



THÈSE DE DOCTORAT
École Doctorale Biologie Santé de Lille

Évaluation de l'effet du tofacitinib sur les tissus osseux et adipeux dans la polyarthrite rhumatoïde

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} mars 2023 à 13h30
au Pôle Recherche
par **Jean-Guillaume LETAROUILLY**

JURY

Présidente :

Madame la Professeure Anne TOURNADRE

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Bernard CORTET

Madame la Professeure Béatrice BOUVARD

Monsieur le Docteur Alain GUIGNANDON

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Julien PACCOU

Codirectrice de thèse :

Madame le Docteur Aline CLABAUT

*Ἄνδρα μοι ἔννεπε, μοῦσα, πολύτροπον, ὃς μάλα πολλὰ
πλάγχθη, ἐπεὶ Τροίης ἱερὸν πτολίεθρον ἔπερσεν·*

Homère, Odyssée, Chant I

Feierlich, nicht schnell

Anton Bruckner, Symphonie n° 8 en ut mineur, IV. Finale

*Devant ses yeux se produisit une apparition inexplicable : une voiture
s'arrêta [...] et un monsieur en uniforme en sauta [...]. Quel ne fut pas
l'effroi [...] de Kovalev, en reconnaissant que c'était son propre nez !*

Nicolas Vassiliévitch Gogol, Nouvelles de Pétersbourg, Le Nez

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury. Mes sincères remerciements à la **Professeure Béatrice Bouvard** qui me fait l'honneur et la gentillesse d'être rapporteuse dans ce jury de thèse. Merci pour votre bienveillance dans nos différents échanges épistoliers électroniques.

Je remercie également le **Docteur Alain Guignandon** d'avoir accepté le rôle de rapporteur après avoir été membre de mon comité de suivi de thèse. Merci pour votre gentillesse, vos conseils avisés et votre bienveillance pendant nos rendez-vous annuels de comité qui ont permis d'améliorer sensiblement ce travail de thèse.

Je remercie la **Professeure Anne Tournadre** de me faire le plaisir de siéger comme présidente de ce jury de thèse. Vos conseils lors du comité de suivi de thèse m'ont été très utiles pour pouvoir présenter ce travail de thèse. J'espère avoir le plaisir de travailler avec vous dans l'avenir sur d'autres projets concernant les rhumatismes inflammatoires chroniques.

Mes sincères remerciements au **Professeur Bernard Cortet** qui a accepté d'être membre de mon jury de thèse d'Université après avoir fait partie de mon jury de thèse d'exercice. Je loue à nouveau votre bienveillance à mon égard, votre compagnonnage depuis mon internat et votre aide dans mon parcours de clinicien, de chercheur et d'enseignement. J'ai et aurai toujours plaisir de travailler avec vous.

Je remercie bien sûr mes encadrants : le **Professeur Julien Paccou** et le **Docteur Aline Clabaut**. Merci, **Julien**, de m'avoir encadré dans cette thèse d'Université, une étape importante dans mon parcours hospitalo-universitaire qui, je l'espère, aboutira au professorat. Merci pour tes conseils notamment pour la gestion d'une étude clinique et tes conseils pour la rédaction de ce manuscrit. Merci **Aline** d'avoir accepté l'encadrement d'un médecin, pas toujours à l'aise avec les techniques du fondamental et qui a commis beaucoup d'erreurs. Merci pour ton aide dans la rédaction de l'article. Un très grand merci pour la qualité de ta relecture de mon manuscrit et de ton aide dans sa rédaction. Je tiens à vous remercier sincèrement tous les deux pour votre soutien et votre compréhension lors des événements survenus à la fin de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie les membres du laboratoire d'accueil **MABLab**. Pour sa partie boulonnaise, le **Professeur Christophe Chauveau**, directeur du laboratoire. Je te remercie pour ta gentillesse, ta bienveillance, ta qualité d'écoute, tes conseils. J'ai apprécié nos discussions sur de nombreux sujets, notamment les statistiques. Merci de m'avoir fait découvrir le Calais. Je remercie le **Docteur Odile Broux** pour son aide précieuse et son aide méthodologique pour la partie fondamentale ; **Sévérine Delplace** pour son aide et sa bienveillance pour la culture in vitro et les tests biochimiques ainsi que nos conversations variées dans notre bureau ; le **Docteur Stéphanie Lucas** pour sa connaissance pointue sur les techniques utilisées au laboratoire, sa rigueur scientifique et sa disponibilité ; le Docteur **Hamanou Benachour** pour sa gentillesse et sa disponibilité ; **Véronique Gauthier** pour nos discussions très amicales ; Flore Miellot pour sa bonne humeur ; le **Docteur Damien Leterme** pour nos échanges et la participation au projet « LA Plante ».

Je remercie également le **Docteur Olfa Ghali** pour son aide sur le western blot et sa gentillesse ; le **Professeur Pierre Hardouin** pour sa bienveillance et nos discussions depuis mon master 2 ; **Céline Grare** qui a fait partie du laboratoire et qui m'a aidé grandement pour acquérir les techniques de Western blot en passant plusieurs jours dans son laboratoire lillois. J'ai une pensée à mes co-doctorants pour les moments partagés : **Laura, Amélie, Viktorija et Federica**. Mention toute particulière à Laura qui a débuté sa thèse en même temps que moi. Merci pour ton amitié, nos échanges et ton soutien.

Je n'oublie pas la partie lilloise. Je remercie le **Docteur Sammy Badr** pour sa gentillesse, sa grande disponibilité, notamment pour me donner les PDF dans la dernière ligne droite et son amitié ; aux Docteurs **Guillaume Falgayrac, Cécile Olejnik et Xavier Coutel** pour leur gentillesse, leur bonne humeur et leur disponibilité lors de chacun de nos échanges. Je remercie **Anne Galet** pour son aide logistique, notamment pour l'impression des posters et de ce manuscrit de thèse. Je remercie également les autres membres du laboratoire pour nos échanges toujours sympathiques.

Je remercie les membres du laboratoire BPA qui partageaient le couloir avec le MABLab ; notamment le **Docteur Philippe Lencel** pour nos discussions très amicales, le **Docteur Jérôme Cleach** pour nos échanges sur la vie de doctorant, le Docteur **Irina Sadovskaya** pour sa gentillesse et nos échanges sur la culture russe.

Je remercie le service de rhumatologie du CHU de Lille ; le **Professeur René-Marc Flipo**, mon mentor dans mon parcours universitaire, pour son aide et ses conseils dans la rédaction et la réalisation des études TOFAT et RAFAT, le **Docteur Peggy Philippe** pour son aide dans le recrutement des patients et sa bienveillance.

Je remercie mon CCA-bro le **Docteur Adrien Tonione** pour son soutien et son aide pendant ces deux années passées de clinicat ; au **Docteur Mathilde Delacour** pour son écoute ; aux **Docteurs Cécile Philippoteaux, Martin Delclaux, Anne Desvages, Aurore Nottez** et **Anne Marty-Ané** pour leur aide et leur soutien, notamment dans les derniers instants mouvementés de la rédaction de ce manuscrit ; les personnels de l'URA pour leur aide logistique pour accueillir les patients ; le département de recherche clinique du service pour son aide très précieuse, leur bonne humeur et leur disponibilité (**Fatiha Amrane, Géraldine Meulin, Geneviève Denève**), **Morgane Coget** pour son aide sur l'utilisation de la DXA, **Audrey Caby** pour la programmation des DMO et **Jessica Levecque** pour la programmation des IRM.

Je remercie le département de méthodologie et de biostatistiques pour son aide et ses conseils pour la conception des études RAFAT et TOFAT, en particulier **Julien Labreuche** et le **Professeur Alain Duhamel** ; le département de Recherche et de l'Innovation du CHU de Lille notamment **Sara Frade, Hervé Toucourou** et **Céline Boens** ; le Centre d'Investigation Clinique du CHU de Lille notamment **Stéphane Dequand** et le **Docteur Marie-Claire Migaud** pour l'inclusion des témoins ; les patients et les témoins ayant participé à TOFAT et RAFAT.

Je suis reconnaissant au **Professeur Bruno Falissard** pour son MOOC *Introduction à R* et au **Docteur Gaël Millot** pour son livre *Comprendre et réaliser les tests statistiques à l'aide de R* qui m'ont grandement aidé à mieux maîtriser les statistiques.

Je remercie le **laboratoire Pfizer** de nous avoir fourni le tofacitinib pour les expériences *in vitro* et d'avoir financé les études TOFAT et RAFAT via leur « *unrestricted* » bourse ASPIRE ; la **fondation I-SITE** et la **Société Française de Rhumatologie** pour leur financement de cette thèse d'Université.

Je remercie bien évidemment mes amis pour leur soutien : **Abderrahmane** pour nos discussions toujours enrichissantes, **la famille Douay-Bodet** pour leur joie de vivre, **Souad** pour m'avoir permis de m'évader vers les magnifiques contrées de la Nouvelle-Calédonie lors d'un interlude pendant cette thèse d'Université, **Pierre-Luc** pour nos conversations toujours passionnantes, son aide précieuse pour les techniques de PCR et de Western Blot, enfin à mon grand ami **Sébastien** qui a été un soutien sans faille dans les moments difficiles.

Je remercie bien sûr ma famille, notamment **Jacqueline, Joël, Christophe, Claire, Linette**, mais aussi **Frédéric** et **Anne** avec lesquels j'ai pu échanger longuement sur ma thèse et mon parcours universitaire. J'ai une pensée émue pour mon oncle **Jacques** qui nous a quittés en mon début de thèse ainsi que pour ma cousine **Jacqueline**.

Enfin, je suis reconnaissant à **mes parents** ; à **mon père**, homme de grand savoir, honnête, drôle, gentil auprès duquel j'apprends tous les jours, sur des sujets tellement variés de la philosophie à la géographie ; à **ma mère**, une battante qui me l'a encore montré très récemment, altruiste, d'un soutien et d'un amour sans limites. Je vous remercie pour vos relectures d'une qualité extraordinaire. Recevez ce manuscrit comme gage de ma gratitude à votre égard. Vos parcours de vie sont des exemples pour tous. Je remercie **ma sœur** pour son aide notamment sur l'anglais et son soutien, à laquelle je souhaite le meilleur pour l'avenir.

Table des matières

Liste des abréviations	2
Liste des figures	5
Introduction	6
I. La Polyarthrite rhumatoïde (PR).....	6
a. Prévalence globale.....	6
b. Mortalité.....	6
c. Physiopathologie.....	8
d. Présentation clinique.....	11
e. Traitements.....	12
II. Ostéoporose secondaire associée à la PR.....	20
a. Physiologie osseuse.....	20
b. Microenvironnement osseux normal.....	22
c. Épidémiologie.....	34
d. Facteurs influençant le microenvironnement osseux dans la PR.....	39
e. Influence des traitements de la PR sur l'ostéoporose.....	41
f. Tofacitinib et os.....	43
III. La sarcopénie et les modifications de la composition corporelle dans la PR.....	48
a. Pourquoi s'intéresser à la composition corporelle dans la PR ?.....	48
b. Mesures de la composition corporelle dans la PR.....	49
c. Sarcopénie.....	53
Objectifs de la thèse	57
Méthodes	58
I. Expériences de culture cellulaire.....	58
a. Culture cellulaire et traitements.....	58
b. Tests de la viabilité cellulaire.....	61
c. Mesure de la densité des Ad med, de la surface des Ad med et de leurs gouttelettes lipidiques.....	61
d. Mesure de l'expression d'ARNm.....	62
e. Dosage et quantification des protéines par Western Blot.....	63
f. Analyses statistiques.....	65
II. Recherche clinique.....	66
a. Schéma des études et patients.....	66
b. Aspects éthiques et réglementaires.....	67
c. Évaluation clinique.....	67
d. Mesures de la DMO et de la composition corporelle par DXA.....	68
e. Mesures des paramètres biologiques.....	68
f. Mesures de l'adiposité médullaire par IRM.....	69
g. Analyses statistiques.....	72
Résultats et Discussion	73
I. Évaluation de l'effet du tofacitinib sur les tissus osseux et adipeux dans la PR.....	73
a. Résultats.....	73
b. Discussion.....	83
II. Effet du Tofa sur l'adiposité médullaire, la densité minérale osseuse et la composition corporelle.....	87
a. Résultats.....	87
b. Discussion.....	93
III. Comparaison des paramètres osseux et de la composition corporelle dans l'étude RAFAT.....	97
a. Résultats.....	97
b. Discussion.....	103
Conclusion et Perspectives	106
Références bibliographiques	110
Annexes	138

Liste des abréviations

ACPA	Anticorps anti-protéines citrullinées
Ad med	Adipocytes médullaires
ALM	Masse maigre appendiculaire
ALMI	Indice de masse maigre appendiculaire
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i>
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
BIA	Analyse d'impédance bioélectrique
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSP	<i>Bone sialoprotein</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
CHOP-10	<i>C/EBP homologous protein</i>
COL1A1	<i>Collagen type 1 alpha 1 chain</i>
CREB	<i>cAMP-responsive element-binding</i>
CRP	Protéine C réactive
csDMARDs	<i>conventional synthetic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs</i>
CSMs	Cellules stromales issues de la moelle osseuse
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
CTX	C-terminaux du collagène de type I
DAS 28	<i>Disease Activity Score</i>
DKK-1	<i>Dickkopf protein-1</i>
Dlx5	<i>Distal-less homeobox 5 gene</i>
DMO	Densitométrie osseuse
DXA	Absorptiométrie biphotonique à rayons X
EGR2	<i>Early growth response 2</i>
ET	Ecart-type
ETM	Erreur type de la moyenne
EWGSOP	Groupe de travail européen sur la sarcopénie chez les personnes âgées
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment cristallisable
FFM	<i>Fat Free Mass</i>
FFMI	Indice de FFM
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FM	Masse grasse totale
FMI	Indice de masse grasse
FR	<i>Rheumatoid Factor</i>
FRAX®	<i>Fracture Risk Assessment Tool</i>
GM-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages
HAQ	<i>Health Assessment Questionnaire</i>
hCSMs	Cellules stromales humaines issues de la moelle osseuse
Hh	<i>Hedgehog</i>
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen-D-Related</i>
HR	Hazard Ratio
HRR	Hazard Rate Ratio
IC	Intervalle de confiance

IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
IPAQ-SF	<i>International Physical Activity Questionnaire-Short Form</i>
ISCD	<i>International Society for Clinical Densitometry</i>
JAK	Janus kinases
JAKi	Inhibiteurs de Janus kinases
JH	<i>Janus Homology</i>
KLF4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
MCE	Expansion clonale mitotique
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
Mest	<i>Mesoderm specific transcript</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i>
NF-κB	Facteur de transcription nucléaire κB
Ob	Ostéoblastes
OC	Ostéocalcine
ONN	<i>Osteonectin</i>
OPN	<i>Osteopontin</i>
OR	<i>Odss Ratio</i>
OSX	<i>Osterix</i>
P1NP	Propeptide N-Terminal du procollagène de type I
PBF	Pourcentage de graisse corporelle
PDFF	<i>Proton Density Fat Fraction</i>
Peg1	<i>Paternally expressed gene 1</i>
PIAS	<i>Protein inhibitors of activated STAT</i>
PKA	Protéine kinase A
PLIN1	Pénilipine 1
PPAR_γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i>
PPIA	Peptidylprolyl isomérase A
PR	Polyarthrite rhumatoïde
Pref-1	<i>Preadipocyte factor-1</i>
PTH	<i>Parathyroid hormone</i>
PTP	<i>Protein tyrosine phosphatase</i>
RA	<i>Rheumatoid Arthritis</i>
RANK	Récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B
RANKL	Ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B
RNAPol2	ARN polymérase II
RR	Risque relatif
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SATB2	<i>Special AT-rich sequence-binding protein 2</i>
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
SMI	Indice de muscle squelettique
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
SPPB	<i>Short Physical Performance Battery</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TBM	Masse corporelle totale
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLM	Masse maigre totale
TNFα	<i>Tumour Necrosis Factor alpha</i>
Tofa	Tofacitinib
tsDMARDs	<i>Targeted synthetic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs</i>

UCP-1	Protéine mitochondriale découplante de type 1
VAT	<i>Visceral Adipose Tissue</i>
VS	Vitesse de sédimentation
Wnt	<i>Wingless integration site</i>
Ywhaz	Protéine d'activation de la tyrosine 3- monooxygénase/tryptophane 5-monooxygénase

Liste des figures

Figure 1 :	Développement de la polyarthrite rhumatoïde.....	9
Figure 2 :	Voie de signalisation JAK-STAT.....	17
Figure 3 :	Les superfamilles des récepteurs aux cytokines	19
Figure 4 :	Représentation schématique de la différenciation ostéoblastique....	23
Figure 5 :	Évolution de la composition médullaire au cours de la croissance et du vieillissement.....	28
Figure 6 :	Représentation schématique de la différenciation adipocytaire.....	30
Figure 7 :	Définitions de la sarcopénie.....	56
Figure 8 :	Schéma général des expériences de l'étude <i>in vitro</i>	60
Figure 9 :	Contourage de l'adiposité médullaire en IRM.....	71
Figure 10 :	Effet du tofacitinib et du TNF α sur la viabilité cellulaire des hCSMs	74
Figure 11 :	Effets du Tofa sur la différenciation adipocytaire et ostéoblastique en condition non inflammatoire.....	76
Figure 12 :	Effet du Tofa sur la différenciation ostéoblastique et adipocytaire en condition inflammatoire.....	78
Figure 13 :	Effet du Tofa sur des Ad med matures en condition inflammatoire	80
Figure 14 :	Analyse du profil de pSTAT3 chez les Ad med.....	82
Figure 15 :	Variations de l'adiposité médullaire après 6 mois de Tofa.....	92

Introduction

I. La Polyarthrite rhumatoïde (PR)

a. Prévalence globale

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune à tropisme articulaire caractérisée par la production d'anticorps dirigés contre les immunoglobulines G (IgG), c'est-à-dire le facteur rhumatoïde, et les protéines citrullinées (les anticorps anti-protéines citrullinées sont appelés ACPA) [1]. C'est le rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent. La prévalence varie selon le lieu géographique. L'étude française la plus récente retrouve une prévalence de 0,47 % pour l'année 2019 [2]. En Amérique du Nord et en Europe du Nord, dans les populations caucasiennes où elle a été le plus étudiée, elle varie entre 0,5 à 1,1 % [3,4]. En Europe du Sud, elle est plus faible entre 0,3 et 0,7 % [5,6]. En Asie, elle est estimée entre 0,28 et 0,75 % [7–9]. En Afrique, elle varie entre 0,13 et 0,6 % [10]. La prévalence la plus élevée de 5-6 % est retrouvée dans les populations amérindiennes [11].

b. Mortalité

Les maladies cardiovasculaires restent la cause la plus fréquente de mortalité prématurée chez les patients atteints de PR. La prévalence de l'hypertension, du diabète de type 2, de la dyslipidémie et de l'obésité est importante, respectivement de 18,6 % ; 6 %, 9,9 % et 4,4 % [12]. La cohorte prospective sur 36 ans (de 1976 à 2012) des infirmières américaines (de la *Nurse Health Study*) observait une augmentation de la mortalité totale chez les femmes atteintes de PR par rapport à celles indemnes de PR (Hazard Ratio [HR]= 1,40 ; Intervalle de Confiance [IC] 95 % 1,25–1,57), mais aussi de la mortalité liée aux maladies cardiovasculaires (HR = 1,45 ; IC 95 % 1,14– 1,83).

Dans une étude norvégienne comparant 387 patients atteints de PR à 63 903 contrôles sains, la mortalité ajustée sur le sexe, l'hypertension artérielle, le statut tabagique, l'IMC, la créatinine, le cholestérol total et les antécédents cardiovasculaires était plus élevée chez les patients atteints de PR (HR=1,24 ; IC 95 % 1,03-1,44) [13]. La mortalité liée aux atteintes respiratoires de la PR notamment la pneumopathie interstitielle diffuse chez les femmes atteintes de PR séropositive était trois fois plus élevée que chez les femmes sans PR (HR 2,67 ; IC 95 % 1,89-3,77) dans la cohorte prospective des infirmières américaines [14]. Dans une étude de cohorte nationale danoise, la présence d'une pneumopathie interstitielle diffuse était associée à une mortalité plus importante par rapport aux patients atteints de PR sans pneumopathie interstitielle diffuse (Hazard Rate Ratio [HRR] ajusté pour une durée de suivi entre 5 et 10 ans à 2,7 ; IC95 % 1,9-3,9) [15]. Dans l'étude épidémiologique française la plus récente sur la PR, le taux brut de mortalité annuel était de 3,1 %, stable entre 2010 et 2019. Il existait une surmortalité par rapport à la population générale, liée aux maladies cardiovasculaires (HR=1,40 ; IC95 % 1,36-1,43) et aux atteintes respiratoires de la PR (HR=1,80 ; IC95 % 1,73-1,87) [2].

