmer nos résultats sur un modèle d'arthrite chronique comme le modèle d'arthrite induite au pristane (PIA) qui a la particularité de présenter deux pics inflammatoires (J20 et J90) entrecoupés d'une phase de rémission, mimant au mieux la pathologie humaine évoluant par poussées [442,443]. L'utilisation de ce modèle offrirait une évaluation au long cours de l'effet du MTX sur une pathologie évolutive, permettant un meilleur reflet de l'utilisation clinique du traitement. Enfin, la littérature commence à montrer un lien intéressant entre l'altération du métabolisme osseux et la DE dans la PR [444–446], avec la BMP-4 rapportée comme étant capable d'induire une inflammation vasculaire et favoriser l'athérosclérose [413]. De plus, il semblerait que la BMP-4 conduise à une DE par stimulation des NOX, surproduction de ROS et activation des COX-2 [266]. Nos résultats montrent que le traitement par MTX a significativement augmenté les taux sériques de BMP-4. Bien que cette protéine n'ait jamais été dosée chez le patient PR, une étude a montré que le MTX augmente l'expression génique de BMP dans les cellules mononucléaires sanguines chez les patients PR [447]. Toutefois, il n'est pas encore expliqué en quoi cette anomalie explique le manque d'effet du MTX sur la DE.

Nos résultats suggèrent que les effets bénéfiques du MTX sur le RCV dans la PR [197] ne passent pas par une amélioration de la fonction endothéliale, mais par d'autres mécanismes. Une hypothèse serait une augmentation des taux d'adénosine. En effet, en inhibant la dihydrofolate réductase, le MTX augmente les taux d'homocystéine qui est métabolisée en adénosine (**Figure 17**). Cette dernière en activant son récepteur A_{2A}, conduit à des effets anti-inflammatoires [448–450]. De façon intéressante, il est montré que le TNFα conduit à une augmentation de l'expression du récepteur à l'adénosine sur les cellules immunitaires et provoque une résistance à la désensibilisation de ce récepteur [157]. L'effet anti-inflammatoire de l'adénosine conduit également à l'augmentation de l'expression de *l'adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1* (ABCA1) et de la cholesterol-27-hydroxylase conduisant à un efflux du cholestérol des cellules extrahépatiques vers le foie et l'intestin pour élimination, et donc une réduction de la dyslipidémie observée en cas de PR. Par ailleurs, il semblerait également que le MTX réduise les taux circulants en lymphocytes T et B, et également augmente le taux circulant de lymphocytes Treg, conduisant à une diminution de l'inflammation systémique et donc une diminution du risque CV induit par les facteurs liés à la PR [157]. Une autre hypothèse consisterait en une amélioration des paramètres hématologiques avec une diminution du taux de plaquettes et de l'activité coagulante, réduisant le risque prothrombotique du patient [441,449,451].

De plus, il est reconnu que l'hyperhomocystéinémie induite par le mécanisme d'action du MTX (**Figure 17**) peut conduire à une DE [452]. En pratique clinique, la supplémentation en folates est indispensable pour contrecarrer cette augmentation. Or dans notre étude, il n'a pas été observé d'augmentation des taux d'homocystéine (Hcy) chez les rats traités par MTX par rapport aux rats non-traités. Il pourrait être suspecté une teneur élevée en folates ou en créatine dans la nourriture, démontrée comme réduisant le taux d'Hcy chez le rat [453], pouvant expliquer cette discordance. Mais la composition a été vérifiée et il n'y a pas de supplémentation de la nourriture en ces facteurs, réfutant cette hypothèse. L'absence de groupe contrôle non-arthritique dans notre étude ne permet pas de savoir si le rat AIA présente une anomalie des taux d'Hcy. Toutefois nos données chez le rat concordent avec celles des patients PR chez lesquels une hyperhomocystéinémie a été démontrée mais indépendamment d'un traitement par MTX, vraisemblablement secondaire à l'activation du système immunitaire [454]. En effet, l'activation immunitaire chronique peut conduire à un stress oxydant provoquant une déplétion en agents antioxydants, y compris les vitamines sensibles à l'oxydation comme la B9 et la B12, qui sont

nécessaires au foncitonnement des enzymes du métabolisme de l'Hcy (**Figure 17**), concourant ainsi à l'hyperhomocystéinémie [455].

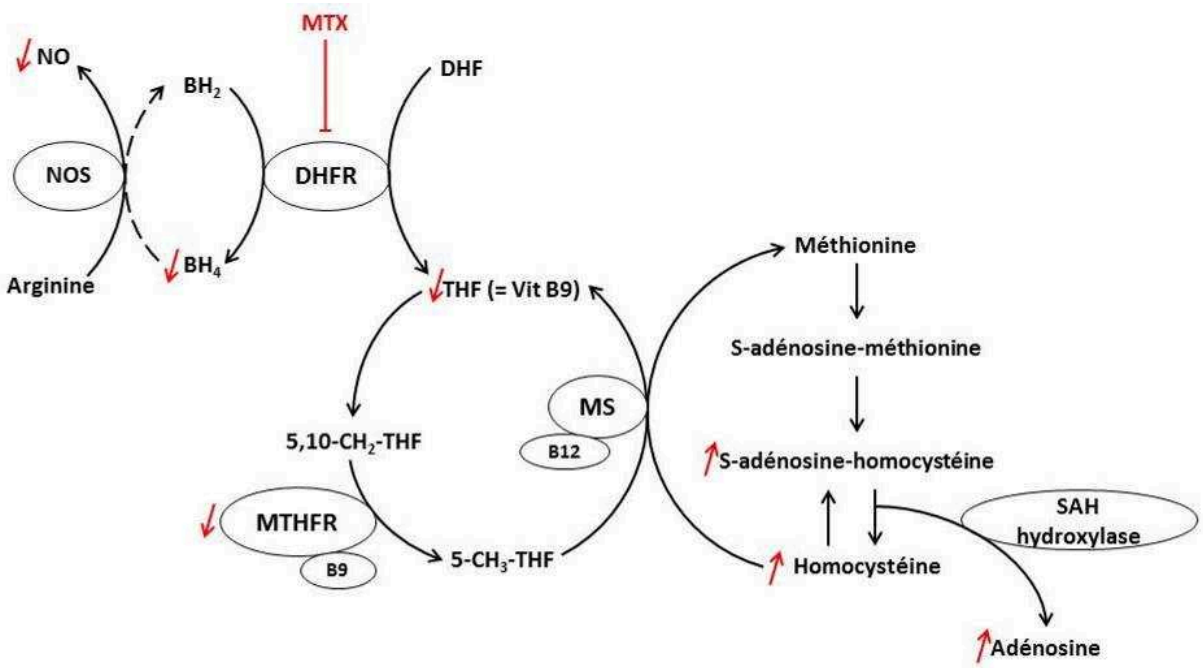


Figure 17 – Effets sur les différentes voies métaboliques induits par l'inhibition de la dihydrofolate réductase par le méthotrexate.
La dihydrofolate réductase (DHFR) est impliquée dans la réduction de la dihydrobioptérine (BH_2) en tétrahydrobioptérine (BH_4), co-facteur de la *nitric oxide synthase* (NOS) qui réduit l'arginine en monoxyde d'azote (NO). L'inhibition de la DHFR par le méthotrexate (MTX) conduit à une diminution de la biodisponibilité en BH_4 et donc à un découplage de la NOS responsable d'une diminution de la production du NO.
Parallèlement à cela, la DHFR est impliquée dans la réduction du dihydrofolate (DHF) en tétrahydrofolate (THF) qui est la forme active de la vite B9 (vit B9). Le THF est réduit en 5,10-méthényltétrahydrofolate (5,10-CH_2-THF) puis en 5-méthyltétrahydrofolate (5-CH_3-THF) par la méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR), enzyme vitamine B9-dépendante. La méthionine synthase réduit ensuite le 5-CH_3-THF avec comme co-substrat l'homocystéine pour former la méthionine. L'inhibition de la DHFR va ainsi conduire à une diminution de la biodisponibilité en THF.
La diminution de la biodisponibilité en THF va conduire à une diminution de l'activité de la MTHFR (car moins de substrat et moins de vitamine B9 nécessaire à son fonctionnement) ce qui va augmenter les taux d'homocystéine, conduisant à une hyperhomocystéinémie, qui est un effet indésirable du MTX. Cependant, l'homocystéine est métabolisée en S-adénosine-homocystéine (SAH), qui est hydroxylée par la SAH hydoxylase en adénosine. Par conséquent, le MTX, en inhibant la DHFR, conduit à une augmentation des taux d'adénosine.

Nos résultats suggèrent qu'il serait intéressant de proposer au patient PR traité par MTX des thérapies adjuvantes à visée endothéliale afin d'améliorer la DE. D'un point de vue thérapeutique, les inhibiteurs d'arginase qui améliorent la DE aortique du rat AIA, sans modifier l'arthrite, pourraient être une option [382]. Malheureusement à l'heure actuelle, aucun médicament visant cette enzyme n'est disponible sur le marché. L'utilisation de thérapies non médicamenteuses

présentent donc un intérêt, telle que l'activité physique (AP). Il a en effet été démontré qu'une AP, en résistance ou en aérobie, n'aggrave pas la sévérité de la PR mais au contraire ralentit la progression de la maladie, diminue la fatigue et la perception de la douleur, et améliore les capacités fonctionnelles et la qualité de vie des patients [51,53]. De plus, les patients PR ayant un faible niveau d'AP présentent plus de facteurs de risque CV que les patients plus actifs [53,456]. Très récemment, une étude réalisée chez 98 patients PR a montré que la pratique d'une AP, d'intensité très faible, faible ou modérée est associée à une amélioration des taux de HDL et LDL, de la pression artérielle et de la résistance à l'insuline [254]. Concernant spécifiquement la FE, une étude parue en 2015 a démontré chez des patients PR majoritairement traités par MTX (83,7 %) que la pratique pendant 3 mois, une fois par semaine, d'un exercice de type Tai Chi améliore également la FE (FMD brachiale) [457].

2 Etude de la dysfonction cérébrovasculaire

La deuxième étude présentée dans ce travail de thèse est la première à montrer la présence d'une DE cérébrale dans le modèle AIA et complète la seule étude clinique qui évalue indirectement une atteinte fonctionnelle vasculaire [298]. Nous avons étudié les mécanismes endothéliaux NO-dépendants et montré le rôle prépondérant de l'arginase dans cette DE. Il serait intéressant pour compléter ces résultats d'explorer d'autres mécanismes importants de la relaxation comme les canaux potassiques et le rôle des EDHF, mais aussi des mécanismes de l'inflammation comme la COX-2.

Nos résultats montrent une restauration de la FE par l'inhibition de l'arginase sur la DE cérébrale, et sont en accord avec les données obtenues antérieurement au laboratoire sur la DE périphérique aortique [382]. Ainsi nous confirmons l'importance de l'arginase dans la physiopathologie de la DE sur différents territoires vasculaires. Au cours de la dernière décennie, il a été montré chez l'homme et dans des modèles animaux (rats AIA, rats spontanément hypertendus (SHR), souris hypertendus par GC, rats obèses et résistants à l'insuline), qu'une augmentation de l'expression et de l'activité de l'arginase contribue à une DE [416,458]. En conditions pathologiques inflammatoires, l'arginase entre en compétition avec l'eNOS et conduit à une diminution de la biodisponibilité en substrat, conduisant au découplage de l'eNOS [269]. Lorsqu'elle est découplée, cette dernière réduit l'oxygène au détriment de la L-arginine produisant des O_2^{-}° au lieu du NO. De plus, l'O_2^{-}° oxyde la BH_4 en BH_2 ce qui réduit la disponibilité du cofacteur de l'eNOS favorisant le découplage de celle-ci

et donc la production d'O_2^{-}°. En accord avec l'hyperactivité vasculaire de l'arginase observée chez le rat AIA, les patients PR présentent une activité circulante de l'arginase augmentée par rapport aux sujets sains [417]. D'autres études ont également souligné le rôle de l'arginase dans des pathologies cérébrales sur des modèles murins : l'inhibition de l'arginase conduit à une amélioration des effets délétères d'AVC chez le rat (amélioration des altérations comportementales, réduction de l'infarctus cérébral et de l'œdème) [459] et diminue la progression de la maladie d'Alzheimer chez la souris [460]. Toutefois une question se pose : la supplémentation des patients en L-arginine ne serait-elle pas plus simple, plus économique et plus sécuritaire afin d'augmenter la disponibilité en substrat pour l'eNOS, plutôt que de développer un médicament inhibant l'arginase ? Bien que cela semblerait logique, il a été montré sur cellules sénescentes que dans le cas d'un rapport d'activité arginase/NOS en faveur de l'arginase, la supplémentation en L-arginine augmente l'activité de l'arginase et non celle de la NOS [461,462]. Cet effet paradoxal pourrait expliquer les résultats « négatifs » de l'essai clinique VINTAGE où l'ajout de L-arginine au traitement standard du post-infarctus augmentait de façon inattendue la mortalité [463]. De plus, il a récemment été démontré que la supplémentation chronique en arginine chez le rat âgé augmente l'activité de l'arginase dans certains organes, mais n'avait aucun effet voire diminuait l'activité de l'arginase dans d'autres organes [464]. Enfin, la faible biodisponibilité orale de la L-arginine (environ 20 %) est soumise à une forte variabilité, ce qui en limite son utilisation *per os* [465]. Ainsi, il est beaucoup plus pertinent cliniquement de développer un inhibiteur d'arginase qui permettra d'augmenter l'activité de la NOS et diminuer celle de l'arginase pour rétablir la fonction endothéliale dans la PR.

Notre étude soulève de nouvelles questions qui demanderont des études dédiées :

1- Est-ce que la PR conduit à des anomalies du DSC ? Est-ce que l'effet inhibiteur d'arginase se traduit par des modifications de DSC ?
2- Est-ce que la PR conduit à une sensibilité augmentée à l'ischémie cérébrale ? Est-ce que l'inhibition de l'arginase confère une résistance à l'ischémie cérébrale ?
3- Est-ce que la PR conduit à une sensibilité augmentée aux pathologies neuropsychiatriques ? Est-ce qu'un inhibiteur d'arginase permettrait d'augmenter les performances cognitives du patient ?

A propos de la troisième question, il a récemment été montré chez le rat AIA une diminution de la disponibilité en *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), une neurotrophine impliquée dans la

plasticité cérébrale et les fonctions cognitives, au niveau cérébral [109]. Une autre étude a montré l'absence de corrélation entre les taux cérébraux de BDNF avec le score arthritique et le taux de cytokines pro-inflammatoires circulantes [108], suggérant que les taux de BDNF ne sont pas influencés par la sévérité arthritique ni par l'inflammation systémique. Enfin, un traitement par nor-NOHA permet d'augmenter les taux cérébraux de BDNF par rapport aux rats contrôles [108]. Une partie de nos travaux (non publiée) a également évalué les troubles cognitifs en évaluant l'anhédonie des rats arthritiques avec le test de préférence au sucre [466–468]. Ce test, qui évalue un état « dépressif », consiste à mesurer la différence de consommation entre de l'eau pure et une solution de saccharose sucrée laissées en libre accès au choix durant leur période d'activité nocturne des animaux. Un rat en bonne santé préfère la solution de saccharose alors qu'un rat anhédonique montre une consommation de cette solution diminuée. Nous avons pratiqué ce test chez des rats contrôles sains, des rats arthritiques et des rats arthritiques traités par nor-NOHA. Nos résultats (**Figure 18**) montrent une réduction significative ($p<0,05$) de l'attrait pour le sucré chez les rats AIA témoignant d'une anhédonie, en accord avec les études antérieurs sur ce modèle [108]. Comme présenté dans la **Figure 18**, l'inhibition de l'arginase n'a pas amélioré l'anhédonie chez le rat AIA. Ces données devront être confirmées par d'autres tests neurologiques car le test de préférence au sucre est imparfait pour évaluer les troubles cognitifs chez le rongeur. Cependant, la piscine de Morris ou les labyrinthes nécessitent une mobilité que n'a pas le rat AIA et ne sont pas utilisables.

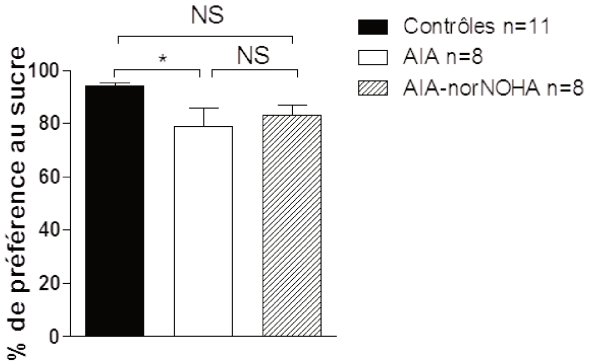


Figure 18 – Résultats du test de préférence au sucre montrant le pourcentage de préférence pour une solution de saccharose par rapport à de l'eau pure chez des rats contrôles, arthritiques (AIA) et arthritiques traités par inhibiteur d'arginase, la nor-NOHA, (AIA-norNOHA). Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n=8-11 groupes de rats par groupe). * $p<0,05$, NS = non significatif.