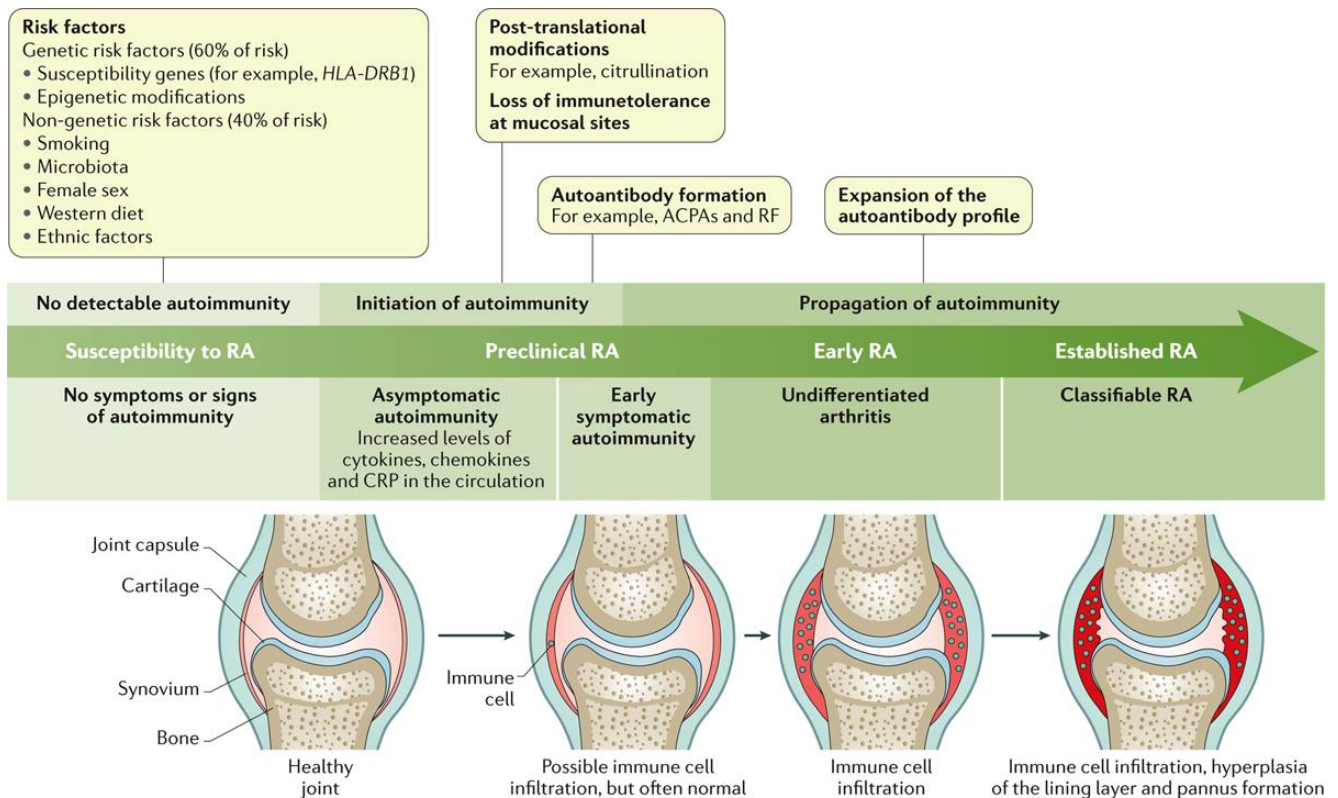
Cependant, certaines études notent une diminution de la mortalité par rapport à une population de témoins sains. Dans une étude britannique, la mortalité des patients atteints de PR était certes plus élevée par rapport à des témoins sains ajustés sur l'âge, le sexe et le médecin traitant, mais ce risque diminuait après 2006, respectivement (HR avant 2006 = 1,32 ; IC 95 % 1,26- 1,38), et (HR après 2006 =1,15 ; IC 95 % 1,03- 1,29)[16]. Une diminution de la mortalité de -10,3 % (IC 95 % -16,5 % ; -3,3 %) de 2004 à 2017 était aussi observée dans une étude rétrospective mexicaine [17].

c. Physiopathologie

i. PR préclinique

Chez la plupart des patients, la physiopathologie débute plusieurs années avant la symptomatologie clinique et même un accès aigu reflétant une perturbation immune brutale est possible. La PR est considérée comme un continuum entre un stade à haut risque, avec une rencontre entre un terrain génétique immunitaire susceptible et des facteurs environnementaux (cf. **Annexe I**). Elle évolue vers un stade préclinique avec des signes d'auto-immunité (augmentation sérique du niveau des cytokines, chimiokines et de la protéine C réactive [CRP], apparition d'ACPA) et enfin vers une forme clinique avec synovites (inflammation de la membrane synoviale) destructrices (**Figure 1**) [1].

L'action des facteurs environnementaux n'est pas encore bien comprise. Le stress induit notamment par la fumée de cigarette agit sur les cellules des muqueuses et favorise la modification post-traductionnelle appelée citrullination qui consiste en la transformation d'une arginine en citrulline par l'enzyme peptidylarginine désiminase, notamment dans des protéines intracellulaires comme les histones et les protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, le collagène, le fibrinogène, l'enolase ou la vimentine (**Figure Annexe IIa**) [18].



Nature Reviews | Disease Primers

Figure 1 : Développement de la polyarthrite rhumatoïde (D'après Smolen et al. 2018 [1]).

Des facteurs génétiques et environnementaux concourent au développement de la PR. ACPA : anti-citrullinated protein antibody. CRP : C-reactive protein. HLA-DR : Human Leukocyte Antigen-D-Related. RA : Rheumatoid Arthritis. RF : Rheumatoid Factors.

Le microbiote peut également participer à la citrullination. En effet, *Porphyromonas gingivalis* exprime des peptidylarginine désiminases, peut induire la citrullination et participer à l'apparition des ACPA [19]. De plus, König *et al.* ont démontré qu'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* produit des toxines perforantes appelées leucotoxines A qui peuvent induire une perméabilisation de la membrane plasmique des polynucléaires neutrophiles et un afflux non régulé à l'intérieur de ces cellules, entraînant une activation non régulée des enzymes citrullinant qui produisent des auto-antigènes citrullinés. Ces leucotoxines A pourraient modifier la forme des polynucléaires neutrophiles pour mimer des pièges extracellulaires, relarguant du contenu cellulaire hypercitrulliné [20].

ii. PR précoce et établie

La plupart des données suggèrent qu'il existe peu de différences entre la synoviale de PR précoces et celle de PR établies. Par exemple, le répertoire des ACPA s'enrichit avant les signes cliniques, mais reste stable lorsque la maladie est déclarée, ce qui va dans le sens d'un rôle pathogénique très précoce des ACPA [21]. Le rôle des macrophages et des fibroblastes dans le maintien de la synovite devient plus prééminent dans la PR établie. Les profils de méthylation de l'ADN dans les synoviocytes fibroblastiques isolés d'individus atteints d'une PR précoce étaient différents de ceux ayant une PR établie. Les différences de méthylation concernaient la différence cellulaire, l'adhésion et la prolifération [22].

d. Présentation clinique

La présentation classique d'une PR est un gonflement des articulations lié à la synovite. Les patients décrivent des douleurs inflammatoires avec une raideur matinale, des réveils nocturnes et une amélioration lors de la réalisation de mouvements. Les localisations classiques sont les articulations métacarpophalangiennes, métatarsophalangiennes, interphalangiennes proximales des mains et des pieds, les poignets, les coudes, les chevilles, les épaules, les genoux et les hanches [23]. Les articulations interphalangiennes distales et le rachis sont épargnés, mis à part l'articulation C1-C2. En effet, les articulations occipito-atloïdienne et atloïdo-odontoïdienne sont des vraies articulations synoviales[24]. D'un point de vue radiographique, des érosions des articulations sont observées, initialement marginales liées au fait que la membrane synoviale se reflète directement sur l'os, sans contact avec le cartilage, dans ces zones marginales. Par la suite, les érosions progressent et entraînent une dégradation du cartilage et un pincement articulaire complet [25]. L'évolution naturelle de la PR est l'apparition de déformations caractéristiques comme le doigt en boutonnière ou le doigt en col de cygne [26].

La PR est une maladie systémique. Il existe donc des manifestations extra-articulaires. Les principales sont l'atteinte pulmonaire avec la pneumopathie interstitielle diffuse, l'atteinte cutanée avec les nodules rhumatoïdes et l'atteinte des glandes avec le syndrome de Gougerot-Sjögren secondaire entraînant un syndrome sec. Les autres manifestations extra-articulaires sont actuellement beaucoup plus rares, comme les épisclérites pour les atteintes ophtalmologiques, les péricardites pour les atteintes cardiaques, ou la vascularite rhumatoïde pour les atteintes vasculaires [1].

e. Traitements

i. Corticothérapie

L'acétate de cortisone, un glucocorticoïde, fut utilisé, pour la première fois, par le Docteur Hench et ses collègues à la Mayo Clinic à Rochester, durant l'automne 1948, pour traiter un patient avec une PR active. L'effet fut spectaculaire et bien plus efficace que les traitements utilisés à l'époque [27]. Dès le début de son utilisation, les rhumatologues de la Mayo Clinic établirent qu'une faible dose était suffisante pour contrôler l'inflammation dans la PR et réduire les effets indésirables [28].

L'efficacité a été démontrée notamment par l'essai contrôlé randomisé de Kirwan *et al.* en 1995 où la prise de 7,5 mg/jour de prednisone était significativement supérieure par rapport au placebo pour le contrôle du nombre d'articulations douloureuses, du nombre d'articulations gonflées. Il y avait une prévention structurale pendant au moins deux ans [29].

L'utilisation d'une corticothérapie à faible posologie et pendant une courte période est proposée dans les recommandations européennes et françaises dans l'attente d'efficacité d'un traitement de fond synthétique conventionnel appelé également *conventional synthetic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs* (csDMARDs) [30,31].

ii. Traitements de fond synthétiques conventionnels

I. Méthotrexate

Le méthotrexate est un inhibiteur de la dihydrofolate réductase, enzyme impliquée dans le métabolisme des folates. Il inhibe la synthèse de novo des purines et des pyrimidines et donc des acides nucléiques. Ses actions sur le système immunitaire sont très vastes allant de l'augmentation du relargage d'adénosine qui se fixe alors aux récepteurs de surface cellulaire et inhibe de nombreux processus inflammatoires et immunitaires à l'inhibition du facteur de transcription nucléaire κB (NF- κB) [32].

Il est considéré comme la pierre angulaire du traitement de la PR dans les recommandations françaises et européennes et doit être instauré en première intention chez un patient naïf de traitement [30,31]. En effet, il permet la mise en rémission d'une proportion importante de patients (entre 25 et 40 %). En association avec une corticothérapie, le nombre de patients en activité faible de la PR ou en rémission peut monter jusqu'à 50 % en cas de PR précoce, un taux proche de celui des patients sous biothérapie [33].

iii. Léflunomide et sulfasalazine

En cas de contre-indication ou d'intolérance au méthotrexate, les deux csDMARDs recommandés sont le léflunomide et la sulfasalazine [30,31]. Le léflunomide est un inhibiteur de la dihydroorotate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale participant à la synthèse des pyrimidines, impliquée dans la réplication et la prolifération cellulaire, notamment des lymphocytes B et T [34].

La sulfasalazine a été développée dans la PR avec l'idée qu'un agent infectieux jouait un rôle dans la physiopathologie de cette maladie. La sulfasalazine est métabolisée en acide 5-aminosalicylique et en sulfapyridine dans l'intestin via l'action des bactéries. La sulfapyridine est le métabolite responsable des effets immunomodulateurs de la sulfasalazine [35].

iv. Biothérapies

I. Anti-TNF α

En cas d'échec ou d'échappement au méthotrexate, il est recommandé d'ajouter une biothérapie. Les anti-*Tumour Necrosis Factor alpha* (TNF α) sont la plus ancienne classe de biothérapies développées dans la PR [33]. Ils ont démontré leur efficacité dans le contrôle des symptômes de la maladie et dans la prévention de la progression structurale [36–40]. Il existe cinq molécules commercialisées. L'infliximab est un anticorps chimérique, l'étanercept une protéine de fusion comprenant le récepteur soluble 2 du TNF α et la portion Fragment cristallisable (Fc) d'IgG, l'adalimumab et le golimumab des anticorps entièrement humanisés, et le certolizumab un fragment *antigen binding* (Fab) pégylé [41].

II. Anti-IL-6

Actuellement, il existe deux anticorps monoclonaux entièrement humanisés dirigés contre le récepteur de l'interleukine 6 (IL-6) : le tocilizumab et le sarilumab. Les deux biothérapies ont démontré leur efficacité chez les patients naïfs de biothérapies, mais aussi ceux n'ayant pas répondu à un anti-TNF α [42,43]. L'essai contrôlé randomisé ACT-RAY a démontré la non-infériorité de la monothérapie par rapport à l'association tocilizumab et méthotrexate sur le contrôle des symptômes et de la prévention de la progression structurale [44], ce qui explique son autorisation de mise sur le marché en monothérapie.

III. Abatacept

L'abatacept est une protéine de fusion associant la portion Fc d'une IgG et le domaine extracellulaire de *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA4). Le CTLA4 a une grande affinité pour les corécepteurs CD80 et CD86 de la cellule présentatrice de l'antigène et inhibe l'activation des lymphocytes T CD4 [43]. L'essai contrôlé randomisé AMPLE a démontré la non-infériorité de l'abatacept vis-à-vis de l'adalimumab [45].

IV. Rituximab

Le rituximab est un anticorps chimérique anti-CD20 ciblant les lymphocytes B, ce qui entraîne leur déplétion par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, cytotoxicité dépendante du complément, ainsi que la promotion de l'apoptose des lymphocytes B CD20 positifs [46–48]. Son efficacité a été démontrée contre placebo dans un essai contrôlé randomisé [49]. La présence d'une séropositivité pour les ACPA ou les facteurs rhumatoïdes est un facteur prédictif de réponse à ce traitement [50].

v. Inhibiteurs de Janus Kinases

I. Voie de signalisation JAK-STAT

Les inhibiteurs de Janus kinases (JAKi) font partie des DMARDs synthétiques ciblés (tsDMARDs). Ils ciblent la voie de signalisation Janus Kinase (JAK)- *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) qui est quasi ubiquitaire et régule de nombreux processus nécessaires pour l'homéostasie et le développement chez les mammifères, comme l'hématopoïèse, l'inflammation, la réparation cellulaire, l'adipogenèse, l'ostéoblastogénèse ou l'apoptose [51].

Cette voie de signalisation débute par la liaison d'une cytokine à un récepteur transmembranaire qui se dimérise permettant la formation d'un couple de JAK qui s'autophosphoryle et phosphoryle par la suite le récepteur. Les résidus tyrosine sur le domaine catalytique du récepteur sont phosphorylés et servent de point d'ancrage pour les STAT phosphorylés à leur tour. Ils sont activés et forment un dimère qui est transféré dans le noyau pour réguler l'expression de gènes en se liant à des sites spécifiques sur l'ADN [52] (**Figure 2**).

La voie JAK-STAT est composée de trois éléments : le récepteur associé à une tyrosine kinase, JAK et STAT. De nombreuses cytokines et facteurs de croissance utilisent cette voie de signalisation comme les interleukines, l'hormone de croissance ou les interférons. Les récepteurs associés à une tyrosine kinase sont les récepteurs sur la membrane cellulaire pour les cytokines et les facteurs de croissance. Leurs points communs sont l'absence d'activité de kinase et la présence d'un site de liaison dans leur domaine intracellulaire pour les JAK2.

La famille des JAK est un groupe de tyrosine kinases non transmembranaire. Cette famille a été découverte en 1990 [53,54]. L'acronyme JAK signifiait initialement « *Just another kinase* » (juste une autre kinase) pour mettre en valeur le fait que cette famille avait été découverte en même temps que de nombreuses kinases via la PCR. Par la suite, elles ont été nommées Janus Kinase en relation avec le dieu romain Janus aux deux visages. Les JAK ont deux domaines quasi identiques : un domaine catalytique tyrosine kinase (*Janus Homology* [JH] 1) et un domaine pseudokinase (JH2). JH1 est un domaine tyrosine kinase actif alors que JH2 n'a pas d'action de kinase, mais a plus une action régulatrice [55].

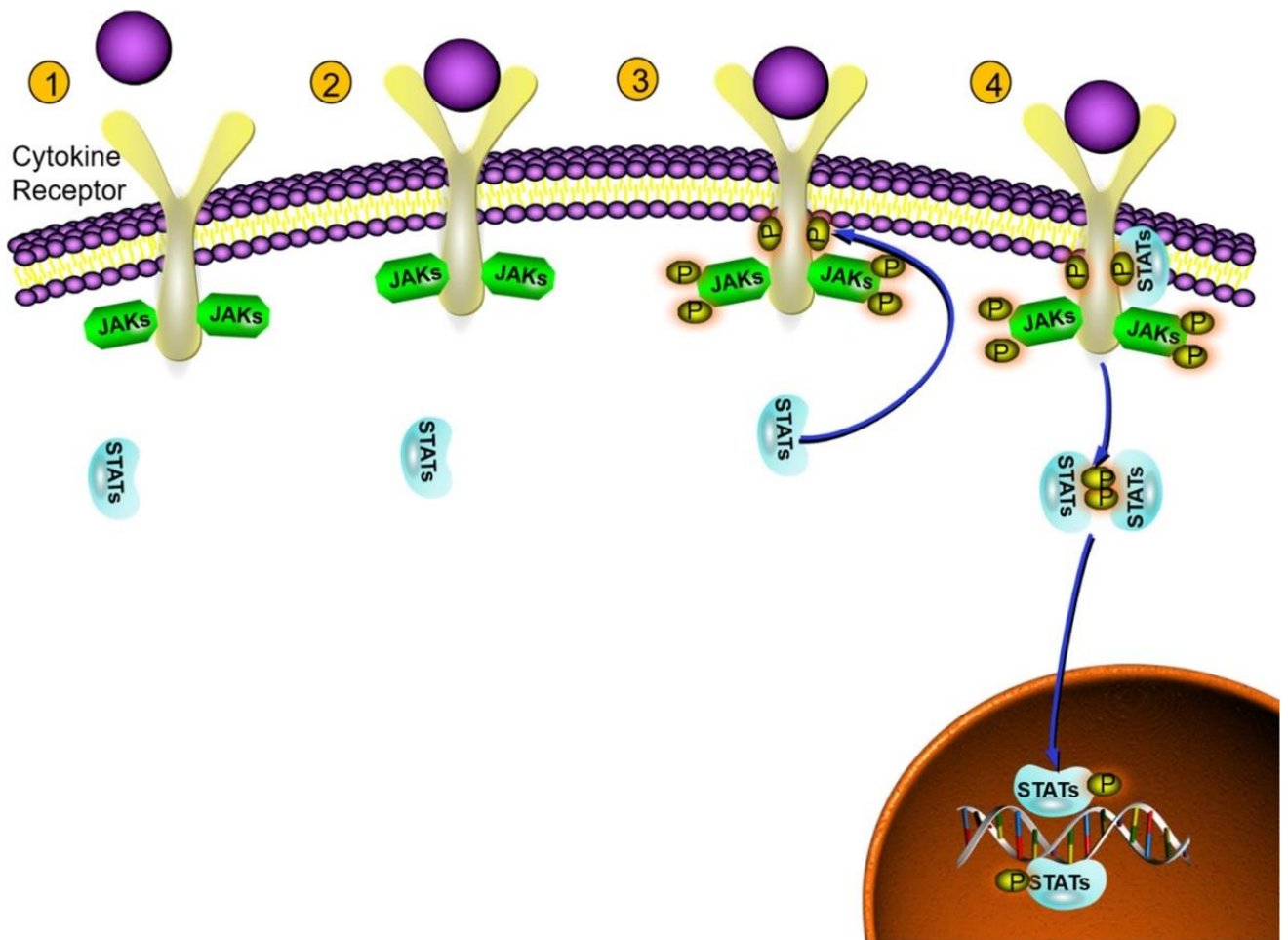


Figure 2 : Voie de signalisation JAK-STAT (D'après Xin et al. 2020 [52])

La voie JAK-STAT fonctionne en 4 étapes. (1) Les cytokines se lient à leurs récepteurs, amenant à la dimérisation du récepteur et les JAK s'activent, s'autophosphorylent et phosphorylent la partie intracellulaire du récepteur. (2) Les protéines STAT sont recrutées au point d'ancrage formé par les sites tyrosine phosphorylés. (3) Les STAT sont phosphorylées et activées, ce qui permet leur dimérisation. (4) Le dimère STAT est transloqué dans le noyau et régule l'expression des gènes.

Les JAK phosphorylent à la fois les récepteurs transmembranaires et de nombreuses molécules intracellulaires avec le domaine d'homologie spécifique à Src (SH2). La famille JAK a quatre membres : JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2 [56].

La famille des STAT dans le cytoplasme est la cible des JAK. Elle est composée de STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6. Chaque STAT a un domaine SH2 permettant son activation par les JAK [57]. Il existe des facteurs régulateurs négatifs de cette voie de signalisation : *Suppressor of cytokine signaling* (SOCS), *Protein inhibitors of activated STAT* (PIAS), et *Protein tyrosine phosphatase* (PTP) [52]. Il est important de noter qu'il n'y a aucun système de secours pour cette voie de signalisation (**Figure 3**).

II. Le Tofacinib

Le tofacitinib (Tofa) est le premier JAKi développé dans la PR [58] et la molécule d'intérêt de cette thèse d'Université. Les différentes étapes du processus industriel sont décrites en **Annexe III**. Les autres JAKi actuellement commercialisés dans la PR ont suivi un développement similaire.

Le Tofa inhibe principalement JAK1 et JAK3. En effet, la région où se lie le Tofa ne présente que quatre différences subtiles dans les séquences d'acides aminés entre les différents membres de la famille des JAK, d'où la complexité d'obtenir des molécules sélectives d'une seule JAK. Les autres inhibiteurs des JAK actuellement commercialisés dans la PR sont le baricitinib [59] ciblant JAK1 et JAK2, le filgotinib [60] et l'upadacitinib [61] ciblant JAK1.

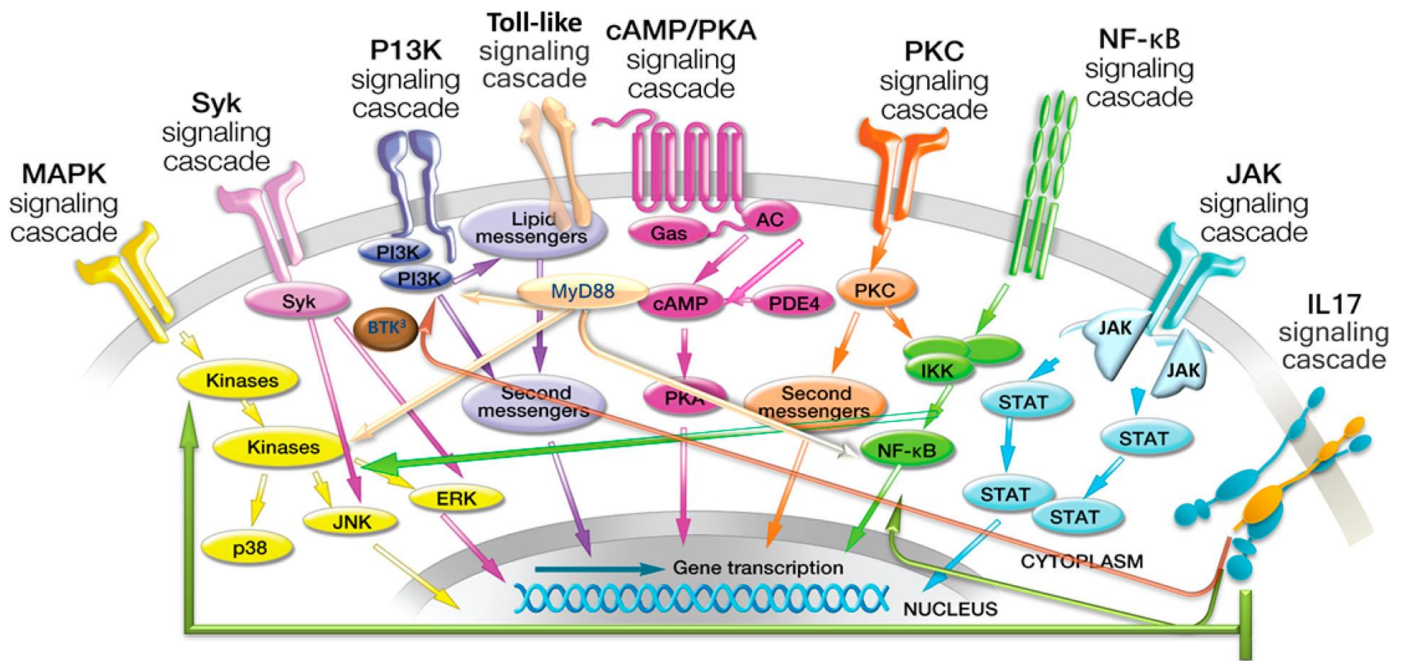


Figure 3 : Les superfamilles des récepteurs aux cytokines

(D'après Clark *et al.* 2014 [62])

La nature complexe des voies de signalisation entraîne une redondance dans certains cas. Ce n'est pas le cas pour la voie JAK/STAT.

Cette classe thérapeutique a été réévaluée par l'Agence européenne des médicaments suite aux résultats de l'essai de phase IV ORAL Surveillance où il était décrit un surrisque néoplasique sous Tofa par rapport aux anti-TNF α chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde âgés de 50 ans ou plus et ayant au moins un facteur de risque cardiovasculaire [63]. L'Agence européenne des médicaments recommande l'utilisation des JAKi seulement en cas d'impossibilité d'alternative thérapeutique chez les patients âgés de 65 ans ou plus, à haut risque cardiovasculaire, fumeurs ou ayant fumé pendant une longue période et ceux à risque de cancer. La posologie devrait être réduite chez ces patients [64].

II. Ostéoporose secondaire associée à la PR

a. Physiologie osseuse

L'ostéoporose, pathologie caractérisée par un dérèglement du remodelage osseux conduisant à une perte de quantité et/ou de la qualité osseuse [65], est une complication de la PR pouvant entraîner des fractures et une surmortalité [66]. Il est donc nécessaire de décrire la physiologie osseuse avant d'évoquer les modifications osseuses liées à la PR.

L'os est un tissu porteur, qui favorise la locomotion, protège les tissus mous et est également connu comme un réservoir de calcium et de phosphate [67,68]. Les os sont composés d'une part, d'une matrice organique appelée tissu colloïde, constituée en grande partie de collagène de type I (90 %), le reste des protéines comprenant l'ostéocalcine, l'ostéonectine, l'ostéopontine, la fibronectine et la thrombospondine-2 [69], et d'autre part, d'une matrice minérale inorganique, composée principalement d'hydroxyapatite, mais aussi de petites quantités de sels de potassium, de magnésium, de sodium, de strontium et de calcium [70].

La formation de la matrice osseuse est initiée par l'assemblage du collagène suivi du dépôt d'hydroxyapatite avec une participation des protéines non collagéniques dans la régulation de la minéralisation [71,72]. L'équilibre de la teneur en minéraux est important et directement lié à la résistance mécanique [73]. Ce tissu minéralisé est l'objet d'un remodelage constant pour maintenir son intégrité et est étroitement régulé par un équilibre précis de la formation et de la résorption osseuse sous le contrôle de facteurs locaux et systémiques, tels que les cytokines, les hormones et la stimulation mécanique [68]. Ce processus complexe est un cycle de résorption osseuse localisée pour éliminer l'os ancien ou endommagé, suivi d'une phase plus longue de formation osseuse, tous deux en équilibre pour maintenir un os sain [65].

L'os est un tissu rigide et porteur, conçu pour supporter des charges mécaniques élevées pendant l'exercice [74]. Il existe deux types de tissus osseux, l'os cortical et l'os trabéculaire, qui possèdent les mêmes cellules et la même matrice, mais qui diffèrent par leurs rôles structuraux et fonctionnels [75]. Les os corticaux sont plus calcifiés et durs, ils assurent le rôle de stabilité mécanique et forment une couche protectrice pour la cavité interne [76]. En comparaison, les os trabéculaires ne contiennent qu'un tiers d'os calcifié par rapport aux os corticaux et sont principalement impliqués dans les fonctions métaboliques et biomécaniques [75].

b. Microenvironnement osseux normal

Qu'en est-il d'un point de vue plus microscopique ? Dans cette partie, nous décrivons les modifications du microenvironnement osseux liées à la PR. Dans un premier temps, il est nécessaire de décrire le microenvironnement osseux normal. Le microenvironnement osseux est constitué de quatre principaux types cellulaires : les ostéoblastes (Ob), les ostéoclastes, les ostéocytes et les adipocytes médullaires (Ad med).

i. Ostéoblastes

Les Ob sont les cellules ostéoformatrices. Ce sont de petites cellules mononuclées issues de la différenciation des cellules souches squelettiques qui font partie d'une population hétérogène de cellules non hématopoïétiques appelées cellules stromales issues de la moelle osseuse (CSMs) [77]. Les Ob sont habituellement cuboïdes, mais peuvent être également ronds, aplatis ou cylindriques [78]. La différenciation ostéoblastique ou ostéoblastogenèse se déroule en cinq étapes principales : l'engagement dans la voie de différenciation ostéoblastique, la prolifération, la production et la maturation de la matrice extracellulaire et enfin la minéralisation (**Figure 4**) [78].

L'engagement des cellules souches squelettiques dans l'ostéoblastogenèse est principalement contrôlé par le facteur de transcription *Runt-related transcription factor 2* (Runx2). Il permet l'expression de marqueurs d'ostéoblastogenèse, tels que les phosphatases alcalines, l'ostéocalcine, l'ostéopontine, l'ostéonectine, la sialoprotéine osseuse et le collagène de type I [79–82]. Les souris déficientes en Runx2 présentent des défauts dans la formation osseuse endochondrale et intramembranaire [83,84].

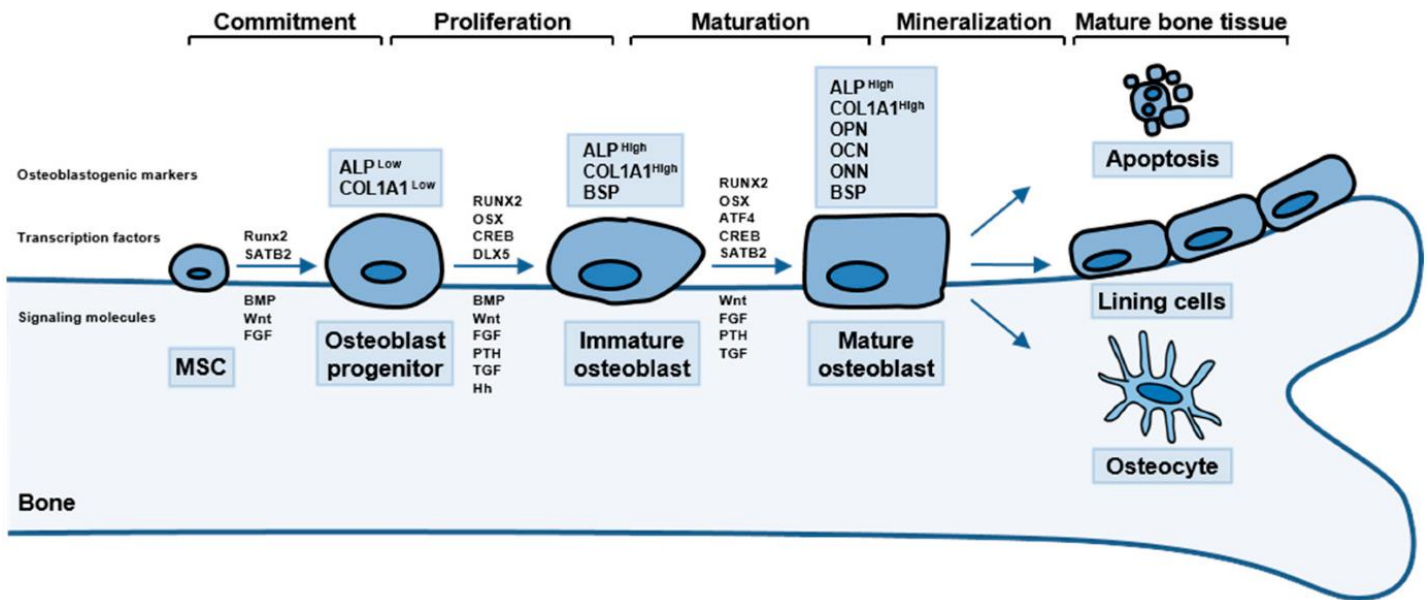


Figure 4 : Représentation schématique de la différenciation

ostéoblastique (D'après Amarasekara *et al.* 2021 [78])

ALP: Alkaline phosphatase. ATF4: Activating transcription factor 4. BMP: Bone morphogenetic protein. BSP: Bone sialoprotein. COL1A1: Collagen type 1 alpha 1 chain. CREB: cAMP-responsive element-binding. DLX5: Distal-less homeobox 5 gene. FGF: Fibroblast growth factor. Hh: Hedgehog. MSC: mesenchymal stem cell. OCN: osteocalcin. ONN: osteonectin. OPN: osteopontin. OSX: osterix. Runx2: Runt-related transcription factor 2. PTH: Parathyroid hormone. SATB2: Special AT-rich sequence-binding protein 2. TGF: Transforming growth factor.

Le niveau d'expression de Runx2 est maximal au stade de l'Ob immature et diminue au stade de la maturation [83,84]. Il est notamment régulé par *Distal-less homeobox 5 gene* (Dlx5) [79,85]. Après leur engagement dans l'ostéoblastogenèse, les pré-Ob prolifèrent et expriment des ARN messagers du collagène de type I, de la fibronectine, de l'ostéopontine et le récepteur du facteur de croissance et de transformation β (TGF- β). Puis, les Ob au stade immature cessent de proliférer et se différencient en Ob matures. Ils sécrètent alors du collagène de type I, constituant principal de la matrice extracellulaire, et expriment des phosphatases alcalines afin de maturer la matrice extracellulaire [86–88].

Une fois la maturation de la matrice achevée, la minéralisation de la matrice extracellulaire se produit selon un processus hautement ordonné via l'expression de divers marqueurs de l'ostéoblastogenèse, tels que l'ostéopontine, l'ostéocalcine et la sialoprotéine osseuse. En parallèle, il existe une expression continue de phosphatases alcalines et de collagène de type I [77,86]. L'ostéocalcine régule le métabolisme du calcium et favorise le dépôt de minéral dans la matrice extracellulaire, tandis que l'ostéopontine promeut la formation et la minéralisation osseuses. La sialoprotéine osseuse participe à la minéralisation osseuse en régulant la formation de cristaux d'hydroxyapatite [70]. Enfin, l'évolution des Ob matures consiste en trois possibilités : l'apoptose, la transformation en cellules bordantes ou l'incorporation progressive dans la matrice osseuse afin de devenir des ostéocytes [78].

ii. Ostéocytes

Les ostéocytes sont les cellules osseuses les plus abondantes (environ 95 %), qui résident dans la matrice osseuse [89]. Ils sont individuellement encastrés dans de petites chambres appelées lacunes [90]. Ils possèdent des processus cellulaires dendritiques uniques. Ces processus cellulaires dendritiques créent un vaste réseau cellulaire dans la matrice osseuse, qui permet aux ostéocytes de communiquer avec les ostéocytes voisins, ainsi qu'avec les Ob et les ostéoclastes à la surface de l'os, en créant un réseau de type neuronal [91]. Ce réseau de communication très complexe est créé à travers un espace appelé canalicules, qui correspond à des canaux étroits dans la matrice d'hydroxyapatite. Sur la base des mesures et des modèles mathématiques de ramification, on a estimé que ces processus dendritiques forment environ 23 milliards de connexions et s'étendent sur une longueur totale de plus de 175 000 km dans le corps humain [92].

Le développement initial des processus cellulaires dendritiques à partir du corps cellulaire conduit à la formation de sous-branches ultérieures qui créent une surface suffisante pour une communication efficace avec les autres cellules et servent également de structures mécanosensorielles. L'environnement unique des ostéocytes est appelé le réseau lacunocanaliculaire et est un réseau complexe à l'intérieur du tissu osseux avec une surface totale d'environ 215 m² [93,94] qui fournit une voie pour l'apport de nutriments, d'oxygène et de signaux biochimiques [95].

Comme les ostéocytes sont intégrés individuellement dans l'os et séparés des cellules osseuses effectrices, ils utilisent des molécules de signalisation sécrétées pour communiquer leurs « instructions » en plus de leurs effets systémiques plus larges[96,97]. Les ostéocytes sont impliqués dans la sécrétion de molécules de signalisation, pour réguler les activités des Ob et des ostéoclastes, ainsi que dans l'établissement de connexions physiques directes via les jonctions lacunaires.

iii. Ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les cellules qui résorbent l'os. Un ostéoclaste activé est caractérisé par une réorganisation du cytosquelette, la formation de zones d'attachement et une membrane cellulaire spécialisée, appelée bordure en brosse, qui s'attache à la surface du tissu osseux, permettant la sécrétion d'acides et d'enzymes lysosomales à la surface de l'os à résorber [98]. La dissolution du minéral se fait par libération d'acide chlorhydrique via la bordure en brosse. L'acidification du milieu permet aussi l'activation d'enzymes lytiques sécrétées par les ostéoclastes comme la cathepsine K ou la phosphatase acide résistante au tartrate pour résorber le tissu colloïde [99]. Les produits inorganiques (c'est-à-dire le calcium et le pyrophosphate) et des molécules organiques (par exemple, des fibres de collagène) sont emballés dans des vésicules de transcytose, qui sont transportées vers le domaine sécrétoire fonctionnel au niveau du domaine basolatéral des ostéoclastes et sécrétées par exocytose [99].

Les ostéoclastes dérivent de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules mononuclées. À la fin de leur différenciation, les pré-ostéoclastes fusionnent pour devenir des ostéoclastes matures multinucléés [98].

La différenciation, la prolifération et la survie des ostéoclastes dépendant du facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF)[100]. Indispensable à la maturation et l'activation complète des ostéoclastes, le ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B (RANKL) est secrété par les Ob, preuve d'un dialogue étroit entre les Ob et les ostéoclastes [101]. De plus, les Ob secrètent également du GM-CSF [78] et de l'ostéoprotégérine, un régulateur négatif de l'ostéoclastogenèse, car elle se lie au RANKL, empêchant l'interaction entre RANK et RANKL [102].

iv. Adipocytes médullaires

I. Distribution anatomique

Les Ad med constituent l'adiposité médullaire. Ce tissu adipeux est localisé dans la moelle osseuse et représente environ 70 % du volume de celle-ci et entre 5 et 10 % du tissu adipeux total chez l'adulte [103]. Initialement, à la naissance, la moelle osseuse est rouge, car constituée principalement de cellules hématopoïétiques (environ 55 %), puis la proportion d'adipocytes augmente durant la croissance et jusqu'à l'âge adulte (environ 25 ans). Ce processus correspond au remplacement de la moelle rouge par de la moelle jaune qui sera finalement composée jusqu'à 90 % d'Ad med [104] (**Figure 5**). La conversion débute dans la partie distale du squelette appendiculaire. Pour les os longs, la moelle rouge est d'abord remplacée au niveau des épiphyses, puis au niveau de la diaphyse. Au niveau du squelette axial, la conversion est plus tardive et la moelle jaune ne remplace pas intégralement la moelle rouge [105].

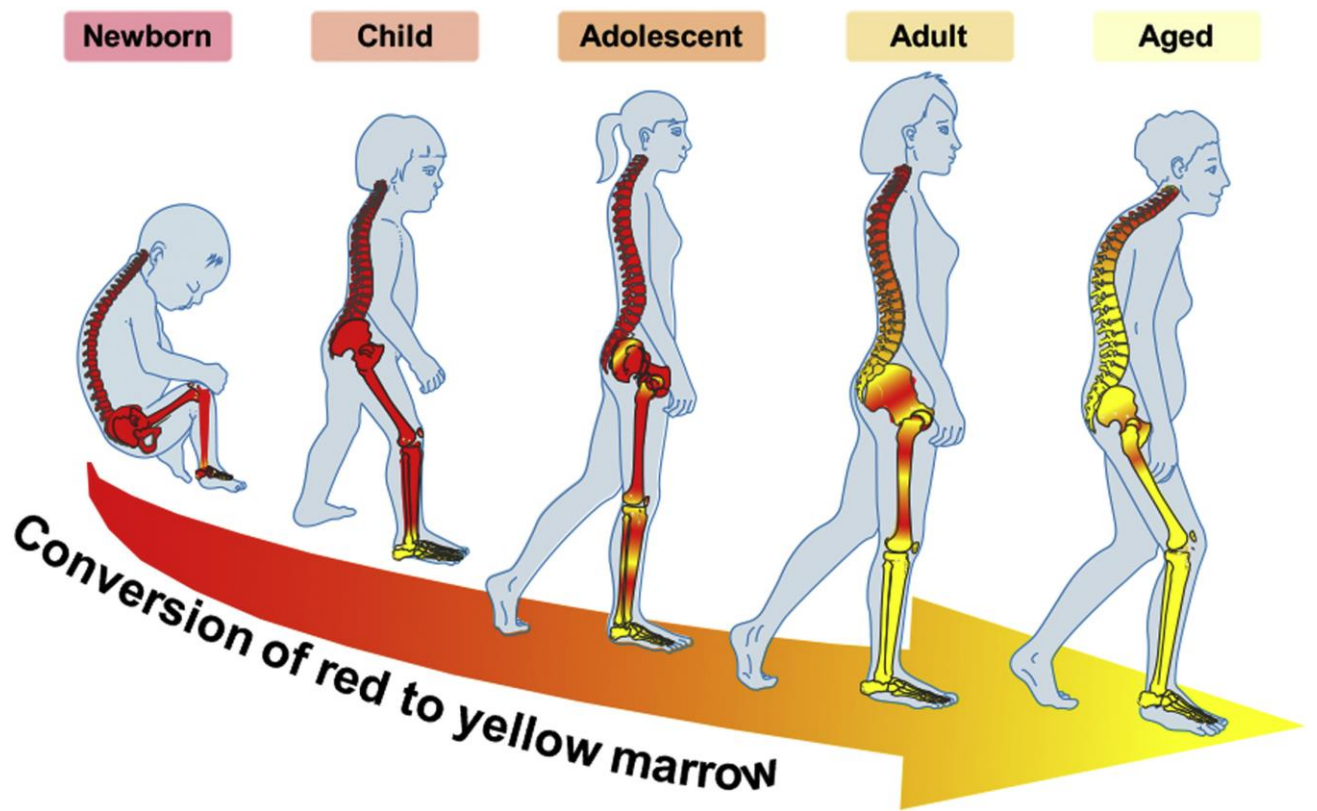


Figure 5 : Évolution de la composition médullaire au cours de la croissance et du vieillissement (D'après Li *et al.* 2018 [104])

II. Différenciation des adipocytes médullaires

Les Ad med sont issus de la différenciation des cellules souches squelettiques [106], progéniteurs également des Ob (**Figure 6**). Il existe donc une compétition entre les Ad med et les Ob pour la différenciation des cellules souches squelettiques, notamment dans l'ostéoporose post-ménopausique où la perte osseuse est associée à une augmentation de l'adiposité médullaire [107]. Les Ad med pourraient par leurs sécrétions influencer l'engagement des cellules souches squelettiques vers la voie adipocytaire ou induire une transdifférenciation des Ob en Ad med [107–110].