Nos résultats sont intéressants dans le sens où nous montrons qu'il n'est pas forcément nécessaire de réduire la sévérité de l'arthrite pour restaurer la fonction endothéliale cérébrale, ce qui est

encourageant pour les patients qui n'arrivent pas à atteindre une rémission sous DMARDs (soient environ 57 % des patients [42]). Un point à élucider est de déterminer si la réduction de la sévérité de l'arthrite réduit la DE cérébrovasculaire. Ainsi il serait intéressant d'étudier l'impact des DMARDs sur la DE cérébrovasculaire. En effet, bien que diminué par les traitements de la PR, le sur-risque CV reste présent chez les patients PR, et la prévalence des AVC ischémiques chez ces patients n'a pas changé entre la dernière décennie (de 2002 à 2010) et la décennie actuelle (de 2010 à 2018) [105], alors que les traitements ont beaucoup évolué. Cette absence d'amélioration du sur-risque cérébrovasculaire peut s'expliquer par le fait que les csDMARDs restent les traitements de première intention de la PR. En effet, dans cette étude la proportion de patients traités par MTX augmente entre les deux périodes (22 % de 2002 à 2010 *vs.* 45 % de 2010 à 2018). Ainsi, bien que 14 % des patients furent traités par bDMARDs au cours de la deuxième période (contre 0 % au cours de la première), cette étude reflète majoritairement les effets des csDMARDs par rapport aux autres thérapeutiques. Toutefois, cette étude ne peut remettre en cause les effets bénéfiques du MTX sur le risque d'AVC chez le patient PR, montrés par des études rétrospectives et méta-analyses [197,198], puisqu'elle n'inclue pas de population témoin. Cependant, il serait intéressant de favoriser l'accès aux bDMARDs aux patients à fort risque cérébrovasculaire puisqu'il a été montré que les anti-TNFα sont plus efficaces dans la réduction du risque d'AVC par rapport aux csDMARDs [469,470]. Un autre biais retrouvé dans l'étude menée sur 16 ans par Hashimoto *et al.* [105] est l'utilisation des GC, puisqu'il a été montré une augmentation du risque d'incidence des AVC par l'utilisation des GC (+ 57 %) chez les patients PR [197]. Toutefois, les effets des GC, mais également des AINS, sur la DE cérébrovasculaire n'ont pas été explorés. Aussi, il serait intéressant de déterminer leurs effets cérébrovasculaires. Parallèlement à cela, de façon étonnante, une récente revue de littérature indique que l'utilisation du MTX *exacerbe* les troubles cognitifs observés chez le patient PR [110]. Les mécanismes impliqués ne sont pas connus, mais des études mettent en évidence une atteinte neurotoxique en raison d'une leucoencéphalopathie induite par de faibles doses du traitement par MTX dans la PR [471,472] ; ou il peut être supposé que le MTX ne corrige pas la DE cérébrovasculaire – comme cela est observé au niveau aortique –, ce qui pourrait aggraver les atteintes neurologiques. Cette dernière hypothèse est à vérifier sur ACM isolées dans le modèle AIA traité par MTX et soumis au test au sucre.

3 Etude de la dysfonction coronaire et cardiaque

Depuis ces dernières années, le nombre d'études cliniques sur la FE coronarienne augmente en raison de l'existence aujourd'hui de techniques non invasives chez le patient PR. De façon surprenante, une seule étude chez l'animal s'est intéressée à la FE coronarienne dans un modèle d'arthrite induite au collagène chez le mouton [420]. Ainsi, notre troisième étude réalisée dans ce travail de thèse est la première à montrer la présence d'une DE coronarienne dans le modèle AIA, sans anomalie de réactivité aux vasocontractants, confirmant les résultats obtenus chez le patient PR par CFR [187,188,190,419] ou SEVR [297]. Toutefois les mécanismes impliqués dans cette DE n'ont pas été élucidés dans le cadre de notre travail car les tentatives d'exploration des mécanismes sont restées vaines en raison d'une importante variabilité de réponse des segments coronaires. Des études ultérieures sur coronaires pressurisées avec l'artériographe de Halpern seraient à réaliser pour aborder l'aspect mécanistique.

Notre modèle AIA présente une augmentation des taux circulants en ET-1 et Ang II, deux vasoconstricteurs puissants, dans le groupe AIA par rapport au groupe contrôle. Ces données sont en accord avec d'autres études menées dans le même modèle [373,473], mais également chez le patient PR [474–476]. Notre étude montre que l'hypertrophie cardiaque des rats, qui est majoritairement la conséquence d'une fibrose [421,429], est corrélée avec les taux circulants en ET-1 et Ang II, soulignant une potentielle implication de ces facteurs dans la fibrose myocardique. Cette hypothèse est en accord avec une étude menée chez le rat AIA qui montre qu'un traitement par ramipril, un inhibiteur de l'enzyme de conversion diminuant donc la biodisponibilité en Ang II (10 mg/kg/j pendant 28 jours), réduit la fibrose cardiaque [421] ; mais également avec une récente revue de littérature qui montre, chez le patient à risque CV mais non PR, que l'ET-1 est associée à l'augmentation de la fibrose et l'hypertrophie cardiaque [477]. Cette revue indique également que l'ET-1 pourrait être liée à l'HTA et pourrait être un facteur prédicteur de la mortalité post-infarctus ou en cas d'insuffisance cardiaque. Ainsi, l'Ang II et l'ET-1 apparaissent comme de bons marqueurs de la santé cardiaque des patients, ce qui reste à confirmer chez le patient PR. Dans notre étude, il n'est pas montré *ex vivo* d'anomalies de réponses vasoconstrictrices à l'ET-1 et à l'Ang II. Ainsi, le rôle délétère potentiel de l'ET-1 et de l'Ang II ne provient pas d'anomalies des récepteurs ou des voies de signalisation vasculaires, mais plutôt d'un excès d'agonistes endogènes. Il est connu qu'en cas d'arthrite, l'ET-1 et l'Ang II contribuent à la synovite. Des études montrent que le bosentan, un

antagoniste des récepteurs à l'endothéline [478,479], le périndopril [480] ou losartan [387] exercent un effet bénéfique sur les paramètres cliniques et biologiques dans différents modèles d'arthrite animaux (souris CIA ou rat induit au zymosan). Notre étude révèle pour la première fois l'existence d'une corrélation négative entre les taux circulants d'Ang II et d'ET-1 avec la fonction endothéliale coronarienne. Ceci est toutefois à confirmer par dosage des taux d'ET-1 et d'Ang II chez des patients PR à fort risque CV ou lors d'études dans des cohortes de patients PR ayant fait un infarctus du myocarde. Ces données sont en accord avec les effets bénéfiques sur la DE aortique de l'irbesartan et du losartan chez des rats AIA [50,384,387,391]. Ainsi, l'effet des bloqueurs du système rénine-agiotensine-aldostérone et d'antagoniste du récepteur à l'ET-1 sur la DE coronarienne serait intéressant à étudier dans notre modèle. Chez le patient, l'effet de ces traitements sur la DE coronarienne n'a jamais été étudié. Des études ont montré un effet bénéfique du ramipril [48], alors que le quinapril [372] n'a pas eu d'effets sur la FMD chez le patient PR. Aucune étude n'a été conduite avec un antagoniste à l'ET-1 en cas de PR. Toutefois, on peut noter que le bosentan diminue la DE chez les patients atteints de sclérodermie systémique [481], une pathologie auto-immune caractérisée par une inflammation systémique et une DE. L'ensemble de ces données confortent les recommandations de l'EULAR parues en 2016 [59] qui préconisent l'utilisation des bloqueurs du système rénine-angiotensine-aldostérone, comme un ARA II ou un IEC, dans le traitement de l'HTA du patient PR. Il serait également intéressant d'étudier l'effet des biothérapies sur la DE coronarienne car l'infliximab, un anti-TNFα [482], et l'anakinra, un antagoniste du récepteur à l'IL-1 [483], réduisent les taux circulants d'ET-1. Une récente étude montre qu'un traitement par vardenafil ou cilostazol chez le rat exprimant une arthrite et un diabète est capable de corriger la DE aortique, mais également de réduire les taux d'ET-1 et d'Ang II dans ce vaisseau [373], ce qui pourrait faire de l'inhibition des phosphodiestérases une piste pertinente pour la prise en charge vasculaire des patients PR.

Depuis quelques années nous assistons à une augmentation des données disponibles sur les atteintes cardiaques dans la PR grâce à une amélioration des techniques d'exploration. Il est désormais possible d'étudier l'inflammation cardiaque, la perfusion et la viabilité myocardique, de mesurer la fraction d'éjection et les volumes ventriculaires grâce à des technique d'imagerie par tomodensitométrie couplée ou non à de l'émission de positrons, d'imagerie par résonance magnétique ou d'échographie transthoracique [484]. Ces techniques ne sont plus invasives

(contrairement à la coronarographie qui était la technique de référence de l'exploration hémodynamique coronarienne) mais présentent le désavantage d'être coûteuses, opérateur-dépendantes ou irradiantes. Il est maintenant connu que le patient PR présente un risque augmenté d'IDM mais également d'insuffisance cardiaque [75,485], une inflammation myocardique [95], une dysfonction systolique et/ou diastolique [86,91,96], une hypertrophie cardiaque, une fibrose myocardique, un remodelage, ainsi que des valvulopathies [81,91–93,96]. Ces atteintes sont observées même chez le patient avec une faible activité de la maladie [97], soulignant l'importance de prendre en charge le risque CV du patient à tous les stades de la PR. Des anomalies similaires ont été observées dans les modèles animaux. Dans les modèles d'arthrite induite au collagène, d'arthrite spontanée ou induite par génie génétique, des atteintes vasculaires (augmentation de l'expression des iNOS et dysfonction contractile aortique), des valvulopathies, une inflammation et des lésions cardiaques (fibrose, dépôts d'immunoglobulines, nodules d'Aschoff) ont été montrées [486]. Une étude sur singes spontanément arthritiques rapporte des anomalies cardiaques (infiltration monocytaire, apoptose des cardiomyocytes et fibrose) bien avant que des dysfonctions cardiaques ne soient détectables cliniquement [89], indiquant une atteinte cardiaque silencieuse et précoce. Quelques études se sont intéressées aux atteintes cardiaques en cas d'AIA chez le rat et montrent une augmentation de espèces réactives de l'oxygène sur homogénats de cœur [422], une infiltration lymphocytaire cardiaque et une surface nécrosée plus importante [487] sur un modèle d'ischémie/reperfusion par ligature coronarienne, par rapport à des rats contrôles. Une autre étude a étudié l'effet du pré-conditionnement ischémique sur l'infarcissement myocardique provoquée par ischémie/reperfusion par ligature coronarienne [488]. Les rats contrôles pré-conditionnés présentent une surface de nécrose myocardique fortement diminuée par rapport aux rats contrôles non pré-conditionnés ; en revanche, les rats AIA présentent la même surface de nécrose importante qu'ils soient pré-conditionnés ou non, montrant que le pré-conditionnement devient inefficace en cas d'AIA. Toutefois, notre étude est la seule à s'être intéressée aux effets de l'ischémie-reperfusion sur cœur isolé perfusé de rat AIA selon la méthode de Langendorff. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que dans ce modèle, à l'instar des atteintes chez le patient, il y une inflammation et une hypertrophie cardiaque ainsi qu'une susceptibilité à l'ischémie myocardique accrue. Cependant, nous ne trouvons pas d'atteinte fonctionnelle (dysfonction systolique ventriculaire) en l'absence d'ischémie dans le modèle AIA, peut être en raison d'une durée de la période inflammatoire trop courte dans le temps. Aussi il serait intéressant d'étudier les anomalies cardiaques sur une modèle d'arthrite *chronique* tel que le modèle PIA.

Le modèle AIA pourrait être utilisé comme modèle pour mimer l'atteinte cardiaque en cas de PR, permettant ainsi d'étudier l'impact des DMARDs sur ces atteintes et ainsi approfondir les quelques données déjà existantes. Il est en effet montré actuellement que le traitement par MTX ne semble pas améliorer la dysfonction ventriculaire gauche des patients PR par rapport à une population contrôle [489]. De façon intéressante, l'utilisation hors-PR de faibles doses de MTX (15 à 20 mg/semaine) chez des patients présentant un risque CV élevé ne conduit pas à une diminution de l'inflammation systémique ou de l'incidence d'évènements cardiovasculaires par rapport aux patients à haut risque sans traitement par MTX [490]. En revanche, l'impact des autres csDMARDs sur les atteintes cardiaques n'a pas été étudié. Les bDMARDs présentent des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque en cas de PR [491]. En effet, les anti-TNFα conduisent à une diminution de l'inflammation cardiaque et une amélioration de la fraction d'éjection ventriculaire gauche et de la fonction cardiaque [211,492] et réduisent les taux de NT-proBNP [491]. De plus les patients traités par anti-TNFα présentent un risque d'IDM et de pathologies cardiaques diminué par rapport aux patients PR traités par csDMARDs [493]. L'utilisation de l'anakinra conduit à une amélioration de l'hypertrophie du ventricule gauche et réduit l'apoptose des cardiomyocytes sur un modèle de ligature coronarienne chez le rat par rapport à des rats ligaturés non traités [494], ce qui est confirmé chez le patient PR [495]. Il a été montré que le traitement par anakinra conduit à une amélioration de l'hypertrophie ventriculaire gauche, de la FMD et de la CFR retrouvés 3 heures et 1 mois chez le patient PR par rapport aux valeurs avant le traitement [190,496]. Il semblerait toutefois que l'effet bénéfique de l'anakinra ne s'observe qu'en conditions inflammatoires puisque l'utilisation de l'anakinra en post-IDM chez le patient non-PR augmenterait le risque de récidive d'IDM [497]. Le traitement par tocilizumab conduit également à une amélioration de l'atteinte hypertrophique ventriculaire gauche après un an de traitement chez le patient PR par rapport aux valeurs de base [498]. Selon les mécanismes d'action, les traitements ne semblent pas modifier de façon identique la fonction cardiaque et vasculaire. Ainsi, une récente étude a confirmé que l'anakinra et le tocilizumab améliorent tous deux les atteintes cardiaques et vasculaires, mais a aussi montré, en comparant les deux traitements entre eux, que l'anakinra a entraîné une amélioration plus marquée de l'hypertrophie ventriculaire et de la CFR, alors que le tocilizumab a conduit à de meilleures valeurs de vitesse d'onde de pouls et de pression artérielle [483]. Il a aussi été montré que l'association MTX + infliximab est sans effet sur la dysfonction ventriculaire gauche alors que

l'association MTX + tocilizumab l'améliore en comparaison avec un traitement par MTX seul [489]. En revanche, les effets des tsDMARDs n'ont pas encore étudiés.

En conclusion, ce travail de thèse conduit sur le modèle AIA chez le rat a permis d'apporter de nouvelles informations sur la physiopathologie de la DE en cas de PR au niveau d'artères de conductance (aorte et coronaire) et de résistance (artère cérébrale moyenne). Nos résultats montrent qu'en dépit d'une amélioration du risque CV du patient PR, le MTX n'améliore pas la DE aortique. Aussi, il est intéressant de mettre en place des thérapies adjuvantes, médicamenteuses ou non, pour améliorer la santé vasculaire de ces patients. Nos données suggèrent que l'augmentation d'incidence d'AVC et d'IDM serait liée à une DE des territoires cérébrovasculaire et coronarien, nécessitant la mise en place de mesures pour corriger ces atteintes fonctionnelles et réduire l'incidence de pathologies artérielles. Nous montrons également un rôle prépondérant de l'arginase dans la DE cérébrovasculaire. Ainsi, cette enzyme apparait comme une cible pertinente dans la réduction de la dysfonction endothéliale et potentiellement du risque cérébrovasculaire du patient PR. Toutefois, ces résultats seront à approfondir lors d'études fondamentales afin d'élucider les mécanismes impliqués dans la DE coronarienne, évaluer la cinétique d'apparition des DE coronarienne et cérébrale, et explorer l'effet des traitements de la PR, mais également des traitements adjuvants. La mise en place d'études translationnelles est également pertinente afin de confirmer les résultats obtenus dans les présentes études chez le patient PR.

Biliographie

1. Kahn M. Histoire de la polyarthrite rhumatoïde. *Rhumatol Prat*. 2009;Chapitre 2 : Histoire des maladies:18-20.

2. Polyarthrite rhumatoïde - Définition, Symptômes, Causes. Santepratique.fr. http://www.santepratique.fr/polyarthrite-rhumatoide.php. Published November 30, 2011. Accessed May 25, 2016.

3. Pillon F, Michiels Y. Epidémiologie et physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *Actual Pharm*. 2013;(Supplément formation au n°531).

4. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Therneau TM, Gabriel SE. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis Rheum*. 2010;62(6):1576-1582. doi:10.1002/art.27425

5. Haute Autorité de Santé. *Polyarthrite Rhumatoïde - Recommandations Professionnelles*.; 2007. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/polyarthrite_rhumatoide_-_synthese_de_lensemble_des_recommandations.pdf. Accessed November 4, 2015.

6. Bertin P, Fagnani F, Duburcq A, et al. Impact of rheumatoid arthritis on career progression, productivity, and employability: The PRET Study. *Joint Bone Spine*. 2015;82(5):306-311. doi:10.1016/j.jbspin.2015.05.001

7. van der Helm-van Mil A, Verpoot K, Breedveld F, Huizinga T, Toes R, de Vries R. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(4):1117-1121.

8. Schaeverbeke T, Truchetet M, Richez C. When and where does rheumatoid arthritis begin? *Joint Bone Spine*. 2012;79(6):550-554.

9. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2205-2219. doi:10.1056/NEJMra1004965

10. Zrour SH, Boumiza R, Sakly N, et al. The impact of pregnancy on rheumatoid arthritis outcome: the role of maternofetal HLA class II disparity. *Jt Bone Spine Rev Rhum*. 2010;77(1):36-40. doi:10.1016/j.jbspin.2009.11.009

11. Källberg H, Ding B, Padyukov L, et al. Smoking is a major preventable risk factor for Rheumatoid arthritis Estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(3):508-511. doi:10.1136/ard.2009.120899

12. Bagaitkar J, Daep CA, Patel CK, Renaud DE, Demuth DR, Scott DA. Tobacco Smoke Augments Porphyromonas gingivalis - Streptococcus gordonii Biofilm Formation. *PLoS ONE*. 2011;6(11). doi:10.1371/journal.pone.0027386

13. Collège Français des Enseignants en Rhumatologie (COFER). Item 121 : Polyarthrite rhumatoïde. 2011. http://campus.cerimes.fr/rhumatologie/enseignement/rhumato16/site/html/cours.pdf. Accessed April 28, 2016.