La différenciation adipocytaire suit plusieurs étapes : l'engagement des préadipocytes vers la voie adipocytaire, l'arrêt de la prolifération des pré-adipocytes liée à l'inhibition de contact, l'expansion clonale mitotique avec plusieurs cycles de division cellulaire, la différenciation terminale pour arriver vers des Ad med matures [111].

Les facteurs de transcription clés de la différenciation adipocytaire sont *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* (PPAR γ), surtout l'isoforme PPAR γ 2 spécifique de l'adipocyte, et *CCAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP α/β). PPAR γ 2 est nécessaire pour l'initiation de l'adipogenèse et pour le maintien de la différenciation des Ad med matures. Chez les souris obèses dépourvues de PPAR γ 2, l'expansion du tissu adipeux est plus limitée par rapport à des souris obèses contrôles [112]. L'expression de PPAR γ induit l'expression de C/EBP α qui permet, à son tour, de maintenir l'expression de PPAR γ au cours du temps.

Ces facteurs constituent ainsi une boucle de régulation nécessaire à la différenciation et à la maturation adipogéniques [113].

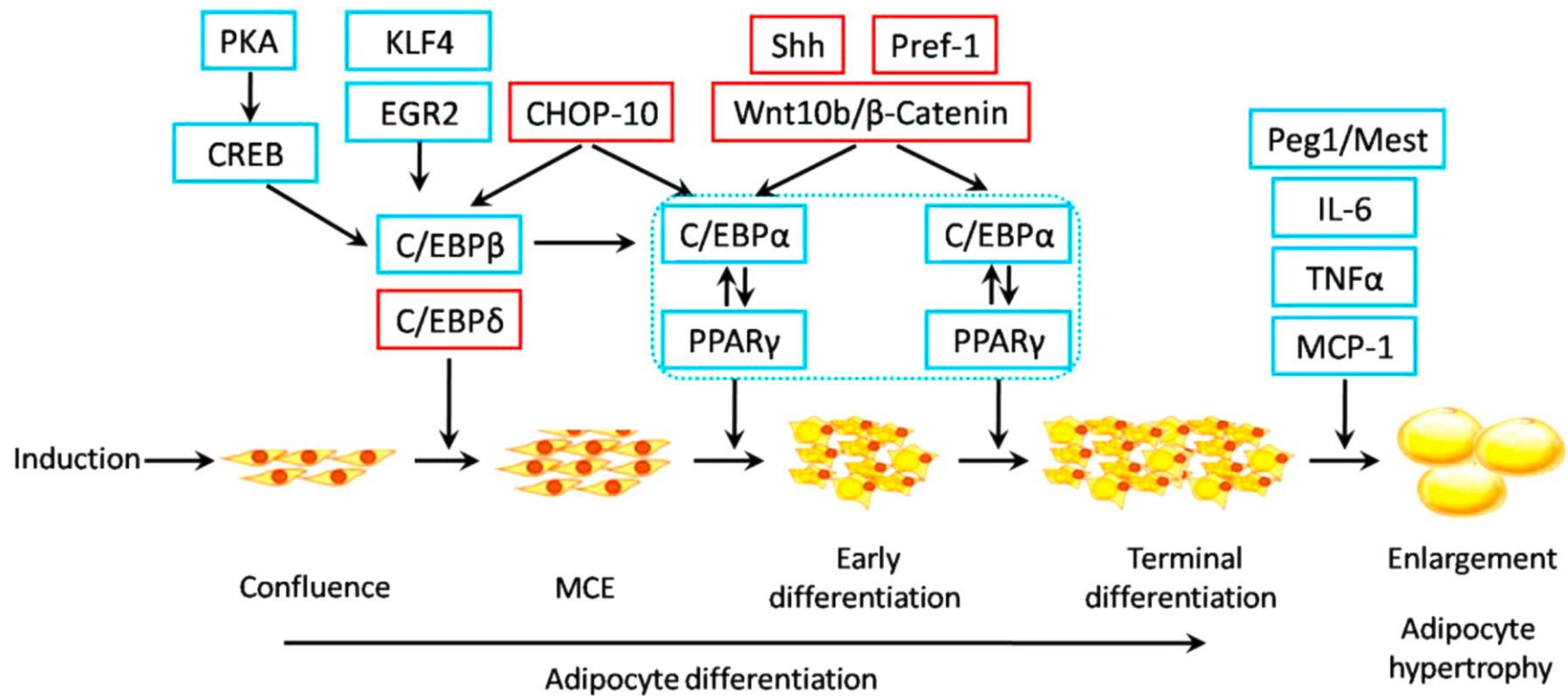


Figure 6 : Représentation schématique de la différenciation adipocytaire (D'après Wang *et al.* 2015 [114])

C/EBPα/β: CCAAT/enhancer-binding protein. *CHOP-10*: C/EBP homologous protein 10. *CREB*: cAMP response element-binding protein. *EGR2*: Early growth response 2. *IL-6*: Interleukin 6. *KLF4*: Kruppel-like factor 4. *MCE*: Expansion clonale mitotique. *MCP-1*: Monocyte chemotactic protein 1. *Mest*: Mesoderm specific transcript. *Peg1*: Paternally expressed gene 1. *PKA*: Protéine kinase A. *PPARγ*: Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pref-1*: Preadipocyte factor-1. *Shh*: Sonic hedgehog. *TNFα*: Tumour Necrosis Factor alpha. *Wnt*: Wingless integration site.

III. Autres tissus adipeux

L'adiposité médullaire diverge des autres tissus adipeux, les tissus adipeux blanc et brun. Le tissu adipeux blanc est un tissu indispensable pour l'homéostasie métabolique et le principal site de stockage de lipides. C'est un tissu endocrine qui participe à la régulation de l'insulinosensibilité et à la régulation de la faim [115] via la sécrétion de nombreuses hormones dont les adipokines spécifiques des adipocytes telles que la leptine et l'adiponectine, mais aussi des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL-6. Il se localise en sous-cutané et en viscéral. Sa répartition dépend notamment des hormones sexuelles. Chez les femmes, le tissu adipeux blanc est localisé principalement en sous-cutané au niveau des cuisses et des hanches, tandis que les hommes ont comparativement moins de tissus adipeux sous-cutané et un tissu adipeux viscéral identique [115].

Le tissu adipeux brun est présent surtout chez les fœtus et les nouveau-nés en faible proportion chez les adultes en région sus-claviculaire et sus-scapulaire [116]. Il permet la thermogénèse via la lipolyse des acides gras par la protéine mitochondriale découplante de type 1 (UCP-1) [115]. Deux autres tissus adipeux ont été découverts récemment : les tissus adipeux beige et rose. Le tissu adipeux beige est proche du tissu adipeux brun et se trouve dans les dépôts de tissu adipeux blanc. Il répond à des stimuli comme le froid, le système nerveux sympathique, les hormones thyroïdiennes et l'exercice. Il exprime UCP-1 à un niveau plus faible que le tissu adipeux brun, mais il est plus sensible aux stimuli. Le tissu adipeux rose est localisé au niveau de la glande mammaire. Il correspond à une conversion temporaire d'adipocytes blancs en cellules alvéolaires (adipocytes roses) lors de la lactation [117].

IV. Spécificité des adipocytes médullaires

Les Ad med sont des adipocytes uniloculaires de plus petite taille que les adipocytes extramédullaires (**Tableau 1**). L'étude des Ad med dans des modèles de souris et rats a permis de mettre en évidence deux populations. Les Ad med dits « constitutifs » se développent après la naissance, sont larges et proches les uns des autres sans cellules hématopoïétiques entre elles. Leur contenu lipidique est constitué d'acides gras insaturés. Au contraire, les Ad med dits « régulés » sont plus petits et se développent au cours de la vie, notamment au niveau de la partie distale des tibias et les vertèbres sacro-coccygiennes. Ils contiennent surtout des acides gras saturés. À l'état d'équilibre, les Ad med régulés sont des cellules uniques localisées dans des zones d'hématopoïèse active, c'est-à-dire dans la moelle rouge de la partie proximale des fémurs, des tibias et dans les vertèbres lombaires [104]. La réponse aux stress physiologiques diffère entre les deux sous-types. Les Ad med régulés diminuent en taille et en nombre lors de l'exposition au froid, du jeûne et d'exercices prolongés. Ils augmentent avec l'âge, un régime riche en graisse, une restriction calorique, une anorexie, une irradiation, des traitements comme les thiazolidinediones et les corticoïdes. Au contraire, les Ad med constitutifs ne semblent pas changer de taille en réponse à des stimulus externes [105]. La présence de ces deux populations chez l'Homme reste à confirmer.

De façon surprenante, les Ad med sont peu capables de lipolyse, c'est-à-dire de libération d'acides gras à partir des triglycérides. La voie β -adrénergique, qui est la voie prédominante stimulant la lipolyse des tissus adipeux extramédullaires, est bien présente dans les Ad med. Toutefois, sa stimulation dans les Ad med entraîne très peu de libération des acides gras et du glycérol comme démontré *in vitro* [118], chez la souris [119] et chez l'Homme [120].

Longtemps considéré comme un tissu de remplissage des os trabéculaires (côtes, sternum, vertèbres) et de la cavité médullaire des os longs (tibia, fémurs et humérus) impliqué dans la conversion de la moelle rouge à la moelle jaune, il est désormais démontré que l'adiposité médullaire est un tissu actif, capable de sécréter des adipokines telles que l'adiponectine et la leptine à des niveaux plus faibles que le tissu adipeux sous-cutané chez l'Homme [121,122], mais aussi des cytokines telles que l'IL-6 et le GM-CSF [123]. Les Ad med sont aussi capables d'un dialogue avec les autres cellules du microenvironnement osseux comme les cellules souches hématopoïétiques, les Ob, les ostéoclastes [105], ou avec les cellules tumorales dans le cadre des métastases osseuses [124].

Tableau 1 : Caractéristiques des 3 principaux tissus adipeux

	Adipocytes blancs	Adipocytes bruns	Adipocytes médullaires
Localisation	En sous-cutané En viscéral	Région sus-claviculaire Région sus-scapulaire	Moelle osseuse
Morphologie	Uniloculaire	Multiloculaire	Uniloculaire
Stockage lipidique	+++	+	++
Mitochondries	+	+++	++
Oxydation des acides gras	+	+++	+
Sécrétion	+++	+	++
Lipolyse	+++	+++	+
Modulation			
Âge	↑	↓	↑
Régime riche en graisse	↑	↑	↑
Froid	↓	↑	↓
Voie β-adrénergique	↓	↑	↓

c. Épidémiologie

i. Prévalence de l'ostéoporose dans la PR

L'ostéoporose, pathologie caractérisée par un dérèglement du remodelage osseux conduisant à une perte de quantité et/ou de qualité osseuse [65], est une complication de la PR pouvant entraîner des fractures et une surmortalité [66]. En 2000, Haugeberg *et al.* rapportaient une prévalence de l'ostéoporose densitométrique (T-score $\leq -2,5$ [125]) chez les patientes atteintes de PR deux fois plus importante que celle de la population générale [126]. Dans une étude plus récente, Hauser *et al.* retrouvaient une prévalence de l'ostéoporose densitométrique de 29,9 % (n=91/304) chez les patients atteints d'une PR et de 17,4 % (n=157/903) chez les témoins appariés sur l'âge et le sexe [127]. La majorité des patients était des femmes (81,9 %) avec un âge moyen de $63,5 \pm 11,8$ ans et une durée moyenne de la maladie de $9,6 \pm 10,2$ ans. Seuls 21,4 % des patients étaient traités par biothérapie. L'IMC moyen était de $27,5 \pm 6,1$ kg/m² pour les femmes et de $26,9 \pm 10,2$ kg/m² pour les hommes. Dans une vaste étude coréenne, 45,5 % (602/1322) des patientes ménopausées avaient une ostéoporose densitométrique [128]. Elles avaient un âge moyen de $61,2 \pm 8,2$ ans, une durée moyenne de la maladie de $12,1 \pm 9,9$ ans et un IMC moyen de $22,9 \pm 3,1$ kg/m². La majorité des patients (77 %) avait une corticothérapie avec une dose moyenne de $4,3 \pm 2,5$ mg/jour contrairement à l'étude précédente où seulement 29,3 % des patients étaient sous corticothérapie. L'ostéoporose chez les hommes atteints de PR est moins décrite dans la littérature. Dans une étude coréenne, l'ostéoporose densitométrique chez les hommes atteints de PR était significativement plus élevée que chez des témoins appariés sur l'âge (22,4 % contre 10,5 %, p=0,049) [129].

Dans l'ostéoporose, la décision thérapeutique repose sur les chiffres densitométriques, mais également en évaluant les facteurs de risque [130]. Le score *Fracture Risk Assessment Tool* (FRAX[®]) permet d'évaluer le risque d'ostéoporose sévère à 10 ans et ainsi de décider si ce risque est au-dessus du seuil interventionnel selon l'âge [131]. Dans une étude multicentrique rétrospective d'une population coréenne majoritairement de femmes ménopausées (77,2 %), l'ostéoporose densitométrique était présente chez 33,4 % (160/479), mais 47,2 % (264/479) avaient une indication à l'instauration d'un traitement [132].

A l'inverse des études précédemment citées, une seule étude de registre allemand rapporte une diminution de la prévalence de l'ostéoporose, définie par le clinicien, chez les patients atteints de PR (âge moyen de 63 ans et 75 % de femmes) passant de 20 % en 2007 à 15 % en 2017 ($p < 0,001$) [133].

ii. Prévalence des fractures ostéoporotiques dans la PR

Dans une méta-analyse de 23 études de cohortes publiées entre 1993 et 2017, l'incidence des fractures ostéoporotiques dans la PR était de 15,3 (IC 95 % 10,4-22,5) pour 1 000 personnes-années en tenant compte de l'hétérogénéité importante entre les études ($I^2 = 99,3$ %, $p < 0,001$) [134]. Les patients atteints de PR étaient plus à risque de présenter des fractures comparés aux témoins (risque relatif [RR] de 1,61 ; IC 95 % 1,44-1,79). L'incidence cumulée des fractures vertébrales radiographiques était de 42,4 (IC 95 % 32,5-55,4) pour 1 000 personnes-années et 4,29 (IC 95 % 1,69-10,89) pour 1 000 personnes-années pour les fractures vertébrales cliniques. Dans cette méta-analyse, l'incidence des fractures ostéoporotiques était stable au cours du temps allant de 15,83 (IC 95 % 10,48-23,90) pour 1 000 personnes-années en 1993 à 15,31 (IC 95 % 10,43-22,47) pour 1 000 personnes-années en 2016 [134].

Dans une étude longitudinale espagnole ultérieure à la méta-analyse précédente, les auteurs ont inclus 6657 fractures de hanche survenues chez des patients atteints de PR pendant 17 ans. Il était observé une augmentation de 3,2 % (IC 95 % 2,1-4,0 ; $p < 0,001$) de l'incidence annuelle du taux d'hospitalisation pour fractures de hanche entre 1999 et 2015. Dans l'analyse en sous-groupe, cette augmentation était observée chez les patients âgés d'au moins 60 ans [135].

iii. Facteurs de risque d'ostéoporose dans la PR

I. Facteurs liés aux patients

Dans l'étude d'Hauser *et al.* où étaient inclus 304 patients avec une PR, les patients ayant une ostéoporose étaient significativement plus âgés que les patients sans ostéoporose [127]. Il en était de même pour l'étude coréenne de 1322 patientes ménopausées atteintes de PR avec un Odds Ratio (OR) à 2,28 (IC 95 % 1,40–3,58 ; $p < 0,001$) pour les patientes âgées de 70 ans ou plus [128]. Le sexe féminin est aussi classiquement associé à l'ostéoporose. Dans l'étude d'Hauser *et al.*, les patientes étaient plus fréquemment ostéoporotiques que les patients [127]. Dans une étude coréenne de 479 patients atteints de PR, le sexe féminin était significativement associé au risque de développer des fractures ostéoporotiques (OR= 4,22 ; IC 95 % 1,8–9,9 ; $p = 0,001$) [132].

Un IMC faible est également un facteur retrouvé dans les études. Dans l'étude d'Hauser *et al.*, l'IMC était significativement faible chez les patients ostéoporotiques [127]. De même, un petit poids était significativement associé à une diminution de la densité minérale osseuse (DMO) [126]. Le tabagisme, facteur classique de l'ostéoporose post-ménopausique, n'était pas associé à l'ostéoporose chez les patients atteints de PR dans la majorité des études [127,135].

II. Facteurs liés à la PR

L'influence des caractéristiques de la PR elle-même est plus contrastée dans l'ostéoporose selon les études. Une durée d'évolution ≥ 10 ans était un facteur de risque d'ostéoporose chez les 1322 patientes coréennes ménopausées (OR=1,46 ; IC 95 % 1,07–2,00 ; $p=0,032$) [128]. La durée de la maladie était associée à la probabilité de survenue des fractures ostéoporotiques majeures selon le score FRAX® [132]. Au contraire, plusieurs études ne retrouvaient pas d'association entre l'ostéoporose et la durée de maladie chez les patients atteints de PR [126,127,129].

La présence de facteurs rhumatoïdes était associée à une perte osseuse dans l'étude d'Haugeberg *et al.* [126] contrairement à d'autres études [127–129]. Aucune étude ne retrouvait d'association entre la présence d'ACPA et l'ostéoporose [127–129]. La présence d'érosion radiographique ne semblait pas non plus associée à l'ostéoporose [127,129].

Concernant les indices d'activité, les données sont rares. Dans l'étude des 1322 patientes coréennes ménopausées, le *Disease Activity Score 28* utilisant la vitesse de sédimentation (DAS 28-VS) n'était pas associé à l'ostéoporose [128]. La VS et la CRP étaient significativement plus élevées chez les patients atteints d'ostéoporose dans une étude de 304 patients écossais [127] contrairement à l'étude des 1322 patientes coréennes ménopausées où il n'était retrouvé aucune association statistique entre la CRP ou la VS et l'ostéoporose [128].

iii. Facteurs liés aux traitements

I. Corticothérapie

La corticothérapie est un facteur de risque d'ostéoporose bien connu chez les patients atteints de PR. Dans une méta-analyse de 15 études, la DMO au rachis lombaire et au col fémoral des patients atteints de PR traités par corticothérapie était significativement plus basse que chez des patients sans corticothérapie [136]. Dans une étude anglaise rétrospective utilisant la base de données des médecins généralistes, les 13 770 patients atteints de PR traités par corticothérapie avaient un risque plus élevé d'ostéoporose par rapport aux 20 280 sans corticothérapie (OR=1,41 ; IC 95 % 1,25-1,59) ainsi qu'un risque plus élevé de fractures (OR=1,14 ; IC95 % 1,01-1,29) [137].

La dose et la durée de la corticothérapie sont également à prendre en compte. Dans une autre étude utilisant la même base de données des médecins généralistes, le risque de fracture était le plus élevé dans le premier mois chez les patients atteints de PR traités par corticothérapie par rapport à ceux sans corticothérapie : HR entre 1 jour et 1 mois=1,66 (IC 95 % 1,27-2,16) et HR entre 1 et 3 mois= 1,11 (IC 95 % 0,79-1,57). Seule une posologie supérieure à 5 mg par jour était associée à un risque de fracture [138].

Il reste toujours un débat sur l'utilisation de la corticothérapie à faible posologie et à courte durée en début de traitement. Les recommandations européennes maintiennent cette position en arguant qu'une corticothérapie à faible posologie pour lutter contre l'inflammation systémique délétère pour l'os pourrait contrebalancer ses effets indésirables et avoir même des effets positifs sur la santé osseuse [31]. Les recommandations américaines proposent plutôt d'éviter, si possible, la corticothérapie au vu de ses effets indésirables osseux [139].