14. Prati C. Rôle de l'arginase dans la polyarthrite rhumatoïde. Etude in vivo chez le rat. October 2009.

15. Totoson P. Dysfonction endothéliale et polyarthrite rhumatoïde : cinétique d'évolution, mécanismes et traitements. Etude chez le rat. November 2015.

16. Burgey S. Place de l'étanercept dans la prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde. February 2014.

17. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primer*. 2018;4:18001. doi:10.1038/nrdp.2018.1

18. Aho K, Palosuo T, Raunio V, Puska P, Aromaa A, Salonen JT. When does rheumatoid disease start? *Arthritis Rheum*. 1985;28(5):485-489.

19. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(10):2741-2749. doi:10.1002/art.11223

20. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(9):1580-1588. doi:10.1136/ard.2010.138461

21. Daien C, Hua C, Gaujoux-Viala C, et al. Update of French society for rheumatology recommendations for managing rheumatoid arthritis. *Jt Bone Spine Rev Rhum*. October 2018. doi:10.1016/j.jbspin.2018.10.002

22. Peters MJL, Symmons DPM, McCarey D, et al. 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. doi:10.1136/ard.2009.113696

23. Combe B. Progression in early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2009;23(1):59-69. doi:10.1016/j.berh.2008.11.006

24. Combe B, Rincheval N. Que nous ont apporté les premières années d'études d'une cohorte de polyarthrites rhumatoïdes débutantes : la cohorte ESPOIR ? *Rev Rhum*. 2014;81(6):455-459. doi:10.1016/j.rhum.2014.06.008

25. Mouterde G, Morel J. Place de l'échographie dans la polyarthrite rhumatoïde en rémission. *Rev Rhum Monogr*. 2015;82(4):225-232. doi:10.1016/j.monrhu.2015.04.003

26. Cyteval C. MR imaging of the hands in rheumatoid arthritis. *J Radiol*. 2010;91(1 Pt 2):111-119.

27. Slosman F-X. *Polyarthrite Rhumatoïde: Lésions Des Poignets et Des Mains*.; 2015. http://www.info-radiologie.ch/polyarthrite-main.php. Accessed June 5, 2016.

28. COFER. Diapothèque du COFER. http://galerieunf3s.univ-nantes.fr/main.php. Published 2011. Accessed June 5, 2016.

29. COFER. Polyarthrite rhumatoïde, PR ; atteinte de l'avant-pied ; atteinte du pied, coup de vent péronier. http://galerieunf3s.univ-nantes.fr/main.php?g2_itemId=3878. Published 2011. Accessed June 5, 2016.

30. 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.

31. Bouaddi I, El Badri D, Hassani A, et al. Les critères d'évaluation de la polyarthrite rhumatoïde. *Rev Marocaine Rhumatol*. 2012;(19):19-23.

32. Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, et al. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatol Oxf Engl*. 2003;42(2):244-257.

33. Aletaha D, Nell VPK, Stamm T, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):R796-806. doi:10.1186/ar1740

34. Bruce B, Fries JF. The Stanford Health Assessment Questionnaire: Dimensions and Practical Applications. *Health Qual Life Outcomes*. 2003;1:20. doi:10.1186/1477-7525-1-20

35. VIDAL. Polyarthrite rhumatoïde - Prise en charge. https://www.vidal.fr/recommandations/1481/polyarthrite_rhumatoide/prise_en_charge/. Published January 22, 2019. Accessed March 1, 2019.

36. Laev SS, Salakhutdinov NF. Anti-arthritic agents: Progress and potential. *Bioorg Med Chem*. 2015;23(13):3059-3080. doi:10.1016/j.bmc.2015.05.010

37. Bullock J, Rizvi S, Saleh A, et al. Rheumatoid Arthritis: A Brief Overview of the Treatment. *Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Health Sci Cent*. September 2018. doi:10.1159/000493390

38. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA*. 2018;320(13):1360-1372. doi:10.1001/jama.2018.13103

39. Combe B, Landewe R, Daien CI, et al. 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(6):948-959. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210602

40. Combe B, Logeart I, Belkacemi MC, et al. Comparison of the long-term outcome for patients with rheumatoid arthritis with persistent moderate disease activity or disease remission during the first year after diagnosis: data from the ESPOIR cohort. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(4):724-729. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204178

41. Jagpal A, Navarro-Millán I. Cardiovascular co-morbidity in patients with rheumatoid arthritis: a narrative review of risk factors, cardiovascular risk assessment and treatment. *BMC Rheumatol*. 2018;2(1):10. doi:10.1186/s41927-018-0014-y

42. Ruscitti P, Cipriani P, Liakouli V, et al. The occurrence of subclinical and clinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis, results from the 3-year, multicenter, prospective, observational, GIRRCS study. In: *Annals of Rheumatic Diseases*. Vol 78 Supp2. Madrid; 2019:117-118.

43. Ruyssen-Witrand A, Guernec G, Nigon D, et al. Aiming for SDAI remission versus low disease activity at 1 year after inclusion in ESPOIR cohort is associated with better 3-year structural outcomes. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(9):1676-1683. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204906

44. Forestier R, André-Vert J, Guillez P, et al. Non-drug treatment (excluding surgery) in rheumatoid arthritis: clinical practice guidelines. *Jt Bone Spine Rev Rhum*. 2009;76(6):691-698. doi:10.1016/j.jbspin.2009.01.017

45. Soulaidopoulos S, Nikiphorou E, Dimitroulas T, Kitas GD. The Role of Statins in Disease Modification and Cardiovascular Risk in Rheumatoid Arthritis. *Front Med*. 2018;5. doi:10.3389/fmed.2018.00024

46. 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. doi:10.3899/jrheum.100582

47. Tam L-S, Li EK, Shang Q, et al. Effects of rosuvastatin on subclinical atherosclerosis and arterial stiffness in rheumatoid arthritis: a randomized controlled pilot trial. *Scand J Rheumatol*. 2011;40(6):411-421. doi:10.3109/03009742.2011.586649

48. Flammer AJ, Sudano I, Hermann F, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves vascular function in rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2008;117(17):2262-2269. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.734384

49. Refaat R, Salama M, Abdel Meguid E, El Sarha A, Gowayed M. Evaluation of the effect of losartan and methotrexate combined therapy in adjuvant-induced arthritis in rats. *Eur J Pharmacol*. 2013;698(1–3):421-428. doi:10.1016/j.ejphar.2012.10.024

50. 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. doi:10.1002/art.27384

51. Verhoeven F, Tordi N, Prati C, Demougeot C, Mougin F, Wendling D. Physical activity and rheumatoid arthritis, a systematic review. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(Suppl2):416.

52. Pellegrin M, Mazzolai L, Berthelot A, Laurant P. Dysfonction endothéliale et risque cardiovasculaire. L'exercice protège la fonction endothéliale et prévient la maladie cardiovasculaire. *Sci Sports*. 2009;24(2):63-73. doi:10.1016/j.scispo.2008.10.003

53. Metsios GS, Stavropoulos-Kalinoglou A, Sandoo A, et al. Vascular function and inflammation in rheumatoid arthritis: the role of physical activity. *Open Cardiovasc Med J*. 2010;4:89-96. doi:10.2174/1874192401004020089

54. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(6):960-977. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210715

55. Singh JA, Saag KG, Bridges SL, et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2016;68(1):1-26. doi:10.1002/art.39480

56. Cobb S, Anderson F, Bauer W. Length of Life and Cause of Death in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 1953;249(14):553-556. doi:10.1056/NEJM195310012491402

57. Aviña-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. doi:10.1002/art.24092

58. Dadoun S, Zeboulon-Ktorza N, Combescure C, et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: Systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine*. 2013;80(1):29-33. doi:10.1016/j.jbspin.2012.02.005

59. Agca R, Heslinga SC, Rollefstad S, et al. EULAR recommendations for cardiovascular disease risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory joint disorders: 2015/2016 update. *Ann Rheum Dis*. October 2016:annrheumdis-2016-209775. doi:10.1136/annrheumdis-2016-209775

60. Romano S, Salustri E, Ruscitti P, Carubbi F, Penco M, Giacomelli R. Cardiovascular and Metabolic Comorbidities in Rheumatoid Arthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2018;20(12):81. doi:10.1007/s11926-018-0790-9

61. Lindhardsen J, Ahlehoff O, Gislason GH, et al. The risk of myocardial infarction in rheumatoid arthritis and diabetes mellitus: a Danish nationwide cohort study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(6):929-934. doi:10.1136/ard.2010.143396

62. van Halm VP, Peters MJL, Voskuyl AE, 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(9):1395-1400. doi:10.1136/ard.2008.094151

63. Peters MJL, van Halm VP, Voskuyl AE, et al. Does rheumatoid arthritis equal diabetes mellitus as an independent risk factor for cardiovascular disease? A prospective study. *Arthritis Rheum*. 2009;61(11):1571-1579. doi:10.1002/art.24836

64. Curtis JR, Yang S, Singh JA, et al. Is Rheumatoid Arthritis a Cardiovascular Risk Equivalent to Diabetes? *Arthritis Care Res*. February 2018. doi:10.1002/acr.23535

65. Agca R, Hopman LHGA, Laan KCJ, et al. Cardiovascular Event Risk in Rheumatoid Arthritis is Higher than in Type 2 Diabetes: a 15 Year Longitudinal Study. *J Rheumatol*. May 2019. doi:10.3899/jrheum.180726

66. Naz SM, Farragher TM, Bunn DK, Symmons DPM, Bruce IN. The influence of age at symptom onset and length of followup on mortality in patients with recent-onset inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(4):985-989. doi:10.1002/art.23402

67. Bartoloni E, Alunno A, Bistoni O, Gerli R. How early is the atherosclerotic risk in rheumatoid arthritis? *Autoimmun Rev*. 2010;9(10):701-707. doi:10.1016/j.autrev.2010.06.001

68. Kerola AM, Kauppi MJ, Kerola T, Nieminen TVM. How early in the course of rheumatoid arthritis does the excess cardiovascular risk appear? *Ann Rheum Dis*. 2012;71(10):1606-1615. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201334

69. Radovits BJ, Fransen J, Shamma SA, Eijsbouts AM, Riel PLCM van, Laan RFJM. Excess mortality emerges after 10 years in an inception cohort of early rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res*. 2010;62(3):362-370. doi:10.1002/acr.20105

70. Arts EEA, Fransen J, Broeder AA den, Popa CD, Riel PLCM van. The effect of disease duration and disease activity on the risk of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis*. 2014;74(6):998-1003. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204531

71. Myasoedova E, Chandran A, Ilhan B, et al. The role of rheumatoid arthritis (RA) flare and cumulative burden of RA severity in the risk of cardiovascular disease. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(3):560-565. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206411

72. England BR, Sayles H, Michaud K, et al. Cause-Specific Mortality in Male US Veterans With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res*. 2016;68(1):36-45. doi:10.1002/acr.22642

73. Lacaille D, Avina-Zubieta JA, Sayre EC, Abrahamowicz M. Improvement in 5-year mortality in incident rheumatoid arthritis compared with the general population-closing the mortality gap. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(6):1057-1063. doi:10.1136/annrheumdis-2016-209562

74. Solomon DH, Reed GW, Kremer JM, et al. Disease Activity in Rheumatoid Arthritis and the Risk of Cardiovascular Events. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(6):1449-1455. doi:10.1002/art.39098

75. Avina-Zubieta JA, Thomas J, Sadatsafavi M, Lehman AJ, Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(9):1524-1529. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200726

76. Chen Y-R, Hsieh F-I, Chang C-C, Chi N-F, Wu H-C, Chiou H-Y. The effect of rheumatoid arthritis on the risk of cerebrovascular disease and coronary artery disease in young adults. *J Chin Med Assoc JCMA*. 2018;81(9):772-780. doi:10.1016/j.jcma.2018.03.009

77. Meune C, Touzé 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. doi:10.1016/j.acvd.2010.03.007

78. Faccini A, Kaski JC, Camici PG. Coronary microvascular dysfunction in chronic inflammatory rheumatoid diseases. *Eur Heart J*. 2016;37(23):1799-1806. doi:10.1093/eurheartj/ehw018

79. Mackey RH, Kuller LH, Moreland LW. Update on Cardiovascular Disease Risk in Patients with Rheumatic Diseases. *Rheum Dis Clin North Am*. 2018;44(3):475-487. doi:10.1016/j.rdc.2018.03.006

80. Meyer PW, Anderson R, Ker JA, Ally MT. Rheumatoid arthritis and risk of cardiovascular disease. *Cardiovasc J Afr*. 2018;29(5):317-321. doi:10.5830/CVJA-2018-018

81. Buleu F, Sirbu E, Caraba A, Dragan S. Heart Involvement in Inflammatory Rheumatic Diseases: A Systematic Literature Review. *Med Kaunas Lith*. 2019;55(6). doi:10.3390/medicina55060249

82. Holmqvist ME, Wedrén S, Jacobsson LTH, et al. No increased occurrence of ischemic heart disease prior to the onset of rheumatoid arthritis: results from two Swedish population-based rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum*. 2009;60(10):2861-2869. doi:10.1002/art.24855

83. Holmqvist ME, Wedrén S, Jacobsson LTH, et al. 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. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02260.x

84. Pujades-Rodriguez M, Duyx B, Thomas SL, et al. Rheumatoid Arthritis and Incidence of Twelve Initial Presentations of Cardiovascular Disease: A Population Record-Linkage Cohort Study in England. *PloS One*. 2016;11(3):e0151245. doi:10.1371/journal.pone.0151245

85. Mantel Ä, Holmqvist M, Nyberg F, et al. Risk Factors for the Rapid Increase in Risk of Acute Coronary Events in Patients With New-Onset Rheumatoid Arthritis: A Nested Case–Control Study. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(11):2845-2854. doi:10.1002/art.39267

86. Pan L, Wang T. Features of cardiac remodeling in Patients with Acute Coronary Syndrome Complicated with Rheumatoid Arthritis. *Sci Rep*. 2017;7. doi:10.1038/s41598-017-11123-1

87. Nicola PJ, Maradit-Kremers H, Roger VL, et al. The risk of congestive heart failure in rheumatoid arthritis: a population-based study over 46 years. *Arthritis Rheum*. 2005;52(2):412-420. doi:10.1002/art.20855

88. Løgstrup BB, Ellingsen T, Pedersen AB, Kjaersgaard A, Bøtker H-E, Maeng M. Development of heart failure in patients with rheumatoid arthritis: A Danish population-based study. *Eur J Clin Invest*. 2018;48(5):e12915. doi:10.1111/eci.12915

89. Zeng F, Wen W, Cui W, et al. Central role of RIPK1-VDAC1 pathway on cardiac impairment in a non-human primate model of rheumatoid arthritis. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;125:50-60. doi:10.1016/j.yjmcc.2018.10.015

90. Davis JM, Roger VL, Crowson CS, Kremers HM, Therneau TM, Gabriel SE. The presentation and outcome of heart failure in patients with rheumatoid arthritis differs from that in the general population. *Arthritis Rheum*. 2008;58(9):2603-2611. doi:10.1002/art.23798

91. Aslam F, Bandeali SJ, Khan NA, Alam M. Diastolic dysfunction in rheumatoid arthritis: a meta-analysis and systematic review. *Arthritis Care Res*. 2013;65(4):534-543. doi:10.1002/acr.21861

92. Myasoedova E, Davis JM, Crowson CS, et al. Brief report: rheumatoid arthritis is associated with left ventricular concentric remodeling: results of a population-based cross-sectional study. *Arthritis Rheum*. 2013;65(7):1713-1718. doi:10.1002/art.37949

93. Midtbø H, Gerdts E, Kvien TK, et al. Disease activity and left ventricular structure in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2015;54(3):511-519. doi:10.1093/rheumatology/keu368

94. Midtbø H, Semb AG, Matre K, Kvien TK, Gerdts E. Disease activity is associated with reduced left ventricular systolic myocardial function in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(2):371-376. doi:10.1136/annrheumdis-2016-209223

95. Amigues I, Tugcu A, Russo C, et al. Myocardial Inflammation, Measured Using 18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography-Computed Tomography (FDG PET-CT) is Associated with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. November 2018. doi:10.1002/art.40771

96. Kobayashi H, Kobayashi Y, Yokoe I, Akashi Y, Takei M, Giles JT. Magnetic Resonance Imaging-Detected Myocardial Inflammation and Fibrosis in Rheumatoid Arthritis: Associations With Disease Characteristics and N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide Levels. *Arthritis Care Res*. 2017;69(9):1304-1311. doi:10.1002/acr.23138

97. Biskup M, Biskup W, Majdan M, Targońska-Stępniak B. Cardiovascular system changes in rheumatoid arthritis patients with continued low disease activity. *Rheumatol Int*. 2018;38(7):1207-1215. doi:10.1007/s00296-018-4053-x

98. Targońska-Stępniak B, Biskup M, Biskup W, Majdan M. Diastolic dysfunction in rheumatoid arthritis patients with low disease activity. *Clin Rheumatol*. December 2018. doi:10.1007/s10067-018-4369-7

99. Masoud S, Lim PB, Kitas GD, Panoulas V. Sudden cardiac death in patients with rheumatoid arthritis. *World J Cardiol*. 2017;9(7):562-573. doi:10.4330/wjc.v9.i7.562

100. Adlan AM, Veldhuijzen van Zanten JJCS, Lip GYH, Paton JFR, Kitas GD, Fisher JP. Cardiovascular autonomic regulation, inflammation and pain in rheumatoid arthritis. *Auton Neurosci*. 2017;208:137-145. doi:10.1016/j.autneu.2017.09.003

101. Daïen CI, Fesler P. [Rheumatoid arthritis: a cardiovascular disease?]. *Ann Cardiol Angiol*. 2012;61(2):111-117. doi:10.1016/j.ancard.2011.07.008

102. Zöller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Risk of subsequent ischemic and hemorrhagic stroke in patients hospitalized for immune-mediated diseases: a nationwide follow-up study from Sweden. *BMC Neurol*. 2012;12:41. doi:10.1186/1471-2377-12-41

103. Wiseman SJ, Ralston SH, Wardlaw JM. Cerebrovascular Disease in Rheumatic Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke*. 2016;47(4):943-950. doi:10.1161/STROKEAHA.115.012052

104. Chen Y-R, Hsieh F-I, Lien L-M, et al. Rheumatoid arthritis significantly increased recurrence risk after ischemic stroke/transient ischemic attack. *J Neurol*. 2018;265(8):1810-1818. doi:10.1007/s00415-018-8885-9

105. Hashimoto H, Kawamura M, Yukami T, et al. Etiology of acute ischaemic cerebrovascular disease associated with rheumatoid arthritis: changes with progression of anti-inflammatory therapy. *Eur J Neurol*. 2018;12:1462-1469. doi:10.1111/ene.13751

106. Low ASL, Lunt M, Mercer LK, et al. Association Between Ischemic Stroke and Tumor Necrosis Factor Inhibitor Therapy in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2016;68(6):1337-1345. doi:10.1002/art.39582

107. Dichgans M, Leys D. Vascular Cognitive Impairment. *Circ Res*. 2017;120(3):573-591. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308426

108. Pedard M, Demougeot C, Prati C, Marie C. Brain-derived neurotrophic factor in adjuvant-induced arthritis in rats. Relationship with inflammation and endothelial dysfunction. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018;82:249-254. doi:10.1016/j.pnpbp.2017.11.006

109. Pedard M, Quirié A, Garnier P, Tessier A, Demougeot C, Marie C. The Cerebral Brain-Derived Neurotrophic Factor Pathway, Either Neuronal or Endothelial, Is Impaired in Rats with Adjuvant-Induced Arthritis. Connection with Endothelial Dysfunction. *Front Physiol*. 2017;8:1125. doi:10.3389/fphys.2017.01125

110. Meade T, Manolios N, Cumming SR, Conaghan PG, Katz P. Cognitive Impairment in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *Arthritis Care Res*. 2018;70(1):39-52. doi:10.1002/acr.23243

111. Bartolini M, Candela M, Brugni M, et al. Are behaviour and motor performances of rheumatoid arthritis patients influenced by subclinical cognitive impairments? A clinical and neuroimaging study. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20(4):491-497.