II. Autres traitements

Il existe d'autres traitements associés à un risque fracturaire chez les patients atteints de PR. Dans une étude longitudinale de 6 899 patients américains, la prise d'opioïdes et d'inhibiteurs de la recapture de la sérotonine était associée à un risque fracturaire, avec respectivement un HR=1,26 (IC 95 % 1,01-1,72) et un HR=1,86 (IC 95 % 1,32-2,62). La durée était importante, puisque le surrisque fracturaire n'était observé que dans le premier mois de prise d'opioïdes (HR=1,48 ; IC 95 % 1,00-2,20) et après un mois de prise d'inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (HR=1,96 ; IC 95 % 1,29-2,98) [140]. Le surrisque fracturaire sous opioïdes était également retrouvé dans une étude québécoise [141].

d. Facteurs influençant le microenvironnement osseux dans la PR

Comme écrit précédemment, le microenvironnement osseux peut être perturbé dans la PR et aboutir à une ostéoporose secondaire. Nous détaillerons les facteurs impliqués dans cette partie.

i. Inflammation

Dans le cadre de la PR, le microenvironnement osseux est inflammatoire. Le TNF α et l'IL-6 stimulent l'activité des ostéoclastes, donc la résorption osseuse, via l'augmentation de l'expression de RANKL. Le TNF α peut également diminuer l'expression de l'ostéoprotégérine, augmentant le ratio RANKL/ostéoprotégérine [142]. Il inhibe l'expression de Runx2 [143–146] et stimule l'expression de *Dickkopf protein-1* (DKK-1), ce qui régule négativement la formation ostéoblastique. En effet, DKK-1 est un antagoniste de la voie de signalisation *Wingless Integration site* (Wnt)/ β -caténine qui est essentielle dans la formation ostéoblastique [147].

À l'heure actuelle, aucune étude publiée ne s'est intéressée à l'adiposité médullaire dans la PR. Cependant, il est décrit en IRM un œdème osseux périarticulaire [148] notamment des mains et des pieds. Dans une étude autrichienne monocentrique de 12 patients atteints de PR, l'œdème osseux visualisé en IRM sur les articulations métacarpo-phalangiennes et interphalangiennes proximales correspondait à un infiltrat inflammatoire remplaçant l'adiposité médullaire périarticulaire en histologie [149]. Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL-6 sont décrites comme inhibant la différenciation adipocytaire, notamment médullaire [150–153].

ii. ACPA

Ces anticorps pourraient jouer un rôle délétère sur le microenvironnement osseux. Dans une étude cas-témoin, 96 patients atteints de PR avec ACPA, 84 patients atteints de PR sans ACPA et 96 témoins ont bénéficié d'une évaluation de la DMO volumique et de la microarchitecture osseuse au radius ultradistal par microscanner périphérique à haute résolution. À partir d'un modèle utilisant l'analyse d'éléments finis provenant de cette évaluation, la présence d'ACPA était associée significativement ($p=0,007$) à des propriétés biomécaniques diminuées (rupture de charge et rigidité osseuse) [154].

D'un point de vue physiopathologique, un groupe de chercheurs a observé l'expression de protéines citrullinées membranaires et cytoplasmiques pour les ostéoclastes. L'ajout de sérums de patients atteints de PR ACPA+ stimulait également l'ostéoclastogenèse par rapport à des sérums de patients ACPA-. Cependant, ces résultats n'ont pas réussi à être reproduits par un autre groupe [155].

iii. Corticothérapie

À dose physiologique, les corticoïdes ont des effets anaboliques sur l'os, en promouvant l'ostéogenèse. Ils sont nécessaires pour l'homéostasie osseuse [156]. Cependant à des doses plus élevées, les corticoïdes exogènes diminuent la prolifération [157] et la différenciation des Ob [158] via l'inhibition de facteurs de croissance tels que les protéines Wnt et les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) [159,160], et induisent et l'induction des protéines inhibitrices comme DKK-1 [160,161]. Les corticoïdes induisent aussi l'autophagie et l'apoptose des Ob [136,162] et stimulent les ostéoclastes [163], notamment via l'augmentation de l'expression de RANKL et la diminution de l'expression d'ostéoprotégérine chez les Ob [164,165].

e. Influence des traitements de la PR sur l'ostéoporose

i. csDMARDs

Les csDMARDs diminuant l'activité inflammatoire de la maladie, il serait logique d'espérer une prévention de l'ostéoporose. Malheureusement, les données sur l'action du méthotrexate sur la prévention de l'ostéoporose sont peu nombreuses et anciennes [166–173]. La plupart des études ont un petit nombre de patients. Dans une étude rétrospective italienne, 485 patientes atteintes de PR n'ayant jamais été traitées par méthotrexate ont été comparées à 246 patientes atteintes de PR traitées par méthotrexate depuis au moins 6 mois. Le T-score au rachis lombaire et au col fémoral était comparable entre les groupes, après ajustement sur l'âge, le statut ménopausique, l'IMC, le *Health Assessment Questionnaire* (HAQ) et la corticothérapie [168].

Dans une autre étude longitudinale comprenant 117 patientes japonaises suivies pendant 4 ans, aucune différence n'était retrouvée pour le risque fracturaire vertébral entre les patientes traitées par méthotrexate et les autres [173]. Le méthotrexate ne semble donc pas apporter un bénéfice osseux.

Les études sur l'influence des autres csDMARDs sur l'os sont limitées et il n'est pas possible d'en tirer de conclusion.

ii. Biothérapies

I. Anti-TNF α

Il existe plus de données sur l'influence des anti-TNF α sur l'os. Les études prospectives évaluant l'infliximab avec un suivi allant de 1 à 3,3 ans notent dans la majorité une stabilité de la DMO au rachis lombaire et à la hanche [174–178]. Seule une étude de 52 patients atteints de PR suivis pendant 3,3 ans notait une augmentation de la DMO au rachis lombaire sous infliximab [178]. Concernant l'adalimumab, une étude prospective sur un an retrouvait une stabilité de la DMO au rachis lombaire et au col fémoral chez 46 patients [179]. Une autre retrouvait une diminution de la DMO de 0,90 % à la hanche et de 0,7 % après un an de traitement par adalimumab chez 41 patients non traités par bisphosphonates [180]. Concernant les autres anti-TNF α , une étude prospective d'un an retrouvait une stabilité de la DMO à la hanche et au rachis lombaire chez 20 patients traités par étanercept et 16 par certolizumab [181]. Il n'y a pas d'étude spécifique évaluant l'influence du golimumab sur l'os. Dans le registre CORRONA, l'anti-TNF α en monothérapie était associé à une diminution du risque fracturaire par rapport à des patients traités par méthotrexate en monothérapie [182].

II. Autres biothérapies

Les données sont beaucoup plus limitées pour les autres biothérapies. Les études prospectives (n=76 à 88 et suivis de 1 à 2 ans) évaluant l'influence du tocilizumab sur l'os notent une stabilité de la DMO au rachis lombaire et à la hanche [183–185]. Une étude prospective a comparé 50 patients sous abatacept à 115 patients sous anti-TNF α (infliximab, étanercept, adalimumab et golimumab) ou tocilizumab. La variation de la DMO à 1 an au rachis lombaire était comparable entre les 2 groupes. Au contraire, il y avait un gain significatif de la DMO au col fémoral des patients sous abatacept [186]. Concernant le rituximab, dans une étude prospective de 36 patients, une stabilité de la DMO au rachis lombaire et une légère diminution à la hanche étaient retrouvées après 1 an [187].

f. Tofacitinib et os

i. Voie de signalisation JAK/STAT dans la différenciation ostéoblastique

La voie JAK/STAT, cible du Tofa, joue un rôle important dans le développement du squelette. Les souris ayant une mutation activatrice de JAK1 présentent dès 7 semaines une diminution du volume cortical fémoral, prouvant le rôle de JAK1 dans le développement osseux [188]. Les souris KO pour JAK2 meurent d'anémie à 12 jours de développement avant le développement osseux [189]. JAK2 est activée par l'hormone de croissance, essentielle pour l'embryogenèse osseuse normale. Par la suite, JAK2 phosphorylée active STAT5 [190]. L'inhibition de STAT5B par un petit ARN interférent induit une diminution de l'expression génique de Runx2 [191]. STAT5 peut s'associer avec Runx2 pour former un complexe de transcription afin d'augmenter l'activité transcriptionnelle de Runx2 et l'expression de gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique [192].

L'inactivation de STAT1 induit un phénotype ostéopérotique chez la souris KO avec une augmentation de la masse osseuse, mais sans anomalie du développement osseux. STAT1 diminue l'activité transcriptionnelle de Runx2 [193]. Les souris KO pour STAT1 ont une accélération de la formation du cal osseux dans un modèle de fracture corticale [194].

STAT3 est également essentiel pour le développement embryonnaire puisque les souris KO pour STAT3 meurent vers le 7^e jour de développement embryonnaire [195]. L'inactivation spécifique de STAT3 chez les Ob entraîne un poids et une masse osseuse plus faibles chez les souris [196]. Chez l'homme, les mutations de STAT3 entraînent un phénotype ostéoporotique fracturaire [197,198]. La délétion de STAT3 spécifiquement dans les ostéocytes murins entraîne une limite d'élasticité et un module de Young (module d'élasticité longitudinale) plus faible. STAT3 s'associe aussi à Runx2 pour se lier à un site du promoteur de Runx2 afin de favoriser ses activités transcriptionnelles [199].

ii. Voie de signalisation JAK/STAT dans la différenciation adipocytaire

Les premières études sur le rôle des STAT dans le développement adipocytaire ont été publiées il y a plus de 20 ans. Stephens *et al.* ont observé que le niveau d'expression des protéines STAT1, 3, 5A et 5B était augmenté durant la différenciation adipocytaire des préadipocytes 3T3-L1[200].

La voie JAK2/STAT3 joue un rôle prépondérant dans la différenciation adipocytaire. Elle est activée dans les tout premiers stades de différenciation adipocytaire précoce via la régulation du facteur de transcription C/EBP β chez des pré-adipocytes 3T3-L1[201,202]. Lors de la différenciation adipocytaire des 3T3-L1, on constate une augmentation transitoire de la phosphorylation de STAT3 pendant les 24 premières heures de différenciation [203,204].

L'inhibition de JAK2 ou de STAT3 via des inhibiteurs ou des petits ARN interférents entraîne une diminution de l'adipogenèse chez des pré-adipocytes 3T3-L1 [202,204]. De plus, l'ajout d'un agoniste de PPAR γ restaure l'adipogenèse des cellules 3T3-L1 inhibée par des petits ARN interférents de STAT3, prouvant que STAT3 régule et active PPAR γ [202]. Par ailleurs, l'expression de PIAS3, une protéine inhibitrice de STAT3 activée, est diminuée au cours de la différenciation adipocytaire dans les 3T3-L1 [205]. STAT3 pourrait aussi promouvoir la différenciation adipocytaire via l'expansion clonique mitotique dans les préadipocytes 3T3-L1, les adipocytes sous-cutanés de rats et les adipocytes issus des coussinets adipeux interscapulaires de chiots nouveau-nés [203,206–208].

STAT5 est également impliquée dans la différenciation adipocytaire. La délétion de STAT5A, STAT5B ou des 2 chez les souris entraîne un développement altéré du tissu adipeux. L'inhibition de STAT5A par des petits ARN interférents empêche la différenciation adipocytaire des 3T3-L1. Au contraire, l'inhibition de STAT5B par des petits ARN interférents n'entraîne qu'une diminution de la différenciation adipocytaire [209]. STAT5 est phosphorylé très précocement, dès 30 minutes après l'induction adipocytaire dans les pré-adipocytes 3T3-F442A [210].

STAT 1 ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans la différenciation adipocytaire en conditions physiologiques. Son expression est augmentée au cours de l'adipogenèse [200], mais son inactivation chez les souris n'entraînait pas de modifications de poids, donc du tissu adipeux, par rapport à des contrôles [211]. Cependant, dans une étude plus récente, des souris KO pour STAT1 présentaient une dépense énergétique plus importante. Leur tissu adipeux sous-cutané avait une masse et un nombre d'adipocytes plus importants [212].

iii. Effet du Tofa sur le microenvironnement osseux

Nous disposons de peu de données dans ce domaine et les résultats sont contrastés. *In vivo*, une seule étude préclinique dans le modèle du rat avec arthrite induite à l'adjuvant s'est intéressée à l'effet du Tofa [213]. Dix rats recevaient le Tofa à 10 mg/kg/jour équivalant chez l'homme à 50 mg/jour pendant 4 jours après l'induction de la maladie et étaient sacrifiés au bout de 22 jours de maladie. Il y avait une réduction du remodelage osseux (diminution du C-terminaux du collagène de type I [CTX] et du Propeptide N-Terminal du procollagène de type I total [P1NP]) et une augmentation de l'épaisseur corticale et trabéculaire en microscanner des rats sous Tofa par rapport au groupe contrôle. Cependant, la perte osseuse corticale et trabéculaire liée à l'inflammation n'était pas prévenue et il y avait une diminution du nombre d'Ob sous Tofa [213].

Deux études fondamentales publiées récemment ont retrouvé une action positive du Tofa sur l'os [214,215]. Dans la première, une augmentation de la masse osseuse trabéculaire chez des souris C57BL/6 traitées pendant 6 semaines par Tofa (50 mg/kg/jour) était notée par rapport aux souris contrôles. Il n'y avait pas de différence pour les paramètres osseux corticaux ni pour le nombre d'Ob. Par la suite, les auteurs ont évalué l'effet du Tofa dans un modèle murin mimant la PR (modèle d'arthrite induite par transfert de sérum arthritogène provenant de souris K/BxN). Une augmentation de la DMO trabéculaire et de l'épaisseur corticale chez les souris traitées par Tofa était observée par rapport à celles non traitées. Il n'y avait pas de différence concernant le nombre d'Ob.

Une augmentation de l'expression de l'ostéocalcine sous 200 et 500nM de Tofa était notée également dans des cellules souches mésenchymateuses murines placées pendant 1 jour dans un milieu de différenciation ostéogénique et dans des Ob matures (issus de calvaria à 21 jours de différenciation). Ces résultats d'expression génique étaient confirmés par une augmentation de la minéralisation des Ob sous Tofa par rapport aux contrôles en coloration Rouge Alizarine à 5 jours de différenciation. En revanche, l'expression génique de Runx2 n'était pas modifiée sous Tofa pour les Ob à 1 jour de différenciation [214].

À l'inverse, dans la 2^{de} étude, une augmentation de l'expression génique de Runx2 et de collagène 1a sous Tofa était observée uniquement en conditions hypoxiques dans des cellules souches mésenchymateuses, issues de la moelle osseuse de patients bénéficiant d'une prothèse totale de hanche, placées dans un milieu de différenciation ostéogénique pendant 7 jours. Cette augmentation de l'expression génique était corrélée à l'augmentation des concentrations de Tofa (de 250 à 500nM) [215].

iv. Effet du Tofa sur l'os en recherche clinique

Il existe très peu de données sur l'influence des JAKi sur l'os. Une seule étude prospective de 26 patients atteints de PR sous Tofa (la moitié sous Tofa 5mgx2 par jour et la moitié sous Tofa 10mgx2 par jour) est disponible. Il existait une stabilité des chiffres densitométriques au rachis lombaire et au col fémoral après 1 an de traitement. Au microscanner périphérique à haute résolution au radius ultradistal, les DMO volumétriques totale, trabéculaire et corticale étaient également stables, aux 2 posologies. Il y avait par ailleurs une augmentation de l'ostéoprotégérine, à 1 an chez l'ensemble des patients. Seuls les patients traités par Tofa 10 mg 2/jour avait une diminution des CTX sériques à 12 mois [216].

III. La sarcopénie et les modifications de la composition corporelle dans la PR

Dans ce chapitre, nous reprendrons le texte de notre revue sur le sujet, écrite dans le cadre de cette thèse d'Université [217] (**Annexe IV**).

a. Pourquoi s'intéresser à la composition corporelle dans la PR ?

Depuis 20 ans, les patients atteints de PR présentent des formes moins sévères avec une moindre prévalence des manifestations extra-articulaires sévères. On observe aussi une diminution de la mortalité [218,219]. Cependant, il existe toujours une surmortalité par rapport à la population générale, notamment cardiovasculaire [220]. Une meilleure évaluation des comorbidités et du risque cardiométabolique reste essentielle chez ces patients [221,222].

En plus de destructions articulaires et des comorbidités, une modification de la composition corporelle est décrite chez les patients atteints de PR [223,224]. L'inflammation systémique est le principal facteur impliqué dans cette altération de la composition corporelle, mais d'autres facteurs peuvent y contribuer comme la dénutrition, le handicap physique, les comorbidités, la corticothérapie, les biothérapies [225,226]. Les données actuelles suggèrent que la répartition des masses grasse et maigre dans l'organisme a des implications importantes pour la santé. Une masse maigre faible et un excès de masse grasse sont prédicteurs de mauvaise santé dans la population générale [227]. La forme la plus extrême de faible masse maigre, appelée cachexie, peut entraîner faiblesse, handicap et anomalies métaboliques [228–230]. Un excès de masse grasse est associé au risque de développer une obésité, un diabète, une hypertension artérielle et des maladies cardiovasculaires [220,231–233].

Une meilleure compréhension des modifications de la composition corporelle chez les patients atteints de PR, y compris ceux sous DMARDs, est nécessaire du fait des implications potentielles sur différents paramètres tels que le handicap et le risque cardiométabolique.

b. Mesures de la composition corporelle dans la PR

i. Définition de la composition corporelle

Concernant la composition corporelle, le modèle des 3 compartiments inclut deux compartiments majeurs (la masse grasse et la masse non grasse) et un compartiment mineur [234]. La composition corporelle n'est pas stable. Elle est dynamique et variable avec des modifications répondant aux stimuli internes et externes [235]. La composition corporelle est une « mémoire vivante » de ce que nous avons mangé ou expérimenté.

Les expériences qui peuvent influencer la composition corporelle comprennent les traumatismes, les infections et l'inflammation systémique chronique [236]. L'évaluation de la composition corporelle permet de mieux comprendre à la fois l'état nutritionnel et la capacité fonctionnelle du corps humain [237]. Différentes techniques sont utilisées pour mesurer la composition corporelle. Nous allons détailler celles qui permettent une évaluation de la composition corporelle globale.

ii. Techniques de mesure de la composition corporelle

I. Absorptiométrie biphotonique à rayons X

L'absorptiométrie biphotonique à rayons X (DXA) était utilisée initialement pour mesurer la DMO et diagnostiquer l'ostéoporose [238]. La DXA mesure l'atténuation de deux faisceaux de rayons X d'énergie différente à travers les tissus, ce qui permet de différencier l'os, la masse grasse et la masse non grasse (*Fat Free Mass* ou FFM), qui est aussi appelée masse maigre [239]. La DXA est considérée comme la méthode de référence pour mesurer la composition corporelle (**Tableau 2**) [240]. Elle peut être évaluée avec une faible exposition aux radiations (1 μ Sv, moins qu'une radiographie standard à 100 μ Sv) et rapidement [239]. Les autres avantages de cette technique comprennent sa simplicité, son faible coût, sa disponibilité et sa précision. La DXA est également utilisée pour mesurer l'adiposité viscérale (*Visceral Adipose Tissue* VAT) qui est associée au risque cardiométabolique [241–243]. Cependant, il existe des limites à cette technique. Par exemple, les muscles du tronc sont difficiles à évaluer. Par conséquent, si les mesures de la masse grasse et de la masse maigre sont dérivées des membres, elles risquent de surestimer ou de sous-estimer la masse musculaire totale et de l'obésité. En outre, l'œdème ou la déshydratation peuvent biaiser les mesures des muscles et de la graisse [244].

II. Analyse d'impédance bioélectrique

L'analyse d'impédance bioélectrique (BIA) est aussi utilisée pour mesurer la composition corporelle en faisant passer un courant électrique de faible intensité (500-800 mA) et de haute fréquence (50 kHz) à travers le corps, puis de mesurer divers paramètres électriques (résistance, réactance, impédance et angle de phase). Les mesures obtenues fournissent des estimations indirectes de la composition corporelle globale (**Tableau 2**).

La BIA évalue l'eau corporelle totale et peut prédire la quantité de FFM. Son utilisation se base sur plusieurs hypothèses, à savoir que (1) le corps humain est divisé en cinq cylindres, à savoir le tronc et les extrémités supérieures et inférieures, avec une conductivité électrique uniforme ; (2) la FFM contient pratiquement toute l'eau et les électrolytes de conduction dans le corps ; (3) l'hydratation du FFM est constante et (4) la longueur conductrice est égale à la stature [245]. La BIA peut être utilisée pour évaluer la composition corporelle chez les personnes âgées et les obèses, ainsi que chez les patients atteints de cancer ou d'infections [245–247]. Les avantages de la BIA sont la facilité d'utilisation, le prix abordable de l'appareil, l'absence d'exposition aux radiations et le caractère non invasif de la technique. Elle semble présenter une bonne corrélation avec la DXA [243,248]. Cependant, la BIA a trois limites : (1) il s'agit d'une méthode indirecte (2) elle ne peut pas être utilisée pour évaluer la DMO et la VAT et (3) chaque évaluation d'une population spécifique nécessite sa propre équation [248].

i. Paramètres mesurés par la DXA

En 2019, l'*International Society for Clinical Densitometry* (ISCD) a publié une mise à jour de sa position sur l'évaluation de la composition corporelle avec la DXA[249]. Selon l'ISCD, en ce qui concerne les adultes, tous les comptes rendus doivent mentionner obligatoirement les valeurs suivantes : l'IMC, la masse corporelle totale (TBM), la masse maigre totale (TLM), la masse grasse totale (FM) et le pourcentage de graisse corporelle (PBF) (**Tableau 3**). De plus, il existe d'autres mesures facultatives de l'adiposité et de la masse maigre dont la VAT (cm²), l'indice de masse grasse (FMI : FM/taille²), la masse maigre appendiculaire (ALM, kg), l'indice de masse maigre appendiculaire (ALMI : ALM/taille²) et l'indice de muscle squelettique (SMI : TLM/taille²).

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des méthodes évaluant la composition corporelle globale

Méthodes	Avantages	Inconvénients
DXA	<ul style="list-style-type: none"> • Différencie la masse grasse, la masse maigre et la masse osseuse • Haute précision et exactitude • Rapide et non invasif • Faible exposition aux radiations • Possibilité d'obtenir des mesures régionales 	<ul style="list-style-type: none"> • Non transportable • Les procédures d'étalonnage des instruments, le matériel et les logiciels varient d'un fabricant à l'autre. • L'épaisseur du corps et l'état d'hydratation peuvent influencer les mesures • Contre-indiqué pendant la grossesse
BIA	<ul style="list-style-type: none"> • Transportable • Faible coût • Pas d'exposition aux radiations • Rapide et non invasive • Très simple 	<ul style="list-style-type: none"> • Méthode indirecte • Limité par l'état d'hydratation : hydratation de la masse non grasse fixée à 73 % • Équation spécifique pour chaque population

BIA : analyse d'impédance bioélectrique DXA : absorptiométrie biphotonique à rayons X

Concernant la VAT, peu d'études s'intéressent à sa variation. En effet, l'utilisation de la DXA pour mesurer la VAT est une pratique récente. Tous les densitomètres ne sont pas conçus pour la mesurer. La FFM et l'indice de FFM (FFMI : FFM/taille²) sont parfois rapportés. L'utilité clinique de ces dernières mesures (FFM et FFMI) est actuellement incertaine.

c. Sarcopénie

La sarcopénie est une condition qui est communément associée au vieillissement. Elle se caractérise par la perte de masse et de force musculaires, ce qui entraîne une altération de la fonction musculaire. Une évaluation quantitative n'est pas suffisante pour établir un diagnostic de sarcopénie. Une évaluation complète des muscles, c'est-à-dire de la force musculaire et de la fonction musculaire, est également nécessaire.

La sarcopénie est caractérisée par une perte de masse maigre entraînant une altération de la fonction musculaire [250]. Elle peut également entraîner un handicap physique, des chutes, des fractures et même des maladies cardiovasculaires [251,252]. Bien que de nombreuses définitions de la sarcopénie ont été proposées, la définition la plus communément acceptée est celle publiée en 2010 par le groupe de travail européen sur la sarcopénie chez les personnes âgées (EWGSOP) [240]. En 2019, l'EWGSOP2 a publié une mise à jour de cette définition (**Figure 7**). La sarcopénie est désormais considérée comme une maladie musculaire (insuffisance musculaire), avec une faible force musculaire remplaçant une faible masse musculaire comme principal déterminant. S'il y a une suspicion de sarcopénie, il faut évaluer la force musculaire [227].

Tableau 3 : Paramètres de la composition corporelle évalués par la DXA

Paramètres	Unité
Masse corporelle totale (TBM)	kg
Masse maigre totale (TLM)	kg
Masse grasse totale (FM)	kg
Pourcentage de graisse corporelle (PBF)	%
Adiposité viscérale (VAT)	cm ²
Indice de masse grasse (FMI) <i>FMI est le rapport de FM/taillé²</i>	kg/m ²
Masse maigre appendiculaire (ALM) <i>ALM est la somme de la masse maigre des 4 membres</i>	kg
Indice de masse appendiculaire (ALMI) <i>ALMI est le rapport ALM/taillé²</i>	kg/m ²
Indice de muscle squelettique (SMI) <i>SMI est le rapport TLM/taillé²</i>	kg/m ²

La sarcopénie est probable si une faible force musculaire est établie (c'est-à-dire une force de préhension <26 kg pour les hommes et <16 kg pour les femmes OU test de lever de chaise, c'est-à-dire 5 levers de chaises, >15 s).

Le diagnostic est confirmé s'il existe une faible masse musculaire (c'est-à-dire ALMI <7,0 kg/m²) pour les hommes et <5,5 kg/m² pour les femmes, OU ALM <20 kg pour les hommes et <15 kg pour les femmes). La sarcopénie est considérée comme sévère en cas d'altération de la performance physique (c'est-à-dire une vitesse de marche ≤0,8 m/s, OU *Short Physical Performance Battery* [SPPB] ≤8 points, OU test « Get up and Go » ≥ 20 s ou non réalisable, OU test de marche de 400 m ≥6 min) [227].

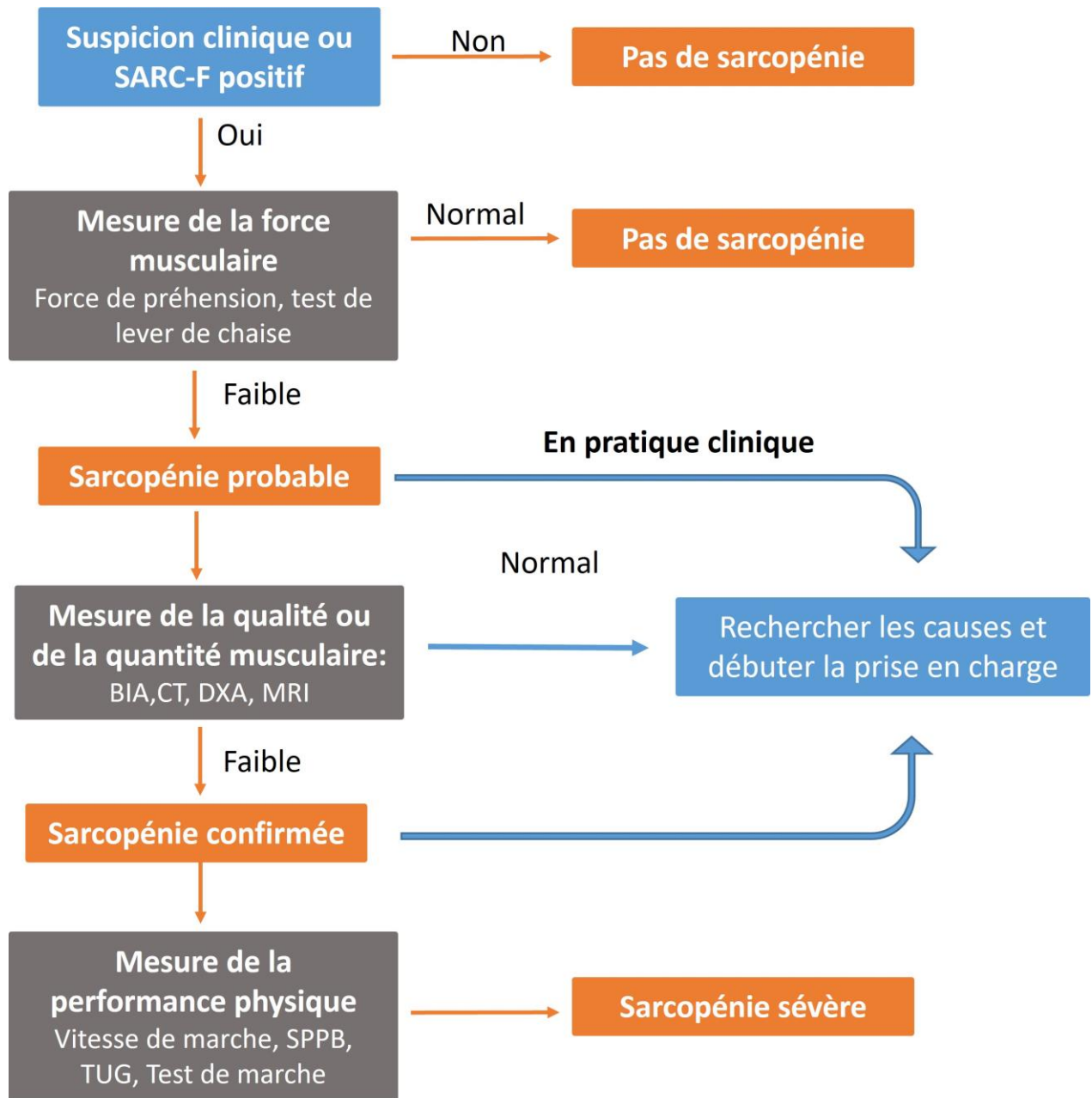


Figure 7 Définitions de la sarcopénie

Adapté de Cruz-Jentoft et al. 2019 [227]. BIA : analyse d'impédance bioélectrique. CT : tomodensitométrie. DXA : absorptiométrie biphotonique à rayons X. MRI= imagerie par résonance magnétique. SARC-F= un autoquestionnaire à 5 items, utilisé pour dépister le risque de sarcopénie. SPPB= short physical performance battery. TUG=timed up and go test.

Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, nous avons peu de données sur l'effet du Tofa, traitement de la nouvelle classe thérapeutique des JAKi, sur les tissus osseux et adipeux, que ce soit en recherche clinique ou en recherche fondamentale, et plus particulièrement sur l'effet du Tofa sur le microenvironnement osseux.

Le Tofa peut contrôler l'inflammation systémique, principal facteur responsable de l'ostéoporose secondaire et du surrisque cardiovasculaire chez les patients atteints de PR. Il pourrait avoir des effets bénéfiques sur le tissu osseux, possiblement liés à des effets directs sur le microenvironnement osseux et ne pas reposer exclusivement sur le contrôle de l'inflammation systémique. L'effet du Tofa sur les Ad med reste méconnu. Par ailleurs, le Tofa pourrait avoir également un effet sur la VAT, tissu associé au risque cardiovasculaire.

Le premier objectif était donc d'évaluer l'effet du Tofa sur le microenvironnement osseux, via le couple Ob-Ad med et l'engagement précoce des CSMs humaines (hCSMs).

Dans un deuxième objectif, nous avons également évalué l'effet du Tofa sur l'adiposité médullaire, la DMO et la composition corporelle dans une étude pilote prospective *TOfacitinib FAT* (TOFAT) chez des patients ayant une PR.

Dans un troisième objectif, nous nous sommes intéressés à la comparaison de la composition corporelle et de l'adiposité médullaire entre des patients ayant une PR et des témoins en présentant les résultats préliminaires de l'étude cas-témoins *Rheumatoid Arthritis FAT* (RAFAT).

Méthodes

I. Expériences de culture cellulaire

a. Culture cellulaire et traitements

Les hCSMs utilisées pour les expériences sont commercialisées par la société RoosterBio (Frederick, MD, USA). Ce modèle cellulaire a été choisi, car plus physiologique que les lignées établies. Les cellules de 3 donneurs ont été utilisées dans cette étude (une femme âgée de 20 ans et deux hommes âgés de 22 et 25 ans). Les cellules ont été purifiées par la société Roosterbio (positives pour les marqueurs de surface CD73, CD90 et CD105 à plus de 90 % et négatives pour les marqueurs de surface CD14, CD34 et C45) et leurs capacités de différenciation ostéogénique et adipogénique ont été vérifiées par la société et validées au laboratoire avant de débiter notre étude (**Annexe V**).

Les différentes expériences ont débuté lorsque les hCSMs ont atteint 90 % de confluence (J0). Pour induire l'ostéogénèse, les hCSMs ont été cultivées à J0 dans du milieu DMEM (Pan Biotech, Aidenbach, Allemagne) supplémenté de SVF 10 % (Pan biotech, Aidenbach, Allemagne) et d'inducteurs ostéogéniques (50 μ M d'acide ascorbique, 10 mM de β -glycérophosphate et 10^{-8} M de vitamine D3 [Sigma-Aldrich]). Pour induire l'adipogénèse, les hCSMs ont été cultivées à J0 dans du milieu DMEM (Pan Biotech, Aidenbach, Allemagne) supplémenté de SVF 10 % (Pan biotech, Aidenbach, Allemagne) et d'inducteurs adipogéniques (0,5 μ M de dexaméthasone, 0,5 mM d'isobutyl-1-méthylxanthine et 50 μ M d'indométacine [Sigma-Aldrich]).

Afin de déterminer l'effet du Tofa sur l'engagement précoce, les hCSMs ont été différenciées en Ob ou en Ad med dans des milieux appropriés pendant 3 jours avec du TNF α et du Tofa. L'effet du Tofa sur des Ad med pleinement différenciés a été évalué selon un protocole similaire pendant 6 jours après 14 jours de différenciation (**Figure 8**). 1 ng/mL de TNF α (Gibco, Carlsbad, CA, USA) a été ajouté aux cultures afin de se placer dans les conditions inflammatoires, observées dans la PR. Le TNF α humain recombinant a été acheté auprès de Gibco (Carlsbad, CA, USA), dissous dans de l'eau stérile et stocké à -20 °C.

Le Tofa a été gracieusement fourni par Pfizer (New York, NY, USA), dissous dans de l'eau stérile et conservé à -20 °C après sonication. Trois concentrations de Tofa ont été utilisées : 200, 400 et 800 nM. À la suite des recommandations de Pfizer, le Tofa à 400 nM a été considéré comme équivalent à la dose thérapeutique de Tofa utilisée dans la PR (5 mg deux fois par jour).

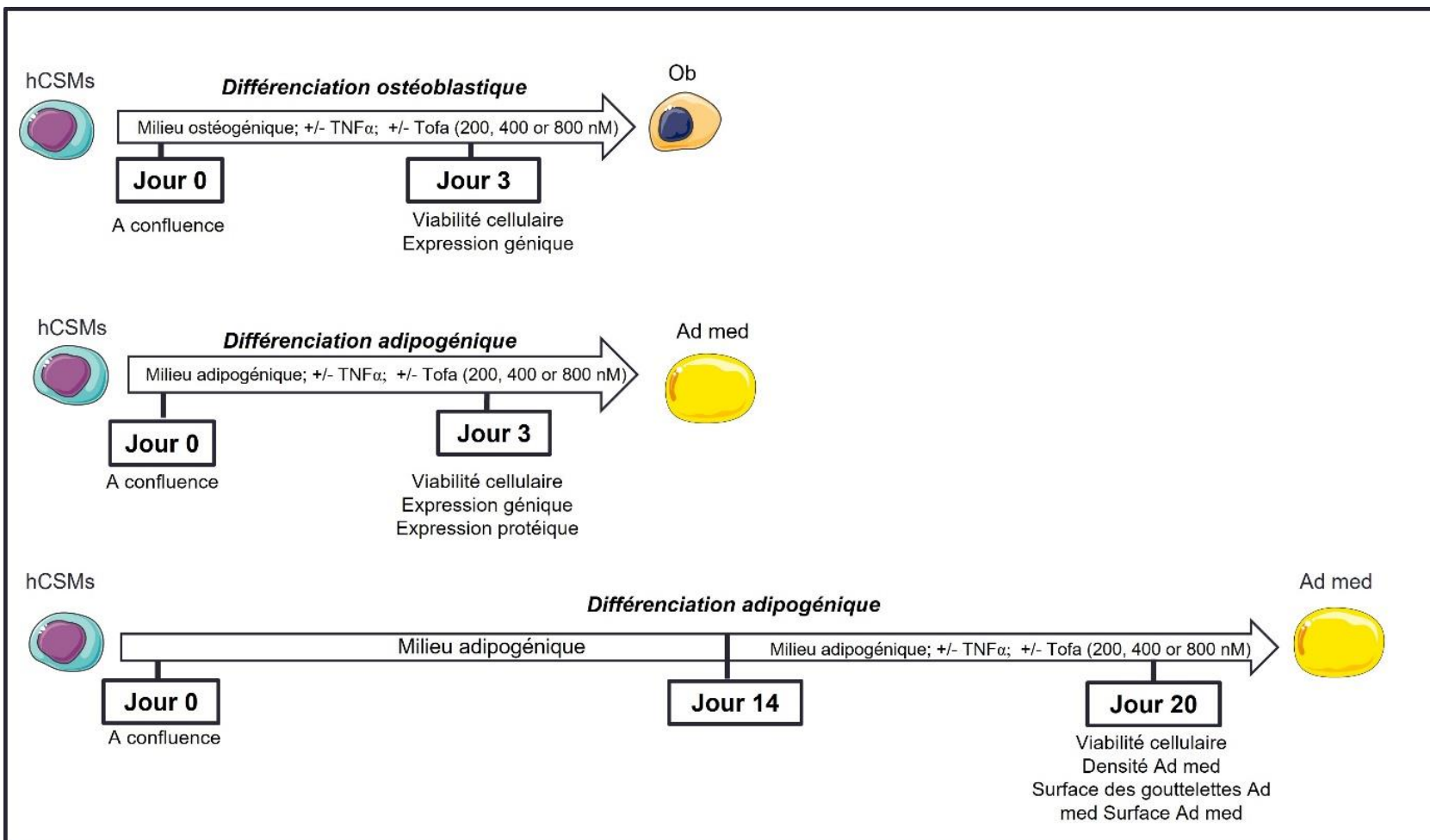


Figure 8 Schéma général des expériences de l'étude *in vitro*

Les hCSMs sont placées en milieux de différenciation ostéoblastique et adipocytaires plus ou moins en présence de tofacitinib et de TNF α . Le TNF α est ajouté pour mimer les conditions inflammatoires de la polyarthrite rhumatoïde. Ad med: Adipocytes médullaires. hCSMs : Cellules stromales humaines issues de la moelle osseuse. Ob : Ostéoblastes. TNF : Tumour Necrosis Factor.

b. Tests de la viabilité cellulaire

Le kit de dosage colorimétrique de prolifération cellulaire WST-1 a été utilisé pour mesurer la viabilité cellulaire. Le sel de tétrazolium stable WST-1 est clivé en un formazan soluble par un mécanisme cellulaire complexe qui se produit principalement à la surface des cellules. Cette bioréduction dépend largement de l'activité des déshydrogénases mitochondriales dans les cellules viables. Par conséquent, la quantité de colorant formazan formée est directement corrélée au nombre de cellules métaboliquement actives dans la culture.

Pour cela, les Ob et les Ad med ont été incubés avec du Tofa et du TNF- α dans des plaques à 96 puits et traités avec 10 μ l de WST-1 (réactif de prolifération cellulaire WST-1 ; Roche, Mannheim, Allemagne). Le mélange a ensuite été incubé pendant 4 heures à 37 °C, après quoi l'absorbance a été mesurée à 450 nm. La longueur d'onde de référence a été mesurée à 690 nm.

c. Mesure de la densité des Ad med, de la surface des Ad med et de leurs gouttelettes lipidiques

Après 20 jours de mise en culture, les Ad med différenciées ont été fixées dans du paraformaldéhyde à 2 % pendant 15 min, lavées à l'eau, incubées avec de l'isopropanol à 60 % pendant 5 min et colorées avec une solution Oil Red O, utilisée pour visualiser les triglycérides et les lipides, nouvellement filtrée pendant 10 min à température ambiante. Après la coloration, les cellules ont été rincées à l'eau avant d'être contre-colorées avec une solution d'hématoxyline, Gill no.3 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), utilisée pour visualiser les noyaux cellulaires, pendant 5 min à température ambiante.

Puis, la densité des Ad med a été évaluée en comptant le nombre de Ad med par rapport au nombre de cellules totales dans 12 images (6 par donneur) pour chaque condition. La surface des gouttelettes des Ad med a été évaluée à partir de 60 Ad med (30 par donneur), et la surface des Ad med a été évaluée à partir de 100 Ad med (50 par donneur) en utilisant le logiciel ImageJ (version 1.45).

d. Mesure de l'expression d'ARNm

i. Isolement des ARN

Les ARNm ont été extraits des Ob et des Ad med à l'aide du kit RNeasy® Micro comprenant une étape de digestion par la DNase I (Qiagen, Hilden, Allemagne), conformément aux instructions du fabricant, et quantifié par Nanodrop à une longueur d'onde de 260 nm. Les rapports d'absorbance 260/280 et 260/230 ont été mesurés pour vérifier la qualité des échantillons.

ii. Analyse de l'expression des ARNm

Après dosage, une étape de transcription inverse a été réalisée sur une quantité d'ARN allant de 0,6 à 1 µg à l'aide du kit de synthèse d'ADNc Maxima First-Strand (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) afin d'obtenir l'ADN complémentaire (ADNc). Ensuite, l'ADNc a été soumis à une PCR quantitative en temps réel sur le système StepOnePlus® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en utilisant le master mix SYBERgreen (POWER SYBR® Green PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) et des amorces spécifiques conçues à l'aide du logiciel Oligo 6 (MedProbe) ou le mixte Taqman (Taqman Universal Master Mix II, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et des sondes spécifiques (**Tableau 4**).

Les niveaux d'expression relative des gènes ont été normalisés par rapport aux transcrits YWHAZ (protéine d'activation de la tyrosine 3-monooxygénase/tryptophane 5-monooxygénase) et PPIA (peptidylprolyl isomérase A) pour les Ob et, RNAPol2 (ARN polymérase II) et YWHAZ pour les Ad med et déterminés par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

e. Dosage et quantification des protéines par Western Blot

Les Ad med ont été lavés par du PBS glacé (Pan Biotech, Aidenbach, Allemagne) et lysés dans un tampon de lyse [HEPES, MgCl₂, Glycérol, KCl, EDTA, DTT] complété par un cocktail d'inhibiteurs de protéase à usage unique Halt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) et de l'orthovanadate de sodium. Après la lyse des cellules, les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation. Pour ajuster la concentration en protéines, les extraits ont été quantifiés à l'aide du DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) conformément aux instructions du fabricant et dénaturés dans un échantillon 4X Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Les extraits de protéines ont été séparés sur des gels de SDS-polyacrylamide à 8 % (20 µg par puits) et transférés sur des membranes de nitrocellulose de 0,2 µm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) à l'aide d'un système Trans-Blot Turbo (transfert semi-sec) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Les membranes ont été bloquées dans de l'albumine de sérum bovin à 5 % (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) pour les protéines phosphorylées ou dans du lait écrémé à 5 % pour les autres protéines dans une solution saline Tris-buffered avec 0,05 % de Tween 20 (Acros Organics, Morris Plains, NJ, USA) pendant 1 heure.