112. Appenzeller S, Bertolo MB, Costallat LTL. Cognitive impairment in rheumatoid arthritis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2004;26(5):339-343.

113. Shin SY, Katz P, Wallhagen M, Julian L. Cognitive Impairment in Persons With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res*. 2012;64(8):1144-1150. doi:10.1002/acr.21683

114. Atzeni F, Pipitone N, Iaccarino L, et al. Rheumatic diseases and autoimmune vascular dementia. *Autoimmun Rev*. 2017;16(12):1265-1269. doi:10.1016/j.autrev.2017.10.011

115. Lee JH, Kim G-T, Kim Y-K, Lee S-G. Cognitive function of patients with rheumatoid arthritis is associated with disease activity but not carotid atherosclerotic changes. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36(5):856-861.

116. Margaretten M, Julian L, Katz P, Yelin E. Depression in patients with rheumatoid arthritis: description, causes and mechanisms. *Int J Clin Rheumatol*. 2011;6(6):617-623. doi:10.2217/IJR.11.6

117. Matcham F, Rayner L, Steer S, Hotopf M. The prevalence of depression in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2013;52(12):2136-2148. doi:10.1093/rheumatology/ket169

118. Tsai T-Y, Lu M-C, Livneh H, Chiu S-Y, Lai N-S, Guo H-R. Does depression increase the risk of stroke in patients with rheumatoid arthritis? A population-based cohort study. *BMJ Open*. 2017;7(4):e014233. doi:10.1136/bmjopen-2016-014233

119. Farhi A, Cohen AD, Shovman O, Comaneshter D, Amital H, Amital D. Bipolar disorder associated with rheumatoid arthritis: A case-control study. *J Affect Disord*. 2016;189:287-289. doi:10.1016/j.jad.2015.09.058

120. Tanasescu C, Jurcut C, Jurcut R, Ginghina C. Vascular disease in rheumatoid arthritis: from subclinical lesions to cardiovascular risk. *Eur J Intern Med*. 2009;20(4):348-354. doi:10.1016/j.ejim.2008.09.005

121. Ghosh-Swaby OR, Kuriya B. Awareness and perceived risk of cardiovascular disease among individuals living with rheumatoid arthritis is low: results of a systematic literature review. *Arthritis Res Ther*. 2019;21(1):33. doi:10.1186/s13075-019-1817-y

122. England BR, Thiele GM, Anderson DR, Mikuls TR. Increased cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: mechanisms and implications. *BMJ*. 2018;361:k1036. doi:10.1136/bmj.k1036

123. European Society of Cardiology. SCORE Risk. https://www.escardio.org/Education/Practice-Tools/CVD-prevention-toolbox/SCORE-Risk-Charts. Published 2016. Accessed March 20, 2019.

124. 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. doi:10.1016/j.amjcard.2012.03.044

125. Arts EEA, Popa C, Broeder AAD, et al. Performance of four current risk algorithms in predicting cardiovascular events in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(4):668-674. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204024

126. Arts EEA, Popa CD, Broeder AAD, et al. Prediction of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: performance of original and adapted SCORE algorithms. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(4):674-680. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206879

127. Gonzalez-Martin C, Grande Morais S, Pertega-Diaz S, Seoane-Pillado T, Balboa-Barreiro V, Veiga-Seijo R. Concordance between the Different Cardiovascular Risk Scores in People with

Rheumatoid Arthritis and Psoriasis Arthritis. *Cardiol Res Pract*. 2019;2019:7689208. doi:10.1155/2019/7689208

128. Solomon DH, Greenberg J, Curtis JR, et al. Derivation and Internal Validation of an Expanded Cardiovascular Risk Prediction Score for Rheumatoid Arthritis: A Consortium of Rheumatology Researchers of North America Registry Study. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(8):1995-2003. doi:10.1002/art.39195

129. Crowson CS, Rollefstad S, Kitas GD, et al. Challenges of developing a cardiovascular risk calculator for patients with rheumatoid arthritis. *PLOS ONE*. 2017;12(3):e0174656. doi:10.1371/journal.pone.0174656

130. Wah-Suarez MI, Galarza-Delgado DA, Azpiri-Lopez JR, et al. The best cardiovascular risk calculator to predict carotid plaques in rheumatoid arthritis patients. *Clin Rheumatol*. 2018;37(9):2373-2380. doi:10.1007/s10067-018-4181-4

131. Crowson CS, Gabriel SE, Semb AG, et al. Rheumatoid arthritis-specific cardiovascular risk scores are not superior to general risk scores: a validation analysis of patients from seven countries. *Rheumatology*. 2017;56(7):1102-1110. doi:10.1093/rheumatology/kex038

132. 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(12):2737-2745.

133. Soubrier M, Chamoux NB, Tatar Z, Couderc M, Dubost J-J, Mathieu S. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2014;81(4):298-302. doi:10.1016/j.jbspin.2014.01.009

134. Panoulas VF, Douglas KMJ, Milionis HJ, et al. Prevalence and associations of hypertension and its control in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2007;46(9):1477-1482. doi:10.1093/rheumatology/kem169

135. Panoulas VF, Metsios GS, Pace AV, et al. Hypertension in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2008;47(9):1286-1298. doi:10.1093/rheumatology/ken159

136. Boyer J-F, Bongard V, Cantagrel A, et al. Link between traditional cardiovascular risk factors and inflammation in patients with early arthritis: results from a French multicenter cohort. *Arthritis Care Res*. 2012;64(6):872-880. doi:10.1002/acr.21623

137. Protogerou AD, Panagiotakos DB, Zampeli E, et al. Arterial hypertension assessed “out-of-office” in a contemporary cohort of rheumatoid arthritis patients free of cardiovascular disease is characterized by high prevalence, low awareness, poor control and increased vascular damage-associated “white coat” phenomenon. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(5):R142. doi:10.1186/ar4324

138. Baghdadi LR, Woodman RJ, Shanahan EM, Mangoni AA. The impact of traditional cardiovascular risk factors on cardiovascular outcomes in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*. 2015;10(2):e0117952. doi:10.1371/journal.pone.0117952

139. Ruscitti P, Cipriani P, Masedu F, et al. Increased Cardiovascular Events and Subclinical Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis Patients: 1 Year Prospective Single Centre Study. *PLOS ONE*. 2017;12(1):e0170108. doi:10.1371/journal.pone.0170108

140. Metsios GS, Stavropoulos-Kalinoglou A, Veldhuijzen van Zanten JJCS, et al. Rheumatoid arthritis, cardiovascular disease and physical exercise: a systematic review. *Rheumatol Oxf Engl*. 2008;47(3):239-248. doi:10.1093/rheumatology/kem260

141. Weber T, O'Rourke MF, Ammer M, Kvas E, Punzengruber C, Eber B. Arterial stiffness and arterial wave reflections are associated with systolic and diastolic function in patients with normal ejection fraction. *Am J Hypertens*. 2008;21(11):1194-1202. doi:10.1038/ajh.2008.277

142. Weber T. Systolic and diastolic function as related to arterial stiffness. *Artery Res*. 2010;4(4):122-127. doi:10.1016/j.artres.2010.10.033

143. Plutzky J, Liao KP. Lipids in RA: What do they mean? *Curr Rheumatol Rep*. 2018;20(2):8. doi:10.1007/s11926-018-0715-7

144. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, et al. Lipid paradox in rheumatoid arthritis: the impact of serum lipid measures and systemic inflammation on the risk of cardiovascular disease. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(3):482-487. doi:10.1136/ard.2010.135871

145. Navarro-Millán I, Yang S, DuVall SL, et al. 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*. 2016;75(2):341-347. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204987

146. Arida A, Protogerou AD, Kitas GD, Sfikakis PP. Systemic Inflammatory Response and Atherosclerosis: The Paradigm of Chronic Inflammatory Rheumatic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):1890. doi:10.3390/ijms19071890

147. Soubrier M, Dougados M. Athérome et polyarthrite rhumatoïde. *Rev Médecine Interne*. 2006;27:125-136.

148. George MD, Giles JT, Katz PP, et al. Impact of Obesity and Adiposity on Inflammatory Markers in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res*. 2017;69(12):1789-1798. doi:10.1002/acr.23229

149. Kang K-T, Sullivan JC, Sasser JM, Imig JD, Pollock JS. Novel nitric oxide synthase--dependent mechanism of vasorelaxation in small arteries from hypertensive rats. *Hypertension*. 2007;49(4):893-901. doi:10.1161/01.HYP.0000259669.40991.1e

150. Hoes JN, van der Goes MC, van Raalte DH, et al. Glucose tolerance, insulin sensitivity and β-cell function in patients with rheumatoid arthritis treated with or without low-to-medium dose glucocorticoids. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(11):1887-1894. doi:10.1136/ard.2011.151464

151. Giles JT, Danielides S, Szklo M, et al. Insulin Resistance in Rheumatoid Arthritis: Disease-Related Indicators and Associations With the Presence and Progression of Subclinical Atherosclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(3):626-636. doi:10.1002/art.38986

152. Kang EH, Liao KP, Kim SC. Cardiovascular Safety of Biologics and JAK Inhibitors in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2018;20(7):42. doi:10.1007/s11926-018-0752-2

153. Solomon DH, Goodson NJ, Katz JN, et al. Patterns of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(12):1608-1612. doi:10.1136/ard.2005.050377

154. Tiosano S, Yavne Y, Gendelman O, et al. Stroke among Rheumatoid Arthritis Patients: Does Age Matter? A Real-Life Study. *Neuroepidemiology*. 2017;49(3-4):99-105. doi:10.1159/000481992

155. Collège des Enseignants de Cardiologie et Maladies Vasculaires. Item 128 : Athérome, épidémiologie et physiopathologie, le malade polyathéromateux. 2012. http://campus.cerimes.fr/cardiologie-et-maladies-vasculaires/enseignement/cardio_128/site/html/cours.pdf. Accessed February 8, 2019.

156. Grad E, Danenberg HD. C-reactive protein and atherothrombosis: Cause or effect? *Blood Rev*. 2013;27(1):23-29. doi:10.1016/j.blre.2012.12.001

157. Reiss AB, Silverman A, Khalfan M, et al. Accelerated Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis: Mechanisms and Treatment. *Curr Pharm Des*. April 2019. doi:10.2174/1381612825666190430113212

158. Heiss G, Sharrett AR, Barnes R, Chambless LE, Szklo M, Alzola C. Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: associations with cardiovascular risk factors in the ARIC study. *Am J Epidemiol*. 1991;134(3):250-256.

159. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J. Rheumatoid Arthritis: A Disease Associated with Accelerated Atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum*. 2005;35(1):8-17. doi:10.1016/j.semarthrit.2005.03.004

160. Ambrosino P, Lupoli R, Di Minno A, Tasso M, Peluso R, Di Minno MND. Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. A meta-analysis of literature studies. *Thromb Haemost*. 2015;113(5):916-930. doi:10.1160/TH14-11-0921

161. Rugină M, Ciobanu-Jurcuţ R, Jurcuţ C, Mihăilă M, Apetrei E. Subclinical atherosclerosis, carotid intima-media thickness and the cardiovascular risk. *Romanian J Intern Med Rev Roum Med Interne*. 2003;41(4):357-363.

162. Lorenz Matthias W., Markus Hugh S., Bots Michiel L., Rosvall Maria, Sitzer Matthias. Prediction of Clinical Cardiovascular Events With Carotid Intima-Media Thickness. *Circulation*. 2007;115(4):459-467. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.628875

163. Tyrrell PN, Beyene J, Feldman BM, McCrindle BW, Silverman ED, Bradley TJ. Rheumatic disease and carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(5):1014-1026. doi:10.1161/ATVBAHA.109.198424

164. Raczkiewicz A, Juszkiewicz A, Kisiel B, et al. Treat-to-target therapy does not prevent excessive progression of carotid intima media thickness during the first year of therapy in early rheumatoid arthritis. *Arch Med Sci Atheroscler Dis*. 2016;1(1):e36-e43. doi:10.5114/amsad.2016.60225

165. Targońska-Stępniak B, Biskup M, Biskup W, Majdan M. Gender Differences in Cardiovascular Risk Profile in Rheumatoid Arthritis Patients with Low Disease Activity. *BioMed Res Int*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/3265847

166. Shoenfeld Y, Gerli R, Doria A, et al. Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases. *Circulation*. 2005;112(21):3337-3347. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.507996

167. Evans MR, Escalante A, Battafarano DF, Freeman GL, O'Leary DH, del Rincón I. Carotid atherosclerosis predicts incident acute coronary syndromes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(5):1211-1220. doi:10.1002/art.30265

168. del Rincón 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. doi:10.1002/art.21397

169. Kisiel B, Kruszewski R, Juszkiewicz A, et al. Common atherosclerosis genetic risk factors and subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis: the relevance of disease duration. *Rheumatol Int*. October 2018. doi:10.1007/s00296-018-4186-y

170. Semb AG, Rollefstad S, Provan SA, et al. Carotid Plaque Characteristics and Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2013;40(4):359-368. doi:10.3899/jrheum.120621

171. Chung CP, Oeser A, Raggi P, et al. Increased coronary-artery atherosclerosis in rheumatoid arthritis: relationship to disease duration and cardiovascular risk factors. *Arthritis Rheum*. 2005;52(10):3045-3053. doi:10.1002/art.21288

172. Chantler PD, Frisbee JC. Arterial function in cardio-metabolic diseases: from the microcirculation to the large conduits. *Prog Cardiovasc Dis*. 2015;57(5):489-496. doi:10.1016/j.pcad.2014.09.005

173. Hanon O, Haulon S, Lenoir H, et al. Relationship between arterial stiffness and cognitive function in elderly subjects with complaints of memory loss. *Stroke*. 2005;36(10):2193-2197. doi:10.1161/01.STR.0000181771.82518.1c

174. Chen LY, Leening MJG, Norby FL, et al. Carotid Intima-Media Thickness and Arterial Stiffness and the Risk of Atrial Fibrillation: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA), and the Rotterdam Study. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(5). doi:10.1161/JAHA.115.002907

175. Robustillo-Villarino M, Alegre-Sancho JJ, Rodilla-Sala E, et al. Pulse wave velocity and augmentation index are not independently associated with carotid atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2017;36(11):2601-2606. doi:10.1007/s10067-017-3680-z

176. 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. doi:10.1097/HJH.0b013e3280b0157e

177. Mäki-Petäjä KM, Hall FC, Booth AD, et al. Rheumatoid arthritis is associated with increased aortic pulse-wave velocity, which is reduced by anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Circulation*. 2006;114(11):1185-1192. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.601641

178. Avalos I, Chung CP, Oeser A, et al. Increased augmentation index in rheumatoid arthritis and its relationship to coronary artery atherosclerosis. *J Rheumatol*. 2007;34(12):2388-2394.

179. Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, et al. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med*. 2012;367(14):1310-1320. doi:10.1056/NEJMoa1107477

180. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Lopez-Diaz MJ, et al. HLA-DRB1 and persistent chronic inflammation contribute to cardiovascular events and cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;57(1):125-132. doi:10.1002/art.22482

181. Zhang J, Chen L, Delzell E, et al. 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. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204715

182. Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2000;11(6):212-217.