Tableau 4 Séquences d'amorces et conditions de la PCR

ADNc	GenBank	Amorces directes et inverses	Th (°C)	Produit (pb)
<i>RNAPol2</i>	NM_0009 37	F : 5'- CCAAGCAGGACGTAATAGAGG -3' R : 5'- GCGGTCTAGCAACTCGTTCT -3'	55	193
<i>Ywhaz</i>	NM_1456 90	F: 5'- GGTCATCTTGGAGGGTCGTC -3' R: 5'- GTCATCACCAGCGGCAAC -3'	55	245
<i>PPIA</i>	NM_0211 30	F: 5'- ACCGTGTTCTTCGACATTGC -3' R: 5'- CAGGACCCGTATGCTTTAGGA -3'	55	274
<i>PPARγ2</i>	NM_0158 69	F : 5'- CAAACCCCTATTCCATGCTGTT -3' R: 5'- AATGGCATCTCTGTGTCAACC -3'	53	135
<i>C/EBPα</i>	NM_0043 64	F : 5' - ACTGGGACCCTCAGCCTTG -3' R: 5' - TGGACTGATCGTGCTTCGTG -3'	55	75
<i>IL-6</i>	NM_0006 00	F: 5'- CAATGAGGAGACTTGCCTGG -3' R: 5'- GCACAGCTCTGGCTTGTTC -3'	53	113
<i>PLIN 1</i>	NM_0026 66	F: 5'- GAGACACTGCGGAATTTGC -3' R: 5'- ATCGAGAGAGGGTGTGGTC -3'	58,2	222
<i>Runx2</i>	AF00145 0	F: 5'- GCTGTTATGAAAAACCAAGT -3' R: 5'- GGGAGGATTTGTGAAGAC -3'	60	108
<i>OC</i>	NM_1991 73	F: 5'- ATGAGAGCCCTCACACTCCTC -3' R: 5'- GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC -3'	55	293
<i>Dlx5</i>	BC00622 6	F : 5'- CCAGAGAAAGAAGTGACCGA -3' R : 5'- CCTGTGTTTGTGTCAATCCC -3'	55	190

Les séquences d'amorces, les températures d'hybridation (Th), les longueurs des produits PCR correspondants et les numéros d'accèsion GenBank sont indiqués. C/EBP α : CCAAT/enhancer-binding protein alpha. Dlx5 : Distal less homeobox 5. F : Forward. IL-6: Interleukine 6. OC : Ostéocalcine. PLIN1: Périlipine 1. PPAR γ 2 : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2. PPIA : peptidylpropyl isomerase. R: Reverse. RNAPol2: ARN polymérase II. Runx2 : Runt-related transcription factor 2 ; Ywhaz : Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein.

Les membranes ont été sondées avec des anticorps contre les cibles suivantes pendant la nuit : anti-phospho-STAT3 (Tyr705 ; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-STAT 3 (D3Z2G ; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-Actin (A2066, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) et anti-Perilipin (D1D8 ; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). L'immunoglobuline G conjuguée à la peroxydase de raifort (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) a été utilisée comme anticorps secondaire.

Les membranes ont été développées en utilisant le substrat du réactif de détection Amersham ECL Prime Western Blotting (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) dans un imageur à chimioluminescence (Amersham Imager 600, GE Healthcare, Chicago, IL, USA). L'intensité des bandes a été mesurée en utilisant ImageQuant TL (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). L'actine a été utilisée comme contrôle interne pour la normalisation.

f. Analyses statistiques

Les variables catégorielles sont exprimées sous forme de nombres (pourcentage) et les variables continues sont exprimées sous forme de moyennes (écart type, ET ou erreur type de la moyenne, ETM). La normalité des résidus du modèle a été évaluée graphiquement et à l'aide du test du K^2 de D'Agostino

Toutes les expériences ont été répétées au moins trois fois. Le test de Wilcoxon-Mann Whitney et le test t de Student ont été utilisés en fonction de la distribution des données. Tous les tests statistiques seront bilatéraux avec un risque de première espèce de 5 %. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism, version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

II. Recherche clinique

a. Schéma des études et patients

L'étude TOFAT est une étude clinique pilote et prospective de 12 mois (NCT04175886) évaluant l'effet du Tofa sur l'adiposité médullaire, la DMO et la composition corporelle chez des patients atteints de PR.

Les principaux critères d'inclusion sont : (i) les patients remplissant les critères de classification ACR/EULAR 2010 de la PR[253], (ii) âge \geq 18 ans et (iii) une indication à initier le Tofa.

Les principaux critères de non inclusion sont : corticothérapie $>$ 10 mg/jour ; patients ayant été traités par plus de 3 anti-TNF α ; patients ayant été traités par plus de 3 biothérapies (non anti-TNF α compris) ; patients ayant déjà été traités par JAKi ; patients suivant ou envisageant de suivre un régime restrictif pendant la période d'étude ; patients entreprenant ou prévoyant d'entreprendre un programme d'exercice physique intense ; antécédents de traitement à action osseuse tels que les bisphosphonates ; poids $>$ 160 kg et toute contre-indication à l'IRM. Chez les patients qui recevaient des biothérapies, une période d'élimination de 5demi-vies était requise entre l'interruption des biothérapies et l'inclusion dans l'étude.

L'étude TOFAT devait inclure 38 patients, mais a été interrompue prématurément en raison des résultats de l'étude ORAL Surveillance [63]. Seuls 10 patients ont été inclus et un participant a interrompu son traitement par Tofa avant 6 mois. Une évaluation à 6 mois a été possible pour 9 patients et une à 12 mois pour 2 patients.

L'étude cas-témoins RAFAT a ainsi succédé à l'étude TOFAT. Elle vise à comparer les patients atteints de PR à des témoins appariés pour le sexe, l'âge, l'IMC et le statut ménopausique. Les critères d'inclusion et de non inclusion étaient identiques à ceux de TOFAT à l'exception d'un point. Si les patients étaient traités par une biothérapie, celle-ci n'était pas interrompue avant l'inclusion dans l'étude RAFAT.

b. Aspects éthiques et réglementaires

Le protocole des études TOFAT et RAFAT a été approuvé par un comité de protection des personnes (respectivement 2019-001159-37, 2021-A03187-34), et les procédures des études étaient conformes aux normes éthiques des comités d'éthique de l'expérimentation humaine institutionnels et nationaux concernés (référence CPP 40/19 et 2021/0845). Tous les patients ont fourni un consentement éclairé écrit. Les études TOFAT et RAFAT ont été financées par une bourse de recherche de Pfizer. Le laboratoire Pfizer n'est pas intervenu dans la conception des études, la collecte des données, les analyses, l'article publié et la rédaction de ce manuscrit.

c. Évaluation clinique

Les caractéristiques démographiques et cliniques ont été relevées, notamment le score d'activité DAS28-CRP, l'utilisation actuelle de csDMARDs, d'une biothérapie (pour l'étude RAFAT) et d'une corticothérapie, ainsi que l'activité physique à l'aide de *l'International Physical Activity Questionnaire-Short Form* (IPAQ-SF), la force musculaire par le test de préhension, la sarcopénie par le score de dépistage SARC-F et les performances musculaires par le SPPB et le test du « Get up and Go ». L'utilisation antérieure de DMARDs a également été enregistrée dans ces 2 études. Le statut sarcopénique a été défini selon les critères de l'EWGSOP2 datant de 2019 [227].

d. Mesures de la DMO et de la composition corporelle par DXA

La DMO des patients atteints de PR et des témoins a été mesurée au niveau du rachis lombaire (L1-L4) et à la hanche non dominante avec le même appareil (HOLOGIC Horizon W S/N 300869M) pour les études TOFAT et RAFAT.

Tous les patients atteints de PR ont eu une mesure de la composition corporelle sur la même machine (HOLOGIC Horizon W S/N 300869M). Les masses grasseuse, maigre et osseuse pour le corps total et par région (bras, jambes et tronc) ont été mesurées et analysées à l'aide du logiciel validé par le fabricant (version 13.6.0.5). Le pourcentage de graisse corporelle (PBF, %) a été calculé tout comme la masse maigre appendiculaire (ALM, en kg) et la VAT (cm²).

e. Mesures des paramètres biologiques

Des échantillons de sang à jeun (au moins 8 heures) ont été obtenus avec dosage du bilan lipidique. Les CTX sériques ont été mesurés par dosage par chimioluminescence à l'aide de l'analyseur automatisé multidisciplinaire IDS- iSYS (Immunodiagnostic Systems, Inc., Fountain Hills, AZ). Les concentrations plasmatiques de leptine ont été mesurées par ELISA en utilisant le kit E07 fourni par Mediagnost (Reutlinger, Allemagne).

f. Mesures de l'adiposité médullaire par IRM

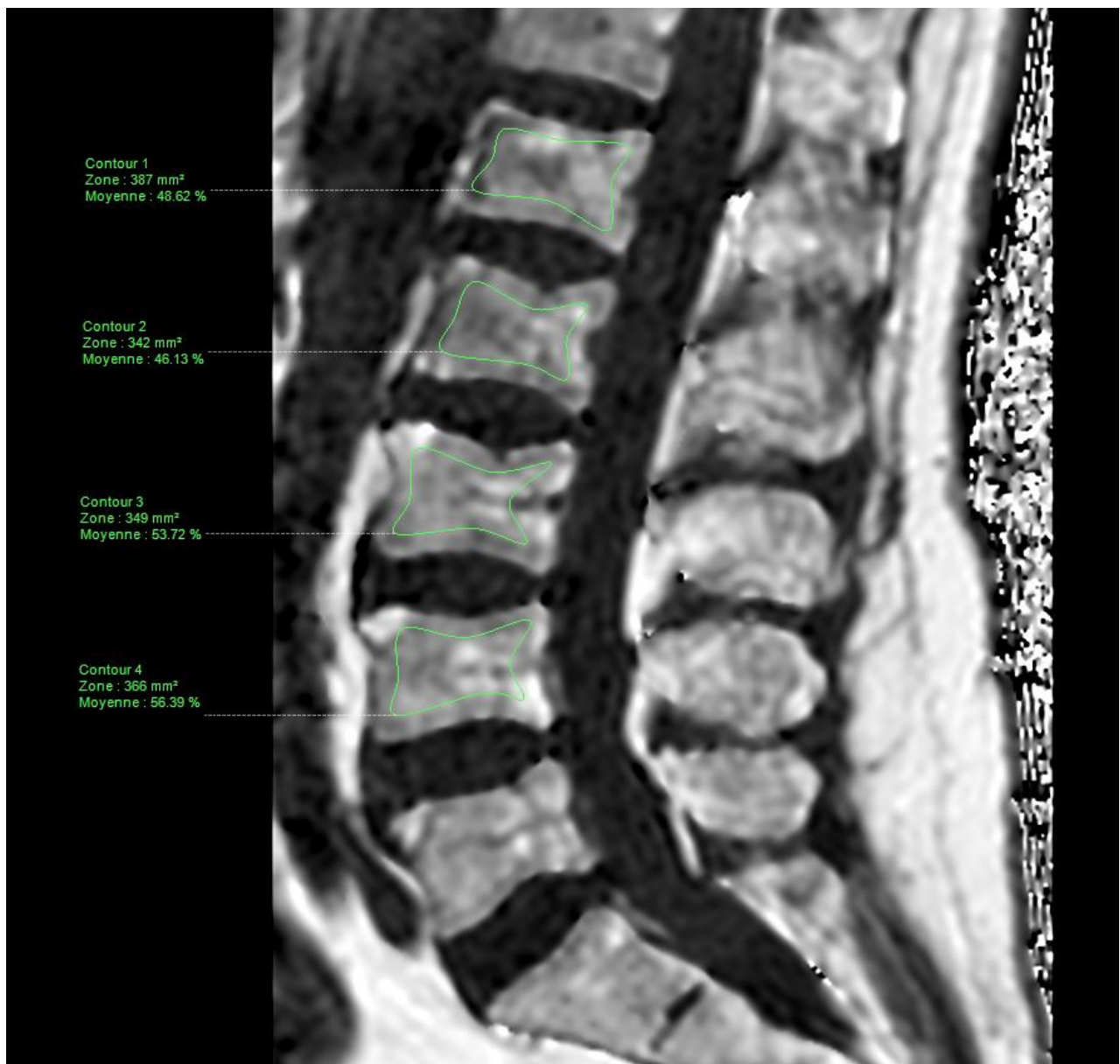
i. Acquisition des images

Tous les sujets des études TOFAT et RAFAT ont bénéficié d'une IRM 3 Tesla (Ingenia ; Philips Healthcare, Best, Pays-Bas) en utilisant l'antenne *body* intégrée (12 canaux) et une antenne *torso* antérieure (16 canaux), sous la supervision d'un radiologue ostéoarticulaire. Un protocole d'imagerie conventionnel a été réalisé dans un premier temps, comprenant des acquisitions Dixon-2point TSE (turbo-spin écho) pondérées en T1 et T2 et obtenues dans le plan sagittal, suivies d'une acquisition optionnelle pondérée en T2 TSE dans le plan axial en fonction des renseignements cliniques et des constatations initiales.

Immédiatement après cette exploration morphologique, la quantification de l'adiposité médullaire ou fraction grasseuse (*Proton Density Fat Fraction*, PDFF) a été réalisée à l'aide d'une séquence d'écho de gradient tridimensionnelle à six échos (mDixon-Quant ; Philips Healthcare, Best, Pays-Bas), permettant une séparation eau-graisse basée sur le codage du déplacement chimique au niveau du rachis lombaire (acquisition primaire dans le plan sagittal). Les paramètres d'imagerie étaient les suivants : temps de répétition (TR)/temps d'écho (TE)/ ΔTE : 11/1,43/1,1 ms ; champ de vision (FOV) : 220 x220 mm ; taille du voxel : 1,8 x 1,8 mm ; épaisseur de la tranche : 3 mm ; nombre d'excitations : 1 ; pas d'accélération SENSE ; direction de repli : crânio-caudale ; largeur de bande : 1563 Hz et durée du balayage : 1 min 41 s. Dans les deux cas, un faible angle de bascule de 3° a été utilisé pour minimiser le biais T1 [254].

ii. Quantification de l'adiposité médullaire

Un radiologue ostéoarticulaire a revu tous les examens sur une station de travail dédiée (IntelliSpace Porta ; Phillips Healthcare, Best, Pays-Bas). Une évaluation morphologique systématique a d'abord été effectuée, à la recherche de vertèbres de transition lombosacrées, de changements dégénératifs et de lésions de remplacement de la moelle osseuse. Sur la base des 3 coupes sagittales les plus importantes acquises à l'aide de la séquence mDixon-Quant, des régions d'intérêt polygonales (ROI polygonales) ont été dessinées dans le corps vertébral de L1 à L4, en évitant l'os sous-chondral, les lésions de remplacement, les changements dégénératifs sévères et la veine basivertébrale (**Figure 9**). Pour chaque sujet, une PDFF moyenne a été calculée comme une moyenne de toutes les valeurs mesurées dans la colonne lombaire, de L1 à L4.



**Figure 9 Contourage de la fraction grasseuse aux vertèbres lombaires
en IRM**

g. Analyses statistiques

Les variables qualitatives sont décrites par les effectifs et les pourcentages. Les variables quantitatives sont décrites par la moyenne et l'écart type en cas de distribution gaussienne, ou par la médiane et l'interquartile (c.-à-d. 25e et 75e percentiles) dans le cas contraire. La normalité des distributions a été testée par un test du K^2 de D'Agostino et vérifiée graphiquement par des histogrammes.

Pour l'étude TOFAT, les changements des variables ont été examinés au cours du traitement en comparant les valeurs de base et les valeurs à 6 mois à l'aide d'un test t apparié. En cas d'écart à la normalité, les comparaisons entre les cas et les témoins appariées ont été réalisées par un test des rangs signés de Wilcoxon.

Pour l'étude RAFAT, la comparaison des variables entre les patients avec une PR et les sujets témoins appariés a été réalisée à l'aide d'un test de Student apparié. La différence moyenne (cas versus témoins) a été calculée comme taille d'effet avec son intervalle de confiance bilatéral à 95 %. En cas d'écart à la normalité, les comparaisons entre les cas et les témoins appariées ont été réalisées par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Tous les tests statistiques sont bilatéraux avec un risque de première espèce de 5 %. Les données ont été analysées à l'aide du progiciel GraphPad Prism, version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Résultats et Discussion

I. Évaluation de l'effet du tofacitinib sur les tissus osseux et adipeux dans la PR

a. Résultats

i. Effet du Tofa sur la viabilité cellulaire des ostéoblastes et des adipocytes médullaires

Dans le cadre de cette étude exploratoire, nous avons, tout d'abord, évalué si la viabilité cellulaire des Ob et des Ad med à 3 jours de différenciation était affectée par la concentration de Tofa utilisée dans cette étude (200, 400 et 800 nM). Chez les Ad med, aucune différence de viabilité cellulaire en conditions non inflammatoires et inflammatoires n'a été observée, quelle que soit la concentration de Tofa testée. Chez les Ob en conditions non inflammatoires, le Tofa n'a pas non plus entraîné de modifications de la viabilité cellulaire par rapport à l'Ob contrôle (Ctrl). Par contre, en condition inflammatoire, le TNF α seul, a entraîné une diminution de la viabilité cellulaire des Ob par rapport à l'Ob Ctrl. Cette diminution de la viabilité cellulaire n'est plus observée après l'addition du Tofa dans le milieu de culture, suggérant une action positive du Tofa sur la viabilité des ostéoblastes en conditions inflammatoires (**Figure10**).

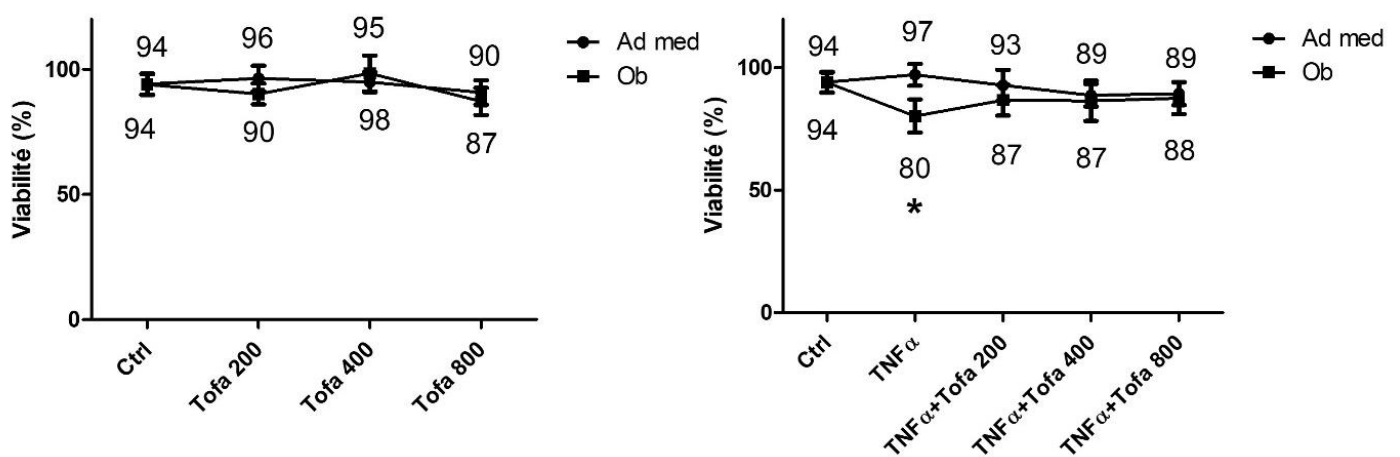


Figure 10 : Effet du tofacitinib et du TNF α sur la viabilité cellulaire des hCSMs.

Les hCSMs ont été mis en milieu de différenciation adipocytaire et ostéoblastique avec du Tofa (200, 400, 800 nM) et du TNF α (1ng/mL). La viabilité cellulaire a été évaluée par la méthode WST-1 et le pourcentage de viabilité est indiqué au-dessus et en dessous des points qui représentent les moyennes avec les écarts-types à partir de 4 expériences. Ad med : Adipocytes médullaires. Ctrl : contrôle. hCSMs : Cellules stromales humaines issues de la moelle osseuse. Ob : ostéoblastes. * $p < 0,05$ par rapport au groupe contrôle (test de Wilcoxon-Mann-Whitney).

ii. Effet du Tofa sur les différenciations ostéoblastique et adipocytaire en condition non inflammatoire

Pour déterminer l'effet du Tofa sur l'engagement cellulaire, l'analyse de l'expression génique de marqueurs spécifiques des différenciations adipocytaire et ostéoblastique a été réalisée. Les résultats de l'analyse de RT-PCR en temps réel sont présentés en expression relative du niveau d'ARNm dans le groupe traité par Tofa par rapport au contrôle (groupe non traité).