183. 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. doi:10.1016/j.jaut.2007.02.004

184. del Rincón I, Polak JF, O'Leary DH, et al. Systemic inflammation and cardiovascular risk factors predict rapid progression of atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(6):1118-1123. doi:10.1136/annrheumdis-2013-205058

185. Carey AL, Febbraio MA. Interleukin-6 and insulin sensitivity: friend or foe? *Diabetologia*. 2004;47(7):1135-1142. doi:10.1007/s00125-004-1447-y

186. El Bakry SA, Fayez D, Morad CS, et al. Ischemic heart disease and rheumatoid arthritis: Do inflammatory cytokines have a role? *Cytokine*. 2017;96:228-233. doi:10.1016/j.cyto.2017.04.026

187. Ciftci O, Yilmaz S, Topcu S, et al. Impaired coronary microvascular function and increased intima-media thickness in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis*. 2008;198(2):332-337. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.013

188. Kakuta K, Dohi K, Sato Y, et al. Chronic Inflammatory Disease Is an Independent Risk Factor for Coronary Flow Velocity Reserve Impairment Unrelated to the Processes of Coronary Artery Calcium Deposition. *J Am Soc Echocardiogr*. 2016;29(2):173-180. doi:10.1016/j.echo.2015.09.001

189. Daïen CI, Fesler P, Cailar G du, et al. Etanercept normalises left ventricular mass in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(6):881-887. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201489

190. Ikonomidis I, Tzortzis S, Andreadou I, et al. Increased Benefit of Interleukin 1 Inhibition on Vascular Function, Myocardial Deformation, and Twisting in Patients with Coronary Artery Disease and Coexisting Rheumatoid Arthritis. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014;7(4):619-628. doi:10.1161/CIRCIMAGING.113.001193

191. Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ, Hubbard R, Farrington P, Vallance P. Risk of Myocardial Infarction and Stroke after Acute Infection or Vaccination. *N Engl J Med*. 2004;351(25):2611-2618. doi:10.1056/NEJMoa041747

192. McCann SK, Cramond F, Macleod MR, Sena ES. Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Interleukin-1 Receptor Antagonist in Animal Models of Stroke: an Update. *Transl Stroke Res*. 2016;7(5):395-406. doi:10.1007/s12975-016-0489-z

193. Sobowale Oluwaseun A., Parry-Jones Adrian R., Smith Craig J., Tyrrell Pippa J., Rothwell Nancy J., Allan Stuart M. Interleukin-1 in Stroke. *Stroke*. 2016;47(8):2160-2167. doi:10.1161/STROKEAHA.115.010001

194. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, et al. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertens Dallas Tex 1979*. 2010;55(2):500-507. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.145094

195. Swardfager W, Winer DA, Herrmann N, Winer S, Lanctôt KL. Interleukin-17 in post-stroke neurodegeneration. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(3):436-447. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.01.021

196. Nerurkar L, Siebert S, McInnes IB, Cavanagh J. Rheumatoid arthritis and depression: an inflammatory perspective. *Lancet Psychiatry*. 2019;6(2):164-173. doi:10.1016/S2215-0366(18)30255-4

197. Roubille C, Richer V, Starnino T, et al. 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. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206624

198. Tam H-W, Chen C-M, Leong P-Y, et al. Methotrexate might reduce ischemic stroke in patients with rheumatoid arthritis: a population-based retrospective cohort study. *Int J Rheum Dis*. 2018;21(8):1591-1599. doi:10.1111/1756-185X.13267

199. Matcham F, Galloway J, Hotopf M, et al. The Impact of Targeted Rheumatoid Arthritis Pharmacologic Treatment on Mental Health: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Arthritis Rheumatol*. 2018;70(9):1377-1391. doi:10.1002/art.40565

200. Chandra S, Romero MJ, Shatanawi A, Alkilany AM, Caldwell RB, Caldwell RW. Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *Br J Pharmacol*. 2012;165(2):506-519. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01584.x

201. Crowson CS, Rollefstad S, Ikdahl E, et al. Impact of risk factors associated with cardiovascular outcomes in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(1):48-54. doi:10.1136/annrheumdis-2017-211735

202. Skeoch S, Bruce IN. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation? *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(7):390-400. doi:10.1038/nrrheum.2015.40

203. Bartoloni E, Alunno A, Valentini V, et al. Targeting Inflammation to Prevent Cardiovascular Disease in Chronic Rheumatic Diseases: Myth or Reality? *Front Cardiovasc Med*. 2018;5. doi:10.3389/fcvm.2018.00177

204. Ronda N, Greco D, Adorni MP, et al. Newly identified antiatherosclerotic activity of methotrexate and adalimumab: complementary effects on lipoprotein function and macrophage cholesterol metabolism. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2015;67(5):1155-1164. doi:10.1002/art.39039

205. Qiu C, Zhao X, Zhou Q, Zhang Z. High-density lipoprotein cholesterol efflux capacity is inversely associated with cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):212. doi:10.1186/s12944-017-0604-5

206. Teramachi J, Kukita A, Li Y-J, et al. Adenosine abolishes MTX-induced suppression of osteoclastogenesis and inflammatory bone destruction in adjuvant-induced arthritis. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 2011;91(5):719-731. doi:10.1038/labinvest.2011.9

207. Thornton CC, Al-Rashed F, Calay D, et al. Methotrexate-mediated activation of an AMPK-CREB-dependent pathway: a novel mechanism for vascular protection in chronic systemic inflammation. *Ann Rheum Dis*. January 2015. doi:10.1136/annrheumdis-2014-206305

208. Bălănescu A-R, Bojincă VC, Bojincă M, Donisan T, Bălănescu SM. Cardiovascular effects of methotrexate in immune-mediated inflammatory diseases. *Exp Ther Med*. 2019;17(2):1024-1029. doi:10.3892/etm.2018.6992

209. Mathieu S, Pereira B, Tournadre A, Soubrier M. Cardiovascular effects of hydroxychloroquine: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(10):e65. doi:10.1136/annrheumdis-2017-212571

210. Vlachopoulos C, Gravos A, Georgiopoulos G, et al. The effect of TNF-a antagonists on aortic stiffness and wave reflections: a meta-analysis. *Clin Rheumatol*. 2018;37(2):515-526. doi:10.1007/s10067-017-3657-y

211. Ntusi NAB, Francis JM, Sever E, et al. Anti-TNF modulation reduces myocardial inflammation and improves cardiovascular function in systemic rheumatic diseases. *Int J Cardiol*. 2018;270:253-259. doi:10.1016/j.ijcard.2018.06.099

212. Daïen CI, Duny Y, Barnetche T, Daurès J-P, Combe B, Morel J. Effect of TNF inhibitors on lipid profile in rheumatoid arthritis: a systematic review with meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(6):862-868. doi:10.1136/annrheumdis-2011-201148

213. Huvers FC, Popa C, Netea MG, van den Hoogen FHJ, Tack CJ. Improved insulin sensitivity by anti-TNFalpha antibody treatment in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(4):558-559. doi:10.1136/ard.2006.062323

214. Kadokami T, Frye C, Lemster B, Wagner CL, Feldman AM, McTiernan CF. Anti-tumor necrosis factor-alpha antibody limits heart failure in a transgenic model. *Circulation*. 2001;104(10):1094-1097.

215. Mann DL, McMurray JJV, Packer M, et al. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation*. 2004;109(13):1594-1602. doi:10.1161/01.CIR.0000124490.27666.B2

216. Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation*. 2003;107(25):3133-3140. doi:10.1161/01.CIR.0000077913.60364.D2

217. Bonetti NR, Diaz-Cañestro C, Liberale L, et al. Tumour Necrosis Factor-α Inhibition Improves Stroke Outcome in a Mouse Model of Rheumatoid Arthritis. *Sci Rep*. 2019;9. doi:10.1038/s41598-019-38670-z

218. Deb A, Dwibedi N, LeMasters T, Hornsby JA, Wei W, Sambamoorthi U. Tumor Necrosis Factor Inhibitor Therapy and the Risk for Depression Among Working-Age Adults with Rheumatoid Arthritis. *Am Health Drug Benefits*. 2019;12(1):30-38.

219. Souto A, Salgado E, Maneiro JR, Mera A, Carmona L, Gómez-Reino JJ. Lipid profile changes in patients with chronic inflammatory arthritis treated with biologic agents and tofacitinib in randomized clinical trials: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2015;67(1):117-127. doi:10.1002/art.38894

220. Gabay C, McInnes IB, Kavanaugh A, et al. Comparison of lipid and lipid-associated cardiovascular risk marker changes after treatment with tocilizumab or adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(10):1806-1812. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207872

221. Kim SC, Solomon DH, Rogers JR, et al. Cardiovascular Safety of Tocilizumab Versus Tumor Necrosis Factor Inhibitors in Patients With Rheumatoid Arthritis: A Multi-Database Cohort Study. *Arthritis Rheumatol*. 2017;69(6):1154-1164. doi:10.1002/art.40084

222. Ruiz-Limón P, Ortega R, Rosa IA de la, et al. Tocilizumab improves the proatherothrombotic profile of rheumatoid arthritis patients modulating endothelial dysfunction, NETosis, and inflammation. *Transl Res*. 2017;183:87-103. doi:10.1016/j.trsl.2016.12.003

223. Fioravanti A, Tenti S, Bacarelli MR, et al. Tocilizumab modulates serum levels of adiponectin and chemerin in patients with rheumatoid arthritis: potential cardiovascular protective role of IL-6 inhibition. *Clin Exp Rheumatol*. August 2018.

224. Kume K, Amano K, Yamada S, Hatta K, Ohta H, Kuwaba N. Tocilizumab Monotherapy Reduces Arterial Stiffness as Effectively as Etanercept or Adalimumab Monotherapy in Rheumatoid Arthritis: An Open-label Randomized Controlled Trial. *J Rheumatol*. 2011;38(10):2169-2171. doi:10.3899/jrheum.110340

225. Mathieu S, Couderc M, Glace B, et al. Effects of 6 months of abatacept treatment on aortic stiffness in patients with rheumatoid arthritis. *Biol Targets Ther*. 2013;7:259-264. doi:10.2147/BTT.S52003

226. Novikova DS, Popkova TV, Lukina GV, et al. The Effects of Rituximab on Lipids, Arterial Stiffness and Carotid Intima-Media Thickness in Rheumatoid Arthritis. *J Korean Med Sci*. 2016;31(2):202-207. doi:10.3346/jkms.2016.31.2.202

227. Kerekes G, Soltész P, Dér H, et al. Effects of rituximab treatment on endothelial dysfunction, carotid atherosclerosis, and lipid profile in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2009;28(6):705-710. doi:10.1007/s10067-009-1095-1

228. Mathieu S, Pereira B, Dubost J-J, Lusson J-R, Soubrier M. No significant change in arterial stiffness in RA after 6 months and 1 year of rituximab treatment. *Rheumatol Oxf Engl*. 2012;51(6):1107-1111. doi:10.1093/rheumatology/kes006

229. van Vollenhoven RF, Fleischmann R, Cohen S, et al. Tofacitinib or adalimumab versus placebo in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2012;367(6):508-519. doi:10.1056/NEJMoa1112072

230. Kume K, Amano K, Yamada S, et al. Tofacitinib improves atherosclerosis despite up-regulating serum cholesterol in patients with active rheumatoid arthritis: a cohort study. *Rheumatol Int*. 2017;37(12):2079-2085. doi:10.1007/s00296-017-3844-9

231. Qiu C, Zhao X, She L, et al. Baricitinib induces LDL-C and HDL-C increases in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Lipids Health Dis*. 2019;18(1):54. doi:10.1186/s12944-019-0994-7

232. Xie W, Huang Y, Xiao S, Sun X, Fan Y, Zhang Z. Impact of Janus kinase inhibitors on risk of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Ann Rheum Dis*. May 2019. doi:10.1136/annrheumdis-2018-214846

233. Nissen SE, Yeomans ND, Solomon DH, et al. Cardiovascular Safety of Celecoxib, Naproxen, or Ibuprofen for Arthritis. *N Engl J Med*. 2016;375(26):2519-2529. doi:10.1056/NEJMoa1611593

234. Lindhardsen J, Gislason GH, Jacobsen S, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a nationwide cohort study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(8):1515-1521. doi:10.1136/annrheumdis-2012-203137

235. Chen Y-R, Hsieh F-I, Chang C-C, Chi N-F, Wu H-C, Chiou H-Y. Effect on Risk of Stroke and Acute Myocardial Infarction of Nonselective Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Am J Cardiol*. 2018;121(10):1271-1277. doi:10.1016/j.amjcard.2018.01.044

236. Pharmacovigilance Risk Assessment Commitee (PRAC). New safety advice for diclofenac – CMDh endorses PRAC recommendation. https://www.ema.europa.eu/news/new-safety-advice-diclofenac-cmdh-endorses-prac-recommendation. Published 2013. Accessed October 29, 2018.

237. Pharmacovigilance Risk Assessment Commitee (PRAC). PRAC recommends updating advice on use of high-dose ibuprofen | European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/news/prac-recommends-updating-advice-use-high-dose-ibuprofen. Published 2015. Accessed October 29, 2018.

238. del Rincón I, Battafarano DF, Restrepo JF, Erikson JM, Escalante A. Glucocorticoid dose thresholds associated with all-cause and cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2014;66(2):264-272. doi:10.1002/art.38210

239. Zhang J, Xie F, Yun H, et al. Comparative effects of biologics on cardiovascular risk among older patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(10):1813-1818. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207870

240. Davis JM, Maradit Kremers H, Crowson CS, et al. Glucocorticoids and cardiovascular events in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis Rheum*. 2007;56(3):820-830. doi:10.1002/art.22418

241. Wong BW, Meredith A, Lin D, McManus BM. The biological role of inflammation in atherosclerosis. *Can J Cardiol*. 2012;28(6):631-641. doi:10.1016/j.cjca.2012.06.023

242. An J, Alemao E, Reynolds K, et al. Cardiovascular Outcomes Associated with Lowering Low-density Lipoprotein Cholesterol in Rheumatoid Arthritis and Matched Nonrheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2016;43(11):1989-1996. doi:10.3899/jrheum.160110

243. Kitas GD, Nightingale P, Armitage J, et al. Trial of atorvastatin for the primary prevention of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis (TRACE RA): A multicenter, randomized, placebo controlled trial. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. April 2019. doi:10.1002/art.40892

244. Vera MAD, Choi H, Abrahamowicz M, Kopec J, Lacaille D. Impact of statin discontinuation on mortality in patients with rheumatoid arthritis: A population-based study. *Arthritis Care Res*. 2012;64(6):809-816. doi:10.1002/acr.21643

245. Charles-Schoeman C, Khanna D, Furst DE, et al. Effects of high-dose atorvastatin on antiinflammatory properties of high density lipoprotein in patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J Rheumatol*. 2007;34(7):1459-1464.

246. Rosenson RS, Otvos JD, Hsia J. Effects of rosuvastatin and atorvastatin on LDL and HDL particle concentrations in patients with metabolic syndrome: a randomized, double-blind, controlled study. *Diabetes Care*. 2009;32(6):1087-1091. doi:10.2337/dc08-1681

247. Rollefstad S, Ikdahl E, Hisdal J, et al. Rosuvastatin-Induced Carotid Plaque Regression in Patients With Inflammatory Joint Diseases: The Rosuvastatin in Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis and Other Inflammatory Joint Diseases Study. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(7):1718-1728. doi:10.1002/art.39114

248. Ikdahl E, Rollefstad S, Hisdal J, et al. Sustained Improvement of Arterial Stiffness and Blood Pressure after Long-Term Rosuvastatin Treatment in Patients with Inflammatory Joint Diseases: Results from the RORA-AS Study. *PLOS ONE*. 2016;11(4):e0153440. doi:10.1371/journal.pone.0153440

249. 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. doi:10.1002/art.22632

250. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008;359(21):2195-2207. doi:10.1056/NEJMoa0807646

251. Navarro-Millán I, Charles-Schoeman C, Yang S, et al. 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. doi:10.1002/art.37916

252. Toms TE, Panoulas VF, Douglas KMJ, et al. 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. doi:10.1177/0003319710373749

253. Peters MJL, Voskuyl AE, Sattar N, Dijkmans B a. C, Smulders YM, Nurmohamed MT. The interplay between inflammation, lipids and cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: why ratios may be better. *Int J Clin Pract*. 2010;64(10):1440-1443. doi:10.1111/j.1742-1241.2009.02220.x

254. Khoja SS, Almeida GJ, Chester Wasko M, Terhorst L, Piva SR. Association of Light-Intensity Physical Activity With Lower Cardiovascular Disease Risk Burden in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res*. 2016;68(4):424-431. doi:10.1002/acr.22711

255. Metsios GS, Stavropoulos-Kalinoglou A, Veldhuijzen van Zanten JJCS, et al. Individualised exercise improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(4):748-751. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203291

256. Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios GS, Veldhuijzen van Zanten JJJCS, Nightingale P, Kitas GD, Koutedakis Y. Individualised aerobic and resistance exercise training improves cardiorespiratory fitness and reduces cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(11):1819-1825. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202075

257. Matsuzawa Y, Kwon T-G, Lennon RJ, Lerman LO, Lerman A. Prognostic Value of Flow-Mediated Vasodilation in Brachial Artery and Fingertip Artery for Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(11). doi:10.1161/JAHA.115.002270

258. Versari D, Daghini E, Virdis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelial Dysfunction as a Target for Prevention of Cardiovascular Disease. *Diabetes Care*. 2009;32(Suppl 2):S314-S321. doi:10.2337/dc09-S330

259. Prati C, Demougeot C, Guillot X, Godfrin-Valnet M, Wendling D. Endothelial dysfunction in joint disease. *Joint Bone Spine*. 2014;81(5):386-391. doi:10.1016/j.jbspin.2014.01.014

260. Marieb EN, Hoehn K. *Anatomie et Physiologie Humaines*. 4e édition. ERPI - Le Renouveau Pédagogique Editions; 2013.

261. 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. doi:10.1002/jemt.10091

262. Servier. Banque d'images PowerPoint - Artères - Physiologie. http://www.servier.fr/slidekit/?item=109. Accessed July 27, 2016.

263. Serné EH, de Jongh RT, Eringa EC, IJzerman RG, Stehouwer CDA. Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome. *Hypertens Dallas Tex 1979*. 2007;50(1):204-211. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.089680

264. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004;93(1):105-113. doi:10.1093/bja/aeh163

265. 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(1):202. doi:10.1186/ar4450

266. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EHC. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol Oxf Engl*. 2017;219(1):22-96. doi:10.1111/apha.12646

267. Sennequier N, Vadon-Le Goff S. Biosynthèse du monoxyde d'azote (NON) : mécanisme, régulation et contrôle. *Médecin/Sciences*. 1998;14(11):1185-1195.

268. Li D, Hayden EY, Panda K, et al. Regulation of the monomer-dimer equilibrium in inducible nitric-oxide synthase by nitric oxide. *J Biol Chem*. 2006;281(12):8197-8204. doi:10.1074/jbc.M507328200

269. Luo S, Lei H, Qin H, Xia Y. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. *Curr Pharm Des*. 2014;20(22):3548-3553. doi:10.2174/13816128113196660746

270. Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep PR*. 2008;60(1):3-11.

271. Kawabe J, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives -. *Circ J Off J Jpn Circ Soc*. 2010;74(5):836-843.

272. Edwards G, Félétou M, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflüg Arch Eur J Physiol*. 2010;459(6):863-879. doi:10.1007/s00424-010-0817-1

273. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 2007;100(2):158-173. doi:10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a

274. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*. 2007;100(2):174-190. doi:10.1161/01.RES.0000255690.03436.ae

275. Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2009;202(2):330-344. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.008

276. Ouattara A. Partie I - Physiologie cardio-circulatoire ; Chapitre 8 - Physiologie de la circulation coronaire. In: *Physiologie Humaine Appliquée*. 2ème. Arnette; 2017:83-88.

277. Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM. Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(2):H459-465. doi:10.1152/ajpheart.2000.279.2.H459

278. Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM. In vivo location and mechanism of EDHF-mediated vasodilation in canine coronary microcirculation. *Am J Physiol*. 1999;277(3):H1252-1259. doi:10.1152/ajpheart.1999.277.3.H1252

279. Duncker DJ, van Zon NS, Pavek TJ, Herrlinger SK, Bache RJ. Endogenous adenosine mediates coronary vasodilation during exercise after K(ATP)+ channel blockade. *J Clin Invest*. 1995;95(1):285-295.

280. Florence G. La physiologie de la circulation cérébrale. *Bull Académie Vét Fr*. 2004;157(3):19-30. doi:10.4267/2042/47708

281. Cipolla MJ. *The Cerebral Circulation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2009. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53081/. Accessed October 5, 2018.

282. Velly L, Bruder N. Partie IV - Physiologie du système nerveux ; Chapitre 55 - Circulation cérébrlae et physiologiqe du liquide céphalorachidien. In: *Physiologie Humaine Appliquée*. 2ème. Arnette; 2017:627-643.

283. Ashish. Circle Of Willis: Anatomy, Diagram And Functions » Science ABC. *Sci ABC*. September 2017. https://www.scienceabc.com/humans/circle-of-willis-anatomy-diagram-and-functions.html. Accessed February 15, 2019.

284. Lee RM. Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther*. 1995;66(1):149-173.

285. Faraci FM, Brian JE. Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke*. 1994;25(3):692-703. doi:10.1161/01.STR.25.3.692

286. Peterson EC, Wang Z, Britz G. Regulation of Cerebral Blood Flow. International Journal of Vascular Medicine. doi:10.1155/2011/823525

287. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1995;268(4 Pt 1):C799-822. doi:10.1152/ajpcell.1995.268.4.C799

288. Park WS, Son YK, Kim N, et al. Direct modulation of Ca2+-activated K+ current by H-89 in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol*. 2007;46(2):105-113. doi:10.1016/j.vph.2006.08.413

289. Grubb RL, Raichle ME, Phelps ME, Ratcheson RA. Effects of increased intracranial pressure on cerebral blood volume, blood flow, and oxygen utilization in monkeys. *J Neurosurg*. 1975;43(4):385-398. doi:10.3171/jns.1975.43.4.0385

290. Bergholm R, Leirisalo-Repo M, Vehkavaara S, Mäkimattila S, Taskinen M-R, Yki-Järvinen H. Impaired Responsiveness to NO in Newly Diagnosed Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(10):1637-1641. doi:10.1161/01.ATV.0000033516.73864.4E

291. González-Juanatey C, Llorca J, González-Gay MA. Correlation between endothelial function and carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis patients with long-standing disease. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(3):R101. doi:10.1186/ar3382

292. 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. doi:10.1002/art.30391

293. Murdaca G, Colombo BM, Cagnati P, Gulli R, Spanò F, Puppo F. Endothelial dysfunction in rheumatic autoimmune diseases. *Atherosclerosis*. 2012;224(2):309-317. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.05.013

294. Sandoo A, Veldhuijzen van Zanten JJCS, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. Vascular function and morphology in rheumatoid arthritis: a systematic review. *Rheumatol Oxf Engl*. 2011;50(11):2125-2139. doi:10.1093/rheumatology/ker275

295. 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. doi:10.1016/j.semarthrit.2011.08.003

296. Alomari MA, Keewan EF, Shammaa RA, Alawneh K, Khatib SY, Welsch MA. Vascular function and handgrip strength in rheumatoid arthritis patients. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:580863. doi:10.1100/2012/580863

297. Anyfanti P, Triantafyllou A, Gkaliagkousi E, et al. Subendocardial viability ratio in patients with rheumatoid arthritis: comparison with healthy controls and identification of prognostic factors. *Clin Rheumatol*. 2017;36(6):1229-1236. doi:10.1007/s10067-017-3659-9

298. Oláh C, Kardos Z, Sepsi M, et al. Assessment of intracranial vessels in association with carotid atherosclerosis and brain vascular lesions in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):213. doi:10.1186/s13075-017-1422-x

299. Khan F, Galarraga B, Belch JJF. The role of endothelial function and its assessment in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(5):253-261. doi:10.1038/nrrheum.2010.44

300. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation*. 2012;126(6):753-767. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.093245

301. Schubert R. Isolated Vessels. In: Dhein PDS, Mohr PDFW, MD MD, eds. *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Springer Berlin Heidelberg; 2005:198-211. doi:10.1007/3-540-26574-0_12

302. Hürlimann D, Forster A, Noll G, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2002;106(17):2184-2187.

303. Vaudo G, Marchesi S, Gerli R, et al. Endothelial dysfunction in young patients with rheumatoid arthritis and low disease activity. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(1):31-35.

304. Moroni L, Selmi C, Angelini C, Meroni PL. Evaluation of Endothelial Function by Flow-Mediated Dilation: a Comprehensive Review in Rheumatic Disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017;65(6):463-475. doi:10.1007/s00005-017-0465-7

305. Di Minno MND, Ambrosino P, Lupoli R, et al. Clinical assessment of endothelial function in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis of literature studies. *Eur J Intern Med*. 2015;26(10):835-842. doi:10.1016/j.ejim.2015.10.016

306. Xu S-Z, Wang P, Guan S-Y, et al. Decreased flow-mediated dilatation in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Postgrad Med J*. 2017;93(1099):260-265. doi:10.1136/postgradmedj-2016-134068

307. Adawi M, Watad A, Bragazzi NL, et al. Endothelial function in rheumatoid arthritis. *QJM Mon J Assoc Physicians*. 2018;111(4):243-247. doi:10.1093/qjmed/hcy010

308. Bosello S, Santoliquido A, Zoli A, et al. TNF-alpha blockade induces a reversible but transient effect on endothelial dysfunction in patients with long-standing severe rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2008;27(7):833-839. doi:10.1007/s10067-007-0803-y

309. Cypienė A, Dadonienė J, Rugienė R, et al. The influence of mean blood pressure on arterial stiffening and endothelial dysfunction in women with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Med Kaunas Lith*. 2010;46(8):522-530.

310. Fan C, Zhang Z, Mei Y, Wu C, Shen B. Impaired brachial artery flow-mediated dilation and increased carotid intima-media thickness in rheumatoid arthritis patients. *Chin Med J (Engl)*. 2012;125(5):832-837.

311. Foster W, Carruthers D, Lip GYH, Blann AD. Inflammation and Microvascular and Macrovascular Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis: Effect of Treatment. *J Rheumatol*. 2010;37(4):711-716. doi:10.3899/jrheum.090699

312. Foster W, Lip GYH, Raza K, Carruthers D, Blann AD. An observational study of endothelial function in early arthritis. *Eur J Clin Invest*. 2012;42(5):510-516. doi:10.1111/j.1365-2362.2011.02607.x

313. 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. doi:10.1186/ar2668

314. Holmes MV, Jiang B, McNeill K, et al. Paradoxical association of C-reactive protein with endothelial function in rheumatoid arthritis. *PloS One*. 2010;5(4):e10242. doi:10.1371/journal.pone.0010242

315. Irace C, Mancuso G, Fiaschi E, Madia A, Sesti G, Gnasso A. Effect of anti TNFalpha therapy on arterial diameter and wall shear stress and HDL cholesterol. *Atherosclerosis*. 2004;177(1):113-118. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.04.031

316. Kerekes G, Szekanecz Z, Dér H, et al. Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: a multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity. *J Rheumatol*. 2008;35(3):398-406.

317. Protogerou AD, Zampeli E, Fragiadaki K, Stamatelopoulos K, Papamichael C, Sfikakis PP. A pilot study of endothelial dysfunction and aortic stiffness after interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis*. 2011;219(2):734-736. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.015

318. Sarli B, Baktir AO, Cebicci M, et al. Predictors of endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Angiology*. 2014;65(9):778-782. doi:10.1177/0003319713504485

319. Södergren A, Karp K, Boman K, et al. Atherosclerosis in early rheumatoid arthritis: very early endothelial activation and rapid progression of intima media thickness. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):R158. doi:10.1186/ar3116

320. Spinelli FR, Di Franco M, Metere A, et al. Decrease of asymmetric dimethyl arginine after anti-TNF therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Drug Dev Res*. 2014;75 Suppl 1:S67-69. doi:10.1002/ddr.21200

321. Stamatelopoulos KS, Kitas GD, Papamichael CM, et al. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis versus diabetes: a comparative study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(10):1702-1708. doi:10.1161/ATVBAHA.109.190108

322. Temiz A, Gökmen F, Gazi E, et al. Epicardial adipose tissue thickness, flow-mediated dilatation of the brachial artery, and carotid intima-media thickness: Associations in rheumatoid arthritis patients. *Herz*. 2015;40 Suppl 3:217-224. doi:10.1007/s00059-014-4140-z

323. 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. doi:10.1002/art.10735

324. Verma I, Syngle A, Krishan P. Predictors of endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis in Indian population. *Indian Heart J*. 2017;69(2):200-206. doi:10.1016/j.ihj.2016.10.013

325. Veselinovic MV, Zivkovic VI, Toncev S, et al. Carotid artery intima-media thickness and brachial artery flow-mediated vasodilatation in patients with rheumatoid arthritis. *VASA Z Gefasskrankheiten*. 2012;41(5):343-351. doi:10.1024/0301-1526/a000220

326. Pingiotti E, Cipriani P, Marrelli A, et al. Surface expression of fractalkine receptor (CX3CR1) on CD4+/CD28 T cells in RA patients and correlation with atherosclerotic damage. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1107:32-41. doi:10.1196/annals.1381.004

327. Sandoo A, Kitas GD, Carroll D, Veldhuijzen van Zanten JJCS. 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. doi:10.1186/ar3847

328. Sandoo A, Dimitroulas T, Toms TE, 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(16-17):1399-1403. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.07.092

329. González-Gay MA, González-Juanatey C. Inflammation, endothelial function and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(4):122. doi:10.1186/ar3891

330. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-1143.

331. Sandoo A, Chanchlani 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. doi:10.1186/ar4396

332. Wong M, Toh L, Wilson A, et al. Reduced arterial elasticity in rheumatoid arthritis and the relationship to vascular disease risk factors and inflammation. *Arthritis Rheum*. 2003;48(1):81-89. doi:10.1002/art.10748

333. Arida A, Zampeli E, Konstantonis G, et al. 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. doi:10.1007/s10067-015-2914-1

334. Gonzalez-Juanatey C, Testa A, Garcia-Castelo A, et al. HLA-DRB1 status affects endothelial function in treated patients with rheumatoid arthritis. *Am J Med*. 2003;114(8):647-652.

335. Rodríguez-Rodríguez L, González-Juanatey C, Palomino-Morales R, et al. TNFA −308 (rs1800629) polymorphism is associated with a higher risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis*. 2011;216(1):125-130. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.10.052

336. Palomino-Morales R, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, et al. Interleukin-6 gene -174 promoter polymorphism is associated with endothelial dysfunction but not with disease susceptibility in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2009;27(6):964-970.

337. Palomino-Morales R, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, et al. A1298C polymorphism in the MTHFR gene predisposes to cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2):R71. doi:10.1186/ar2989

338. Luo Y, Wang Y, Luo W. C allele of -786 T>C polymorphism in the promoter region of endothelial nitric oxide synthase is responsible for endothelial dysfunction in the patients with rheumatoid arthritis. *J Cell Biochem*. June 2019. doi:10.1002/jcb.29184

339. 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-R643. doi:10.1186/ar1717

340. Hjeltnes G, Hollan I, Førre Ø, Wiik A, Mikkelsen K, Agewall S. Anti-CCP and RF IgM: predictors of impaired endothelial function in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol*. 2011;40(6):422-427. doi:10.3109/03009742.2011.585350

341. 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 Engl*. 2013;10:27. doi:10.1186/1476-9255-10-27

342. Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan AQ, Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2016;455:161-171. doi:10.1016/j.cca.2016.02.010

343. Yang X, Chang Y, Wei W. Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:6813016. doi:10.1155/2016/6813016

344. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl*. 1997;49:15-19.

345. Eriksson EE, Karlof E, Lundmark K, Rotzius P, Hedin U, Xie X. Powerful inflammatory properties of large vein endothelium in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(4):723-728. doi:10.1161/01.ATV.0000157578.51417.6f

346. Nabe T. Interleukin (IL)-33: new therapeutic target for atopic diseases. *J Pharmacol Sci*. 2014;126(2):85-91.

347. Wu M-Y, Li C-J, Hou M-F, Chu P-Y. New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10). doi:10.3390/ijms18102034

348. Turiel M, Tomasoni L, Sitia S, et al. Effects of long-term disease-modifying antirheumatic drugs on endothelial function in patients with early rheumatoid arthritis. *Cardiovasc Ther*. 2010;28(5):e53-64. doi:10.1111/j.1755-5922.2009.00119.x

349. Di Franco M, Lucchino B, Conti F, Valesini G, Spinelli FR. Asymmetric Dimethyl Arginine as a Biomarker of Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis. Mediators of Inflammation. doi:10.1155/2018/3897295

350. Şentürk T, Yılmaz N, Sargın G, Köseoğlu K, Yenisey Ç. Relationship between asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Rheumatol*. 2016;3(3):106-108. doi:10.5152/eurjrheum.2016.15096

351. Sandoo A, Dimitroulas T, Veldhuijzen van Zanten JJCS, et al. Lack of association between asymmetric dimethylarginine and in vivo microvascular and macrovascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2012;30(3):388-396.

352. Dimitroulas T, Sandoo A, Hodson J, Smith JP, Kitas GD. In vivo microvascular and macrovascular endothelial function is not associated with circulating dimethylarginines in patients with rheumatoid arthritis: a prospective analysis of the DRACCO cohort. *Scand J Clin Lab Invest*. 2016;76(4):331-337. doi:10.1080/00365513.2016.1177852

353. Huang X-L, Zhang L, Duan Y, Wang Y-J, Wang J. Association of Pentraxin 3 with Autoimmune Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arch Med Res*. 2016;47(3):223-231. doi:10.1016/j.arcmed.2016.05.006

354. Deyab G, Hokstad I, Whist JE, et al. Anti-rheumatic treatment is not associated with reduction of pentraxin 3 in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis. *PloS One*. 2017;12(2):e0169830. doi:10.1371/journal.pone.0169830

355. Caraba A, Crişan V, Romoşan I, Mozoş I, Murariu M. Vitamin D Status, Disease Activity, and Endothelial Dysfunction in Early Rheumatoid Arthritis Patients. *Dis Markers*. 2017;2017:5241012. doi:10.1155/2017/5241012

356. Apraş Bilgen Ş, Kalyoncu U, Erden A, et al. Assessment of subclinical atherosclerosis in psoriatic arthritis patients without clinically overt cardiovascular disease or traditional

atherosclerosis risk factors. *Turk Kardiyol Dernegi Arsivi Turk Kardiyol Derneginin Yayin Organidir*. 2018;46(5):358-365. doi:10.5543/tkda.2018.36169

357. Murdaca G, Spanò F, Cagnati P, Puppo F. Free radicals and endothelial dysfunction: potential positive effects of TNF-α inhibitors. *Redox Rep Commun Free Radic Res*. 2013;18(3):95-99. doi:10.1179/1351000213Y.0000000046

358. Kotani K, Miyamoto M, Ando H. The Effect of Treatments for Rheumatoid Arthritis on Endothelial Dysfunction Evaluated by Flow-Mediated Vasodilation in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2017;15(1):10-18.

359. Ursini F, Leporini C, Bene F, et al. Anti-TNF-alpha agents and endothelial function in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):5346. doi:10.1038/s41598-017-05759-2

360. 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. doi:10.1016/j.semarthrit.2013.05.005

361. Sidiropoulos PI, Siakka P, Pagonidis K, et al. Sustained improvement of vascular endothelial function during anti-TNFalpha treatment in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol*. 2009;38(1):6-10. doi:10.1080/03009740802363768

362. Dulai R, Perry M, Twycross-Lewis R, Morrissey D, Atzeni F, Greenwald S. The Effect of Tumor Necrosis Factor-α Antagonists on Arterial Stiffness in Rheumatoid Arthritis: A Literature Review. *Semin Arthritis Rheum*. 2012;42(1):1-8. doi:10.1016/j.semarthrit.2012.02.002

363. Hsue PY, Scherzer R, Grunfeld C, et al. 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. doi:10.1161/JAHA.114.001267

364. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Vazquez-Rodriguez TR, Diaz-Varela N, Garcia-Quiroga H, Gonzalez-Gay MA. Short-term improvement of endothelial function in rituximab-treated rheumatoid arthritis patients refractory to tumor necrosis factor alpha blocker therapy. *Arthritis Rheum*. 2008;59(12):1821-1824. doi:10.1002/art.24308

365. Benucci M, Saviola G, Manfredi M, Sarzi-Puttini P, Atzeni F. Factors correlated with improvement of endothelial dysfunction during rituximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Biol Targets Ther*. 2013;7:69-75. doi:10.2147/BTT.S39182

366. Ikonomidis I, Lekakis JP, Nikolaou M, et al. Inhibition of interleukin-1 by anakinra improves vascular and left ventricular function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2008;117(20):2662-2669. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.731877

367. Benucci M, Bandinelli F, Damiani A, et al. Factors correlated with the improvement of endothelial dysfunction during Abatacept therapy in patients with rheumatoid arthritis. *J Inflamm Res*. 2018;11:247-252. doi:10.2147/JIR.S156822

368. Sandoo A, Kitas GD. The impact of abatacept treatment on the vasculature in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33(4):589.

369. Verhoeven F, Prati C, Maguin-Gaté K, Wendling D, Demougeot C. Glucocorticoids and endothelial function in inflammatory diseases: focus on rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2016;18. doi:10.1186/s13075-016-1157-0

370. 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. doi:10.1080/03009740701286771

371. Mäki-Petäjä KM, Booth AD, Hall FC, et al. 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. doi:10.1016/j.jacc.2007.04.076

372. Tikiz C, Utuk O, Pirildar T, et al. Effects of Angiotensin-converting enzyme inhibition and statin treatment on inflammatory markers and endothelial functions in patients with longterm rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2005;32(11):2095-2101.

373. Wahba MGF, Messiha BAS, El-Daly ME-S, Abo-Saif AA. Vardenafil and cilostazol can improve vascular reactivity in rats with diabetes mellitus and rheumatoid arthritis co-morbidity. *Life Sci*. May 2019. doi:10.1016/j.lfs.2019.05.024

374. Fischer BD, Adeyemo A, O'Leary ME, Bottaro A. Animal models of rheumatoid pain: experimental systems and insights. *Arthritis Res Ther*. 2017;19. doi:10.1186/s13075-017-1361-6

375. Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2018;40(3):193-200. doi:10.1080/08923973.2018.1434793

376. Hegen M, Keith JC, 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. doi:10.1136/ard.2007.076430

377. Bolon B, Stolina M, King C, et al. Rodent Preclinical Models for Developing Novel Antiarthritic Molecules: Comparative Biology and Preferred Methods for Evaluating Efficacy, Rodent Preclinical Models for Developing Novel Antiarthritic Molecules: Comparative Biology and Preferred Methods for Evaluating Efficacy. *BioMed Res Int BioMed Res Int*. 2010;2011, 2011:e569068. doi:10.1155/2011/569068, 10.1155/2011/569068

378. Pearson CM. Development of arthritis, periarthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. 1956;91(1):95-101.

379. Gomes RP, Bressan E, Silva TM da, Gevaerd M da S, Tonussi CR, Domenech SC. Standardization of an experimental model suitable for studies on the effect of exercise on arthritis. *Einstein São Paulo Braz*. 2013;11(1):76-82.

380. Billiau A, Matthys P. Collagen-induced arthritis and related animal models: how much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(5-6):339-344. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.11.003

381. Schurgers E, Billiau A, Matthys P. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon-γ. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res*. 2011;31(12):917-926. doi:10.1089/jir.2011.0056

382. 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(3):R130. doi:10.1186/ar3860

383. Totoson P, Maguin-Gaté K, Nappey M, Wendling D, Demougeot C. Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis: Mechanistic Insights and Correlation with Circulating Markers of Systemic Inflammation. *PloS One*. 2016;11(1):e0146744. doi:10.1371/journal.pone.0146744

384. Zhang Y, Luo X, Zhou Y, et al. 2K1C-activated Angiotensin II (Ang II) exacerbates vascular damage in a rat model of arthritis through the ATR/ERK1/2 signaling pathway. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. 2017;66(10):881-890. doi:10.1007/s00011-017-1069-8

385. Palma Zochio Tozzato G, Taipeiro EF, Spadella MA, et al. Collagen-induced arthritis increases inducible nitric oxide synthase not only in aorta but also in the cardiac and renal microcirculation of mice. *Clin Exp Immunol*. 2016;183(3):341-349. doi:10.1111/cei.12728

386. Totoson P, Maguin-Gaté 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. doi:10.1002/art.39065

387. Hamilton K, Dunning L, Ferrell WR, Lockhart JC, MacKenzie A. Endothelium-derived contraction in a model of rheumatoid arthritis is mediated via angiotensin II type 1 receptors. *Vascul Pharmacol*. 2018;100:51-57. doi:10.1016/j.vph.2017.11.001

388. Totoson P, Maguin-Gaté K, Prigent-Tessier A, et al. Etanercept improves endothelial function via pleiotropic effects in rat adjuvant-induced arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*. April 2016. doi:10.1093/rheumatology/kew062

389. Verhoeven F, Totoson P, Maguin-Gaté K, et al. Glucocorticoids improve endothelial function in rheumatoid arthritis: a study in rats with adjuvant-induced arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2017;188(2):208-218. doi:10.1111/cei.12938

390. Verhoeven F, Totoson P, Marie C, et al. Diclofenac but not celecoxib improves endothelial function in rheumatoid arthritis: A study in adjuvant-induced arthritis. *Atherosclerosis*. 2017;266:136-144. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.09.033

391. 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. doi:10.1016/j.lfs.2013.04.011

392. Poredos P, Jezovnik MK. Testing endothelial function and its clinical relevance. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(1):1-8.

393. Tousoulis D, Simopoulou C, Papageorgiou N, et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacol Ther*. 2014;144(3):253-267. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.06.003

394. Turner J, Belch JJF, Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends Cardiovasc Med*. 2008;18(4):109-116. doi:10.1016/j.tcm.2008.02.001

395. Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, et al. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J*. 2010;31(9):1142-1148. doi:10.1093/eurheartj/ehq010

396. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(11):2137-2141. doi:10.1016/j.jacc.2004.08.062

397. Meimoun P. Explorer la réserve coronaire par échocardiographie-Doppler transthoracique. *Réal Cardiol*. 2013;(292):9-14.

398. Laugesen E, Høyem P, Fleischer J, et al. Reduced Subendocardial Viability Ratio Is Associated With Unfavorable Cardiovascular Risk Profile in Women With Short Duration of Type 2 Diabetes. *Am J Hypertens*. 2016;29(10):1165-1172. doi:10.1093/ajh/hpw066

399. Guan J, Zhang S, Zhou Q, Li C, Lu Z. Usefulness of Transcranial Doppler Ultrasound in Evaluating Cervical-Cranial Collateral Circulations. *Interv Neurol*. 2013;2(1):8-18. doi:10.1159/000354732

400. Chen Q, Li S, Lv G, Zhao Y. Application of Transcranial Color Doppler Ultrasonography for Assessing Middle Cerebral Arteries in Rheumatoid Arthritis. *Ultrasound Q*. 2017;33(4):281-283. doi:10.1097/RUQ.0000000000000312

401. 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.

402. Bryan RM, Eichler MY, Swafford MWG, Johnson TD, Suresh MS, Childres WF. Stimulation of α2Adrenoceptors Dilates the Rat Middle Cerebral Artery. *Anesthesiol J Am Soc Anesthesiol*. 1996;85(1):82-90.

403. Heiss C, Sievers RE, Amabile N, et al. 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. doi:10.1152/ajpheart.00811.2007

404. Belch JJF, Akbar N, Alapati V, Petrie J, Arthur S, Khan F. Longitudinal assessment of endothelial function in the microvasculature of mice in-vivo. *Microvasc Res*. 2013;85:86-92. doi:10.1016/j.mvr.2012.10.008

405. Bordy R, Totoson P, Prati C, Marie C, Wendling D, Demougeot C. Microvascular endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2018;14(7):404-420. doi:10.1038/s41584-018-0022-8

406. Erre GL, Buscetta G, Paliogiannis P, et al. Coronary flow reserve in systemic rheumatic diseases: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2018;38(7):1179-1190. doi:10.1007/s00296-018-4039-8

407. Ursini F, Ruscitti P, Caio GPI, Manfredini R, Giacomelli R, De Giorgio R. The effect of non-TNF-targeted biologics on vascular dysfunction in rheumatoid arthritis: A systematic literature review. *Autoimmun Rev*. March 2019. doi:10.1016/j.autrev.2019.03.008

408. Hänsel S, Lässig 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.

409. Guin A, Chatterjee Adhikari M, Chakraborty S, Sinhamahapatra P, Ghosh A. Effects of disease modifying anti-rheumatic drugs on subclinical atherosclerosis and endothelial dysfunction which has been detected in early rheumatoid arthritis: 1-year follow-up study. *Semin Arthritis Rheum*. 2013;43(1):48-54. doi:10.1016/j.semarthrit.2012.12.027

410. El-Gowilly SM, Helmy MM, El-Gowelli HM. Pioglitazone ameliorates methotrexate-induced renal endothelial dysfunction via amending detrimental changes in some antioxidant parameters, systemic cytokines and Fas production. *Vascul Pharmacol*. 2015;74:139-150. doi:10.1016/j.vph.2015.07.002

411. Sankrityayan H, Majumdar AS. Curcumin and folic acid abrogated methotrexate induced vascular endothelial dysfunction. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016;94(1):89-96. doi:10.1139/cjpp-2015-0156

412. Noguchi K, Hamadate N, Matsuzaki T, et al. Increasing dihydrobiopterin causes dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in rats in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(3):H721-729. doi:10.1152/ajpheart.01089.2010

413. Miriyala S, Gongora Nieto MC, Mingone C, et al. Bone morphogenic protein-4 induces hypertension in mice: role of noggin, vascular NADPH oxidases, and impaired vasorelaxation. *Circulation*. 2006;113(24):2818-2825. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.611822

414. Cosentino F, Rubattu S, Savoia C, Venturelli V, Pagannonne E, Volpe M. Endothelial dysfunction and stroke. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;38 Suppl 2:S75-78.

415. Hu X, De Silva TM, Chen J, Faraci FM. Cerebral Vascular Disease and Neurovascular Injury in Ischemic Stroke. *Circ Res*. 2017;120(3):449-471. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308427

416. Pudlo M, Demougeot C, Girard-Thernier C. Arginase Inhibitors: A Rational Approach Over One Century. *Med Res Rev*. 2017;37(3):475-513. doi:10.1002/med.21419

417. Chandrasekharan UM, Wang Z, Wu Y, et al. Elevated levels of plasma symmetric dimethylarginine and increased arginase activity as potential indicators of cardiovascular comorbidity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):123. doi:10.1186/s13075-018-1616-x

418. Turiel M, Atzeni F, Tomasoni L, et al. Non-invasive assessment of coronary flow reserve and ADMA levels: a case-control study of early rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Oxf Engl*. 2009;48(7):834-839. doi:10.1093/rheumatology/kep082

419. Recio-Mayoral A, Mason JC, Kaski JC, Rubens MB, Harari OA, Camici PG. Chronic inflammation and coronary microvascular dysfunction in patients without risk factors for coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2009;30(15):1837-1843. doi:10.1093/eurheartj/ehp205

420. 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. doi:10.1159/000358367

421. Shi Q, Abusarah J, Baroudi G, Fernandes JC, Fahmi H, Benderdour M. Ramipril attenuates lipid peroxidation and cardiac fibrosis in an experimental model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(5):R223. doi:10.1186/ar4062

422. Schubert AC, Wendt MMN, de Sá-Nakanishi AB, et al. Oxidative state and oxidative metabolism of the heart from rats with adjuvant-induced arthritis. *Exp Mol Pathol*. 2016;100(3):393-401. doi:10.1016/j.yexmp.2016.03.005

423. Bahaa N, Abd El Moeim Attia A. Effect of omega-3 on cardiac muscle structure in a model of rheumatoid arthritis in rat. A light and electron microscopic study. *Eur J Pharm Med Res*. 2017;4(8):9-19.

424. Ho E, Karimi Galougahi K, Liu C-C, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol*. 2013;1(1):483-491. doi:10.1016/j.redox.2013.07.006

425. Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:135625. doi:10.1155/2008/135625

426. Giles JT, Fernandes V, Lima JAC, Bathon JM. Myocardial dysfunction in rheumatoid arthritis: epidemiology and pathogenesis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(5):195-207. doi:10.1186/ar1814

427. Davis JM, Knutson KL, Strausbauch MA, et al. A signature of aberrant immune responsiveness identifies myocardial dysfunction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(6):1497-1506. doi:10.1002/art.30323

428. Zhang W, Chancey AL, Tzeng H-P, et al. The Development of Myocardial Fibrosis in Transgenic Mice with Targeted Overexpression of Tumor Necrosis Factor Requires Mast Cell-Fibroblast Interactions. *Circulation*. 2011;124(19):2106-2116. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.052399

429. Pironti G, Bersellini-Farinotti A, Agalave NM, et al. Cardiomyopathy, oxidative stress and impaired contractility in a rheumatoid arthritis mouse model. *Heart*. 2018;104(24):2026-2034. doi:10.1136/heartjnl-2018-312979

430. Xu J, Carretero OA, Liu Y-H, et al. Role of AT2 receptors in the cardioprotective effect of AT1 antagonists in mice. *Hypertens Dallas Tex 1979*. 2002;40(3):244-250.

431. Annussek T, Szuwart T, Kleinheinz J, Koiky C, Wermker K. In vitro inhibition of HUVECs by low dose methotrexate - insights into oral adverse events. *Head Face Med*. 2014;10:19. doi:10.1186/1746-160X-10-19

432. Merkle CJ, Moore IM (Ki), Penton BS, et al. Methotrexate Causes Apoptosis in Postmitotic Endothelial Cells. *Biol Res Nurs*. 2000;2(1):5-14. doi:10.1177/109980040000200102

433. Omata T, Segawa Y, Inoue N, Tsuzuike N, Itokazu Y, Tamaki H. Methotrexate suppresses nitric oxide production ex vivo in macrophages from rats with adjuvant-induced arthritis. *Res Exp Med Z Für Gesamte Exp Med Einschl Exp Chir*. 1997;197(2):81-90.

434. Crabtree MJ, Tatham AL, Al-Wakeel Y, et al. Quantitative regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) coupling by both tetrahydrobiopterin-eNOS stoichiometry and biopterin redox status: insights from cells with tet-regulated GTP cyclohydrolase I expression. *J Biol Chem*. 2009;284(2):1136-1144. doi:10.1074/jbc.M805403200

435. Morrow VA, Foufelle F, Connell JMC, Petrie JR, Gould GW, Salt IP. Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem*. 2003;278(34):31629-31639. doi:10.1074/jbc.M212831200

436. Simjee SU, Jawed H, Quadri J, Saeed SA. Quantitative gait analysis as a method to assess mechanical hyperalgesia modulated by disease-modifying antirheumatoid drugs in the adjuvant-induced arthritic rat. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(5):R91. doi:10.1186/ar2290

437. Le Goff B, Soltner E, Charrier C, et al. A combination of methotrexate and zoledronic acid prevents bone erosions and systemic bone mass loss in collagen induced arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(6):R185. doi:10.1186/ar2877

438. Morgan SL, Baggott JE, Bernreuter WK, Gay RE, Arani R, Alarcón GS. MTX affects inflammation and tissue destruction differently in the rat AA model. *J Rheumatol*. 2001;28(7):1476-1481.

439. Hisadome M, Fukuda T, Adachi K, Komatsu H. Combination benefit of a pyrimidylpiperazine derivative (Y-40138) and methotrexate in arthritic rats. *Eur J Pharmacol*. 2004;497(3):351-359. doi:10.1016/j.ejphar.2004.07.058

440. Baggott JE, Morgan SL. Methotrexate and Erythro-9-(2-hydroxynon-3-yl) Adenine Therapy for Rat Adjuvant Arthritis and the Effect of Methotrexate on In Vivo Purine Metabolism. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2007;31(2):95-101. doi:10.1016/j.ejps.2007.02.006

441. Bilasy SE, Essawy SS, Mandour MF, Ali EAI, Zaitone SA. Myelosuppressive and hepatotoxic potential of leflunomide and methotrexate combination in a rat model of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rep PR*. 2015;67(1):102-114. doi:10.1016/j.pharep.2014.08.009

442. Tuncel J, Haag S, Hoffmann MH, et al. Animal Models of Rheumatoid Arthritis (I): Pristane-Induced Arthritis in the Rat. *PLOS ONE*. 2016;11(5):e0155936. doi:10.1371/journal.pone.0155936

443. Chouk M, Bordy R, Moretto J, Wendling D, Totoson P, Demougeot C. Pristane-Induced Arthritis in Dark Agouti rat is a relevant model for mimicking vascular dysfunction and lipid paradox in rheumatoid arthritis. *Jt Bone Spine Rev Rhum*. 2019;86(4):483-490. doi:10.1016/j.jbspin.2018.12.001

444. Dessein PH, López-Mejias R, González-Juanatey C, et al. Independent relationship of osteoprotegerin concentrations with endothelial activation and carotid atherosclerosis in patients with severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2014;41(3):429-436. doi:10.3899/jrheum.131037

445. Park Y-J, Kim J-Y, Park J, Choi J-J, Kim W-U, Cho C-S. Bone erosion is associated with reduction of circulating endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2014;66(6):1450-1460.

446. Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(4):203-221. doi:10.1038/nrendo.2016.12

447. Grcevic D, Jajic Z, Kovacic N, et al. Peripheral blood expression profiles of bone morphogenetic proteins, tumor necrosis factor-superfamily molecules, and transcription factor Runx2 could be used as markers of the form of arthritis, disease activity, and therapeutic responsiveness. *J Rheumatol*. 2010;37(2):246-256. doi:10.3899/jrheum.090167

448. Reiss AB, Carsons SE, Anwar K, et al. Atheroprotective effects of methotrexate on reverse cholesterol transport proteins and foam cell transformation in human THP-1 monocyte/macrophages. *Arthritis Rheum*. 2008;58(12):3675-3683. doi:10.1002/art.24040

449. Coomes E, Chan ESL, Reiss AB. Methotrexate in atherogenesis and cholesterol metabolism. *Cholesterol*. 2011;2011:503028. doi:10.1155/2011/503028

450. Vincenzi F, Padovan M, Targa M, et al. A2A Adenosine Receptors Are Differentially Modulated by Pharmacological Treatments in Rheumatoid Arthritis Patients and Their Stimulation Ameliorates Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *PLoS ONE*. 2013;8(1). doi:10.1371/journal.pone.0054195

451. Beinsberger J, Heemskerk JWM, Cosemans JMEM. Chronic arthritis and cardiovascular disease: altered blood parameters give rise to a prothrombotic propensity. *Semin Arthritis Rheum*. 2014;44(3):345-352. doi:10.1016/j.semarthrit.2014.06.006

452. Lai WKC, Kan MY. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Ann Nutr Metab*. 2015;67(1):1-12. doi:10.1159/000437098

453. Deminice R, Rosa FT. Creatine supplementation decreased homocysteine plasma levels in rats but not humans: A critical review with meta-analysis. *J Nutr Intermed Metab*. 2016;3:50-57. doi:10.1016/j.jnim.2016.01.001

454. Schroecksnadel K, Frick B, Kaser S, et al. Moderate hyperhomocysteinaemia and immune activation in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2003;338(1-2):157-164.

455. Schroecksnadel K, Frick B, Winkler C, Leblhuber F, Wirleitner B, Fuchs D. Hyperhomocysteinemia and immune activation. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(11):1438-1443. doi:10.1515/CCLM.2003.221

456. Elkan A-C, Håkansson N, Frostegård J, Hafström I. Low level of physical activity in women with rheumatoid arthritis is associated with cardiovascular risk factors but not with body fat mass--a cross sectional study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011;12:13. doi:10.1186/1471-2474-12-13

457. Shin J-H, Lee Y, Kim SG, Choi BY, Lee H-S, Bang S-Y. The beneficial effects of Tai Chi exercise on endothelial function and arterial stiffness in elderly women with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):380. doi:10.1186/s13075-015-0893-x

458. Morris SM. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br J Pharmacol*. 2009;157(6):922-930. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00278.x

459. Barakat W, Fahmy A, Askar M, El-Kannishy S. Effectiveness of arginase inhibitors against experimentally induced stroke. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2018;391(6):603-612. doi:10.1007/s00210-018-1489-1

460. Ovsepian SV, O'Leary VB. Can Arginase Inhibitors Be the Answer to Therapeutic Challenges in Alzheimer's Disease? *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. 2018;15(4):1032-1035. doi:10.1007/s13311-018-0668-6

461. Scalera Fortunato, Borlak Jürgen, Beckmann Bibiana, et al. Endogenous Nitric Oxide Synthesis Inhibitor Asymmetric Dimethyl l-Arginine Accelerates Endothelial Cell Senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(10):1816-1822. doi:10.1161/01.ATV.0000141843.77133.fc

462. Xiong Y, Fru MF, Yu Y, Montani J-P, Ming X-F, Yang Z. Long term exposure to L-arginine accelerates endothelial cell senescence through arginase-II and S6K1 signaling. *Aging*. 2014;6(5):369-379.

463. Schulman SP, Becker LC, Kass DA, et al. L-arginine therapy in acute myocardial infarction: the Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA*. 2006;295(1):58-64. doi:10.1001/jama.295.1.58

464. Moretto J, Girard C, Demougeot C. The role of arginase in aging: A systematic review. *Exp Gerontol*. 2019;116:54-73. doi:10.1016/j.exger.2018.12.011

465. Tangphao O, Grossmann M, Chalon S, Hoffman BB, Blaschke TF. Pharmacokinetics of intravenous and oral L-arginine in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;47(3):261-266. doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00883.x

466. Rygula R, Abumaria N, Flügge G, Fuchs E, Rüther E, Havemann-Reinecke U. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res*. 2005;162(1):127-134. doi:10.1016/j.bbr.2005.03.009

467. Niu L, Jin X, Jin L, Zhang Y, Liu B, Li C. Feasibility of focal cerebral ischemia and reperfusion surgery combined with chronic unpredictable mild stress to simulate the post-stroke depressive state in rats. *Behav Brain Funct BBF*. 2015;11:39. doi:10.1186/s12993-015-0085-5

468. Möller M, Fourie J, Harvey BH. Efavirenz exposure, alone and in combination with known drugs of abuse, engenders addictive-like bio-behavioural changes in rats. *Sci Rep*. 2018;8(1):12837. doi:10.1038/s41598-018-29978-3

469. Singh S, Fumery M, Singh AG, et al. Comparative Risk of Cardiovascular Events with Biologic and Synthetic Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Arthritis Care Res*. March 2019. doi:10.1002/acr.23875

470. Tang C-H, Yu F, Huang C-Y, Chen D-Y. Potential benefits of biologics on stroke and mortality in patients with rheumatoid arthritis: A nationwide population-based cohort study in Taiwan. *Int J Rheum Dis*. June 2019. doi:10.1111/1756-185X.13611

471. Matsuda M, Kishida D, Kinoshita T, et al. Leukoencephalopathy induced by low-dose methotrexate in a patient with rheumatoid arthritis. *Intern Med Tokyo Jpn*. 2011;50(19):2219-2222.

472. González-Suárez I, Aguilar-Amat MJ, Trigueros M, Borobia AM, Cruz A, Arpa J. Leukoencephalopathy due to oral methotrexate. *Cerebellum Lond Engl*. 2014;13(1):178-183. doi:10.1007/s12311-013-0528-1

473. Wang D, Hu S, Zhu J, et al. Angiotensin II type 2 receptor correlates with therapeutic effects of losartan in rats with adjuvant-induced arthritis. *J Cell Mol Med*. 2013;17(12):1577-1587. doi:10.1111/jcmm.12128

474. Haq A, El-Ramahi K, Al-Dalaan A, Al-Sedairy ST. Serum and synovial fluid concentrations of endothelin-1 in patients with rheumatoid arthritis. *J Med*. 1999;30(1-2):51-60.

475. Pache M, Schwarz HA, Kaiser HJ, et al. Elevated plasma endothelin-1 levels and vascular dysregulation in patients with rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2002;8(9):CR616-619.

476. Chang Y, Wei W. Angiotensin II in inflammation, immunity and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2015;179(2):137-145. doi:10.1111/cei.12467

477. Jankowich M, Choudhary G. Endothelin-1 levels and cardiovascular events. *Trends Cardiovasc Med*. February 2019. doi:10.1016/j.tcm.2019.01.007

478. Conte F de P, Barja-Fidalgo C, Verri WA, et al. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB4, TNF-alpha, and CXCL-1. *J Leukoc Biol*. 2008;84(3):652-660. doi:10.1189/jlb.1207827

479. Donate PB, Cunha TM, Verri WA, et al. Bosentan, an endothelin receptor antagonist, ameliorates collagen-induced arthritis: the role of TNF-α in the induction of endothelin system genes. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. 2012;61(4):337-348. doi:10.1007/s00011-011-0415-5

480. Wang Y, Kou J, Zhang H, et al. The renin-angiotensin system in the synovium promotes periarticular osteopenia in a rat model of collagen-induced arthritis. *Int Immunopharmacol*. 2018;65:550-558. doi:10.1016/j.intimp.2018.11.001

481. Sfikakis PP, Papamichael C, Stamatelopoulos KS, et al. Improvement of vascular endothelial function using the oral endothelin receptor antagonist bosentan in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(6):1985-1993. doi:10.1002/art.22634

482. Kotyla PJ, Owczarek A, Rakoczy J, Lewicki M, Kucharz EJ, Emery P. Infliximab treatment increases left ventricular ejection fraction in patients with rheumatoid arthritis: assessment of heart function by echocardiography, endothelin 1, interleukin 6, and NT-pro brain natriuretic peptide. *J Rheumatol*. 2012;39(4):701-706. doi:10.3899/jrheum.110751

483. Ikonomidis I, Pavlidis G, Katsimbri P, et al. Differential effects of inhibition of interleukin 1 and 6 on myocardial, coronary and vascular function. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc*. March 2019. doi:10.1007/s00392-019-01443-9

484. Haute Autorité de Santé. *Rapport d'évaluation technologique : Evaluation de l'imagerie cardiaque non invasive dans le diagnostic des coronaropathies chroniques stables*.; 2016:127. https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2016-12/rapport_imagerie_cardiaque.pdf. Accessed June 5, 2016.

485. Lim SL, Lam CSP, Segers VFM, Brutsaert DL, De Keulenaer GW. Cardiac endothelium-myocyte interaction: clinical opportunities for new heart failure therapies regardless of ejection fraction. *Eur Heart J*. 2015;36(31):2050-2060. doi:10.1093/eurheartj/ehv132

486. Sanghera C, Wong LM, Panahi M, Sintou A, Hasham M, Sattler S. Cardiac phenotype in mouse models of systemic autoimmunity. *Dis Model Mech*. 2019;12(3). doi:10.1242/dmm.036947

487. Wojciechowska M, Szukiewicz D. The extent of ischemia-reperfusion injury in adjuvant arthritis rats. In: *Recent Researches in Environment and Biomedicine*. ; 2012:6. http://www.wseas.us/e-library/conferences/2012/Vouliagmeni/GED/GED-01.pdf. Accessed June 5, 2019.

488. Wojciechowska M, Wątroba M, Ciużyńska G, Bral M, Szukiewicz D. Ischaemic heart preconditioning in rats with adjuvant-induced arthritis. *Kardiol Pol*. 2013;71(8):839-844. doi:10.5603/KP.2013.0196

489. Kobayashi Y, Kobayashi H, Hirano M, Giles JT. Left Ventricular Regional Dysfunction Using Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Rheumatoid Arthritis Patients Without Cardiac Symptoms: Comparison Between Methotrexate and Biologics Treatment Groups. *J Rheumatol*. 2014;41(7):1560-1562. doi:10.3899/jrheum.121363

490. Ridker PM, Everett BM, Pradhan A, et al. Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events. *N Engl J Med*. 2019;380(8):752-762. doi:10.1056/NEJMoa1809798

491. Baniaamam M, Paulus WJ, Blanken AB, Nurmohamed MT. The effect of biological DMARDs on the risk of congestive heart failure in rheumatoid arthritis: a systematic review. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18(5):585-594. doi:10.1080/14712598.2018.1462794

492. Vizzardi E, Cavazzana I, Franceschini F, et al. Left ventricular function in rheumatoid arthritis during anti-TNF-α treatment: a speckle tracking prospective echocardiographic study. *Monaldi Arch Chest Dis Arch Monaldi Mal Torace*. 2016;84(1-2):716. doi:10.4081/monaldi.2015.716

493. Low ASL, Symmons DPM, Lunt M, et al. Relationship between exposure to tumour necrosis factor inhibitor therapy and incidence and severity of myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(4):654-660. doi:10.1136/annrheumdis-2016-209784

494. Abbate A, Salloum FN, Vecile E, et al. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation*. 2008;117(20):2670-2683. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.740233

495. Abbate A, Kontos MC, Grizzard JD, et al. Interleukin-1 blockade with anakinra to prevent adverse cardiac remodeling after acute myocardial infarction (Virginia Commonwealth University Anakinra Remodeling Trial [VCU-ART] Pilot study). *Am J Cardiol*. 2010;105(10):1371-1377.e1. doi:10.1016/j.amjcard.2009.12.059

496. Ikonomidis I, Tzortzis S, Lekakis J, et al. Lowering interleukin-1 activity with anakinra improves myocardial deformation in rheumatoid arthritis. *Heart Br Card Soc*. 2009;95(18):1502-1507. doi:10.1136/hrt.2009.168971

497. Hjort M, Eggers KM, Lindhagen L, et al. Increased Inflammatory Activity in Patients 3 Months after Myocardial Infarction with Nonobstructive Coronary Arteries. *Clin Chem*. May 2019. doi:10.1373/clinchem.2018.301085

498. Kobayashi Y, Kobayashi H, Giles JT, Hirano M, Nakajima Y, Takei M. Association of tocilizumab treatment with changes in measures of regional left ventricular function in rheumatoid arthritis, as assessed by cardiac magnetic resonance imaging. *Int J Rheum Dis*. 2016;19(11):1169-1174. doi:10.1111/1756-185X.12632

ÉCOLE DOCTORALE
Environnements - Santé
Bourgogne | Franche-Comté

Titre : Dysfonction endothéliale au niveau de différents territoires vasculaires en cas de polyarthrite rhumatoïde : physiopathologie et perspectives thérapeutiques

Mots clés : dysfonction endothéliale – polyarthrite rhumatoïde – vaisseaux – cœur – cerveau – traitements

Résumé : La polyarthrite rhumatoïde (PR) est le rhumatisme chronique le plus fréquent caractérisé par une augmentation du risque de mortalité cardiovasculaire (CV). Ce sur-risque est la conséquence d'une athérogenèse accélérée, mais aussi d'atteintes microvasculaires, secondaires à une dysfonction endothéliale (DE). La réversibilité de la DE en fait une cible thérapeutique pertinente pour réduire la surmortalité en cas de PR. Ces dernières années, la physiopathologie de la DE au niveau des artères de conductance a été comprise grâce aux modèles animaux d'arthrite, principalement par le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant (AIA). Toutefois, les effets du méthotrexate (MTX), traitement de première intention de la PR, sur la DE sont toujours inconnus. De même, les études sur la DE des vaisseaux coronariens et cérébraux font défaut.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier les effets du MTX sur la DE aortique et de comprendre les mécanismes impliqués, mais aussi d'explorer et caractériser la DE au niveau des artères cérébrales moyennes et des artères coronaires dans le modèle AIA chez le rat.

Dans une première étude, nos résultats ont montré qu'un traitement de 21 jours par MTX (1 mg/kg/semaine) n'améliore pas la DE aortique en dépit d'effets positifs sur la sévérité clinique et l'inflammation systémique.

Dans une seconde étude, nos données révèlent que le modèle AIA est associé à une DE au niveau des artères cérébrales moyennes, avec un rôle déterminant de la suractivité de l'arginase, comme en témoigne la capacité d'un traitement par nor-NOHA (40 mg/kg/jour), un inhibiteur d'arginase, à complétement inverser la DE cérébrovasculaire.

Dans une troisième étude, nous avons démontré que le modèle AIA est caractérisé par une DE coronarienne positivement corrélée avec les taux plasmatiques d'endothéline-1 et d'angiotensine II, par une inflammation et une hypertrophie cardiaque, et une augmentation de la susceptibilité à l'ischémie myocardique.

En conclusion, nos données montrent que les effets positifs du MTX sur le risque CV ne sont pas dus à une amélioration de la DE aortique, soulignant la nécessité de trouver des traitements ciblant spécifiquement le système CV en tant que traitements adjuvants des médicaments antirhumatismaux actuels. De plus, nos données montrent que le modèle AIA est un bon modèle pour mimer les atteintes cardiaques et cérébrovasculaires et pour étudier l'impact des nouveaux traitements visant à réduire le risque CV dans la PR.

Title: Endothelial dysfunction in various vascular beds in case of rheumatoid arthritis: pathophysiology and therapeutic perspectives

Keywords: endothelial dysfunction – rheumatoid arthritis – vessels – heart – brain – treatments

Abstract: Rheumatoid arthritis (RA) is the more frequent chronic rheumatism characterized by an increased risk of cardiovascular (CV) mortality. This over-risk is the consequence of accelerated atherosclerosis, but also of microvascular damages, secondary to an endothelial dysfunction (ED). The reversibility of the ED makes of it a relevant therapeutic target to reducing excessive mortality in RA. In recent years, pathophysiology of ED in conductance arteries has been understood thank to animal models of arthritis, mainly the adjuvant-induced arthritis (AIA) model in rats. However, the effects of methotrexate (MTX), first-line treatment in RA, on ED are still unknown. Likewise, studies on ED of the coronary and cerebral vasculature are lacking.

The aim of this thesis work was to study the effect of MTX on aortic ED and to dissect the mechanisms involved, but also to explore and characterize ED on MCA and coronary arteries in the widely-used model of adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats.

In a first study, our results showed that a 21-days treatment with MTX (1 mg/kg/week) did not improve aortic ED despite positive effects on clinical severity and systemic inflammation.

In a second study, our data reported that the AIA model was associated with ED in middle cerebral arteries, involving a seminal role of arginase upregulation, as attested by the capacity of a treatment with nor-NOHA (40 mg/kg/day), an arginase inhibitor, to fully reverse cerebrovascular ED.

In a third study, we demonstrated that the AIA model was characterized by a coronary ED positively correlated to plasma levels of endothelin-1 and angiotensin II, by a cardiac inflammation and hypertrophy, and an increased susceptibility to myocardial ischemia.

In conclusion, our data indicate that positive effects on CV risk of MTX do not involve improving aortic ED, underlying the necessity to find accurate therapies targeting specifically the CV system as adjuvant treatments to the current anti-rheumatic drugs. Moreover, our data showed that the AIA model is relevant for mimicking cardiac and cerebrovascular impairments, and to study the impact of new treatments for reducing CV risk in RA.

UBFC
UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
Université Bourgogne Franche-Comté
32, avenue de l'Observatoire
25000 Besancon