En condition non inflammatoire, le Tofa diminue significativement le niveau d'expression de Runx2 à des concentrations de 400 et 800 nM et Dlx5 à toutes les concentrations de Tofa utilisées (deux facteurs de transcription clés de la différenciation ostéoblastique) par rapport aux Ob Ctrl ($p < 0,05$) (**Figure 11A**). En revanche, aucun effet du Tofa n'a été observé sur les niveaux d'expression génique de l'ostéocalcine (**Figure 11A**).

Au contraire, les Ad med traités par Tofa présentent une augmentation de l'expression génique de PPAR γ 2, C/EBP α (deux facteurs de transcriptions clés de la différenciation adipocytaire) et de PLIN1 (Pénilipine 1, un marqueur spécifique des gouttelettes lipidiques), par rapport aux Ad med contrôles. Cette augmentation a été observée dès 200nM de Tofa pour chaque marqueur analysé (**Figure 11B**). Cette augmentation de l'expression de PLIN1 a été confirmée au niveau protéique chez des Ad med à 9 jours de différenciation adipocytaire, quelle que soit la concentration de Tofa utilisée.

En condition non inflammatoire, le Tofa a un effet limité sur la différenciation ostéoblastique et un effet stimulant sur la différenciation adipocytaire.

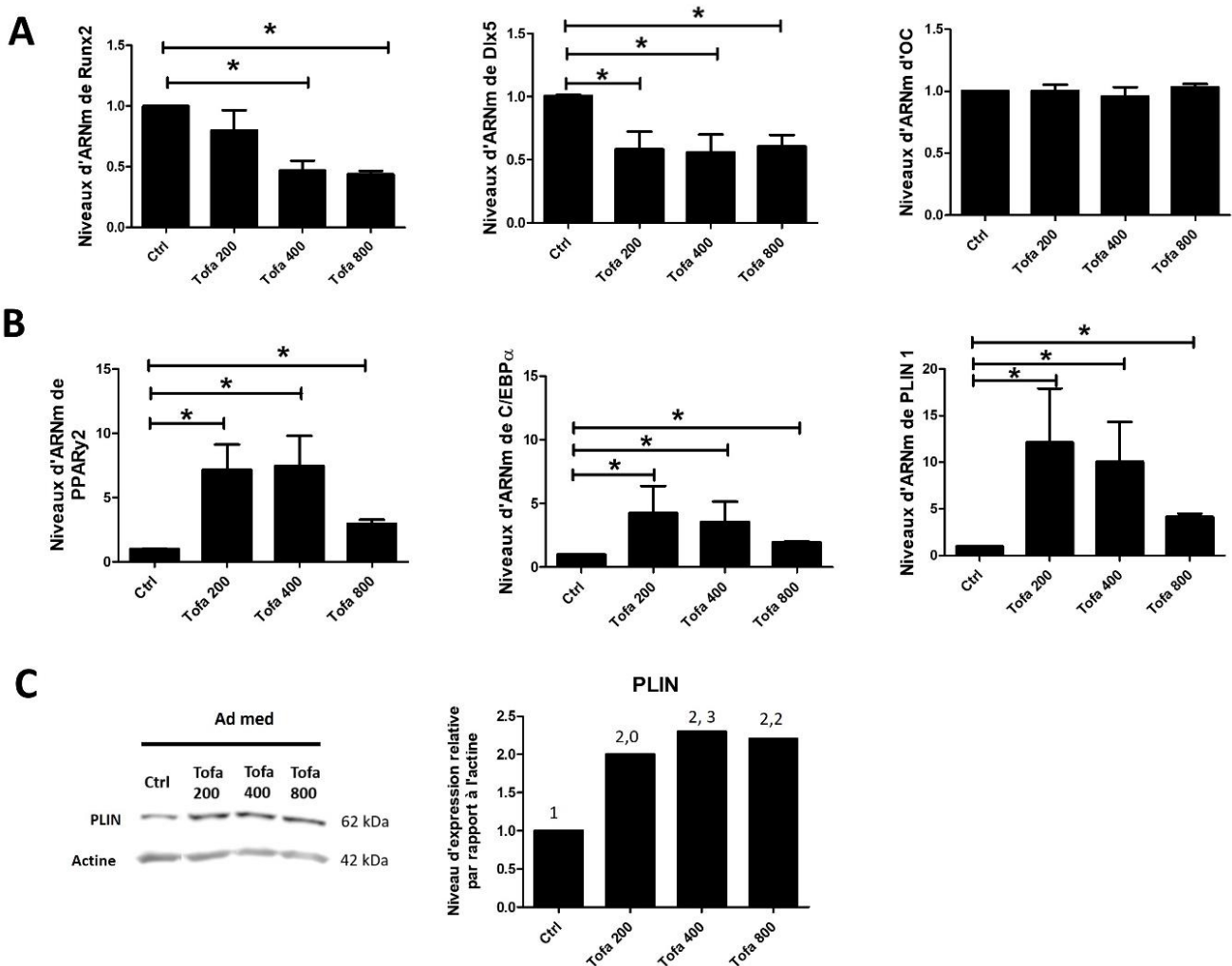


Figure 11 : Effets du Tofa sur la différenciation adipocytaire et ostéoblastique en condition non inflammatoire.

Les Ob et les Ad med ont été différenciés à partir d'hCSMs traités par Tofa (200, 400, 800nM) pendant 3 jours. Ctrl : Ob et Ad med non traités. (A, B) Analyse en RT-PCR quantitative de l'expression de gènes spécifiques des Ob (A) et des Ad med (B) à 3 jours de différenciation. Les données sont présentées par moyenne et erreur standard de la moyenne. La significativité statistique a été calculée à l'aide du test de Wilcoxon-Mann-Whitney (* $p < 0,05$). (C) Analyse protéique de Périlipine par western blot d'hCSMs à 9 jours différenciation adipocytaire traités par le Tofa à 200, 400 et 800 nM. L'actine correspond au témoin de charge. La quantification protéique a été calculée par le rapport Périlipine/Actine. Ad med : Adipocytes médullaires. Ctrl : contrôle. hCSMs : Cellules stromales humaines issues de la moelle osseuse. Ob : ostéoblastes. OC : ostéocalcine. PLIN : Périlipine.

iii. Effet du Tofa sur les différenciations ostéoblastique et adipocytaire en condition inflammatoire

Comme attendu, l'ajout du TNF α stimule l'expression de cytokines pro-inflammatoires chez les Ad med et les Ob. L'expression génique d'IL-6 est augmenté de plus de 300 fois chez les Ad med traités par TNF α et de 9 fois chez les Ob traités par TNF α , comparés aux Ctrl (non traités par TNF α) (**Figure 12A**).

Le TNF α a également un effet sur la différenciation ostéoblastique et adipocytaire, avec une diminution significative de Runx2 (40 %), Dlx5 (62 %), l'ostéocalcine (62 %) (**Figure 12B**) et de PPAR γ 2 (83,5 %), C/EBP α (80 %) et PLIN1 (97 %) (**Figure 12C**). L'ajout du Tofa au TNF α dans le milieu de culture n'a pas modifié le profil d'expression des Ob comparés aux Ob traités seulement par TNF α (**Figure 12B**). Au contraire, l'analyse de l'expression génique de PPAR γ 2 a montré que l'ajout du Tofa limitait l'effet négatif du TNF α sur la différenciation adipocytaire (**Figure 12C**). En effet, des niveaux d'expression de PPAR γ 2 de 4, 2,5 et 1,3 fois ont été mesurés chez les adipocytes traités respectivement par le Tofa à 200, 400 et 800 nM, par rapport aux adipocytes traités seulement par le TNF α .

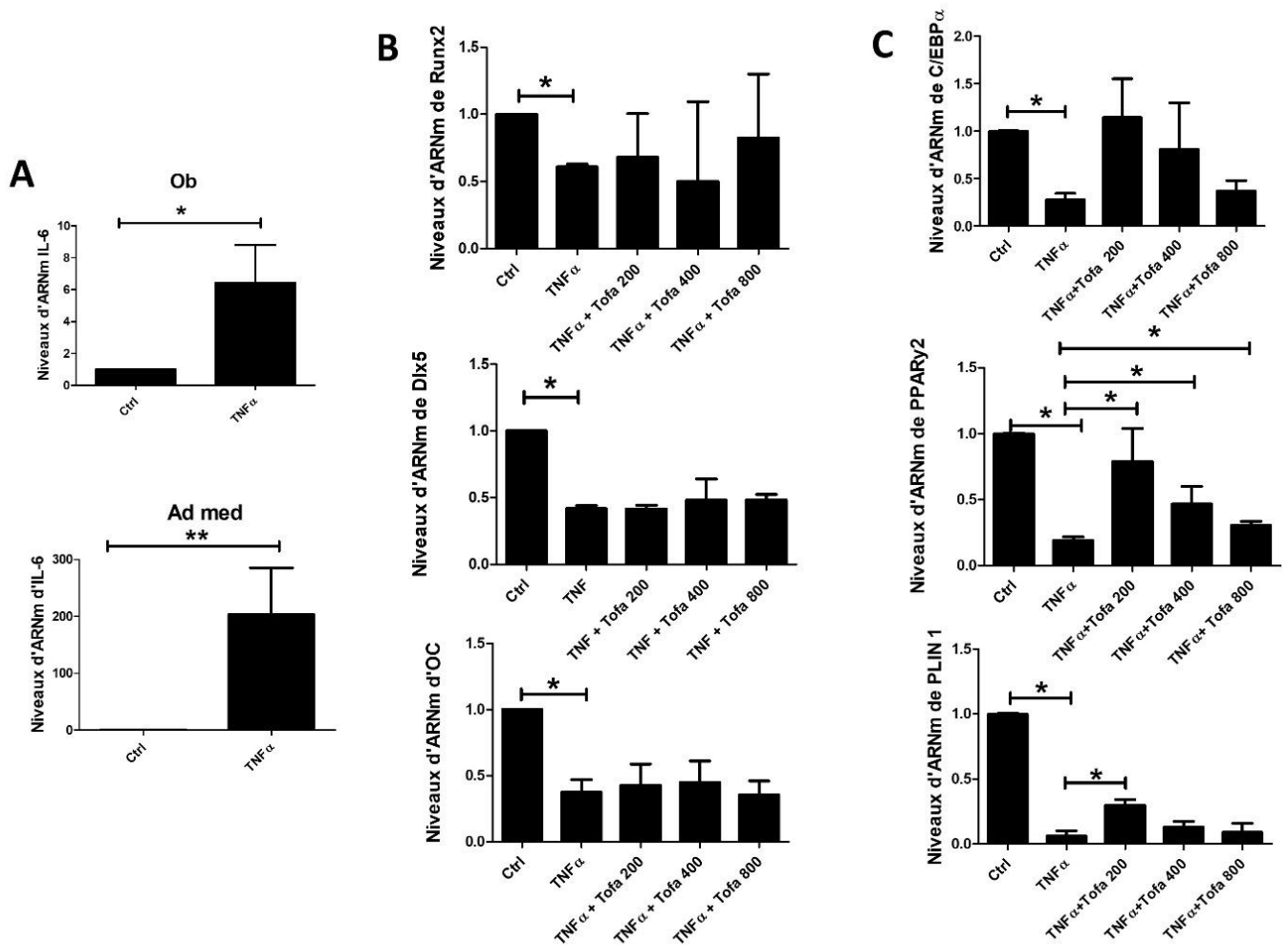


Figure 12 : Effet du Tofa sur la différenciation ostéoblastique et adipocytaire en condition inflammatoire.

Les Ob et les Ad med ont été différenciés à partir d'hCSMs traitées par Tofa (200, 400, 800nM) et TNF α (1 ng/mL) pendant 3 jours. Ctrl : Ob et Ad med non traités (A-C) Analyse en RT-PCR quantitative d'IL-6 (A), et de gènes spécifiques des Ob (B) et des Ad med (C) à trois jours. Les données sont présentées par moyenne et erreur standard de la moyenne. La significativité statistique a été calculée à l'aide du test de Wilcoxon-Mann-Whitney (*p<0,05). Ad med : Adipocytes médullaires. Ctrl : contrôle. hCSMS : Cellules stromales humaines issues de la moelle osseuse. Ob : ostéoblastes.

iv. Effet du Tofa sur les adipocytes médullaires matures en condition inflammatoire

Compte tenu des résultats précédents, nous avons choisi d'évaluer l'action du Tofa chez des Ad med après 14 jours de différenciation (adipocytes matures) suivis de 6 jours de traitement par TNF α et du Tofa. Auparavant, l'effet du TNF α et du Tofa sur la viabilité cellulaire a été étudié et aucune différence n'a été observée par rapport à des Ad med traités seulement par TNF α (**Figure 13A**).

Afin d'évaluer l'effet du Tofa, les images de microscopie optique d'Ad med traités par TNF α et du Tofa à 200, 400, 800nM ont été analysées et la densité des Ad med a été déterminée (nombre d'Ad med/nombre de cellules totales). Tout d'abord, nous avons observé une modification du phénotype avec une diminution de la densité adipocytaire en réponse au traitement par TNF α . En effet, le TNF α induisait une conversion phénotypique des Ad med vers un phénotype de type fibroblastique avec une diminution drastique de la surface adipocytaire ($p < 0,001$) et de la surface des gouttelettes comparés aux Ad med Ctrl (**Figure 13B**). L'addition du Tofa au milieu de culture a limité la conversion phénotypique et a maintenu une densité adipocytaire proche de celle des Ctrl (Ad med non traités) avec un effet dose-dépendant (**Figure 13C**). La surface des Ad med a été également mesurée et une diminution a été observée à 200 nM ($p < 0,01$), mais pas à 400 ou à 800nM de Tofa (**Figure 13D**).

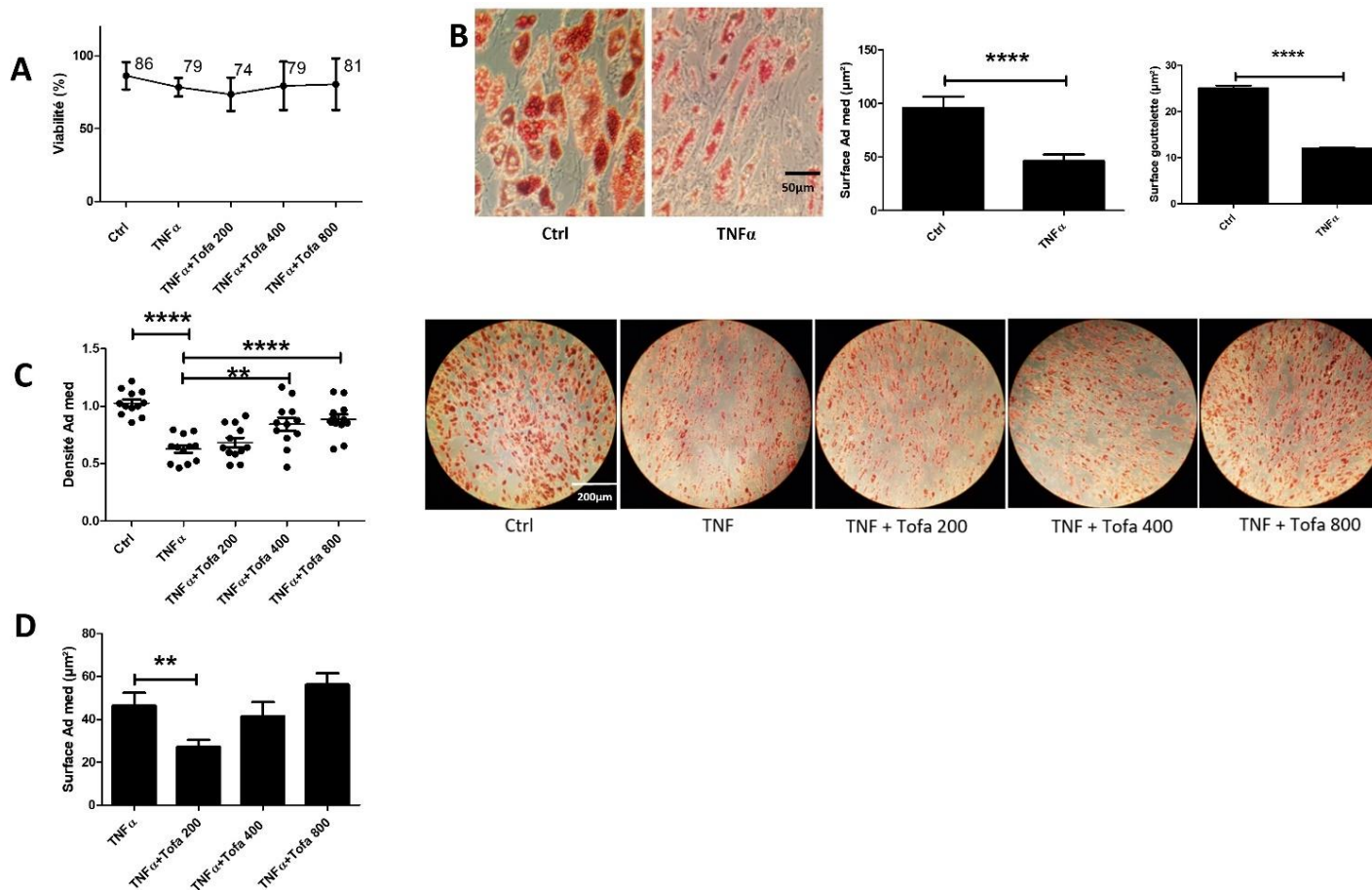


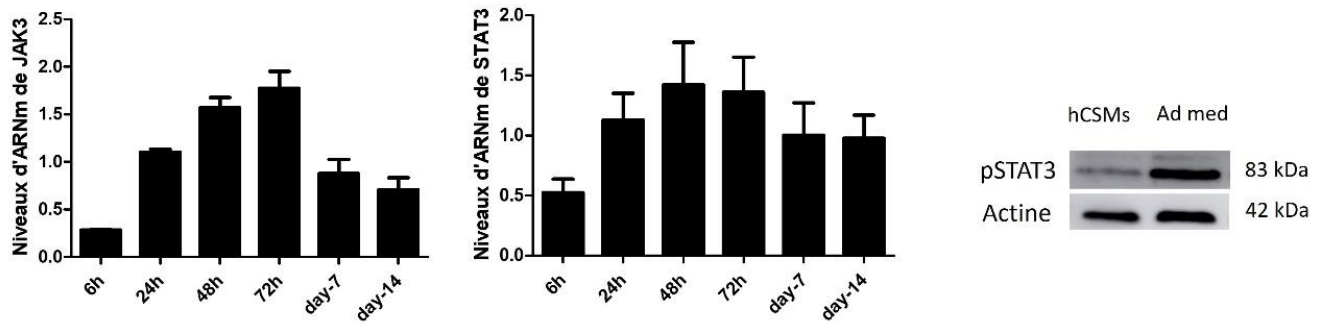
Figure 13 : Effet du Tofa sur des Ad med matures en condition inflammatoire

Les Ad med ont été différenciés à partir d'hCSMs pendant 14 jours puis ont été traités par TNF α avec plus ou moins du Tofa pendant 6 jours. **(A)** La viabilité cellulaire a été évaluée par la méthode WST-1 et le pourcentage de viabilité est indiqué au-dessus et en dessous des points qui représentent les moyennes avec les écarts-types à partir de 4 expériences. **(B)** Images représentatives de l'effet du TNF α sur l'adipogénèse, visualisé par la présence d'Oil Red O dans les vacuoles lipidiques (rouge). Quantification de la surface adipocytaire et de celle des gouttelettes (μm^2) après traitement par TNF α . **(C)** Quantification du nombre d'Ad med (nombre d'Ad med/nombre de cellules totales) et **(D)** de la surface adipocytaire après traitement par TNF α et Tofa. **(B-D)** La significativité statistique a été calculée par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney pour les variables non paramétriques et un test de Student pour les variables paramétriques (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$). Ad med : Adipocytes médullaires. Ctrl : contrôle. hCSMs : Cellules stromales humaines issues de la moelle osseuse. Ob : ostéoblastes.

v. Effet du Tofa sur la phosphorylation de STAT3 chez les adipocytes médullaires

Bien que le Tofa soit un inhibiteur préférentiel de JAK1 et JAK3 et inhibe la phosphorylation de STAT1 et STAT3, nous nous sommes intéressés spécifiquement au profil de phosphorylation de STAT3 (pSTAT3) après trois jours de différenciation des hCSMs. En effet, la voie de signalisation JAK3/STAT3 est activée lors de la différenciation adipocytaire et est associée à une activation du profil d'expression de pSTAT3 (**Figure 14A**). Le niveau d'expression de JAK1/STAT1 est lui stable pendant la différenciation et est similaire à celui retrouvé chez les hCSMs (**Annexe VI**). En revanche, l'étude par western-blot du niveau d'expression protéique de pSTAT3, après traitement des Ad med matures par le Tofa, a montré une forte diminution de son expression chez les Ad med comparés aux Ctrl (cellules non traitées), suggérant un rôle potentiel de STAT3 dans l'expansion du tissu adipeux médullaire (**Figure 14B**).

A



B

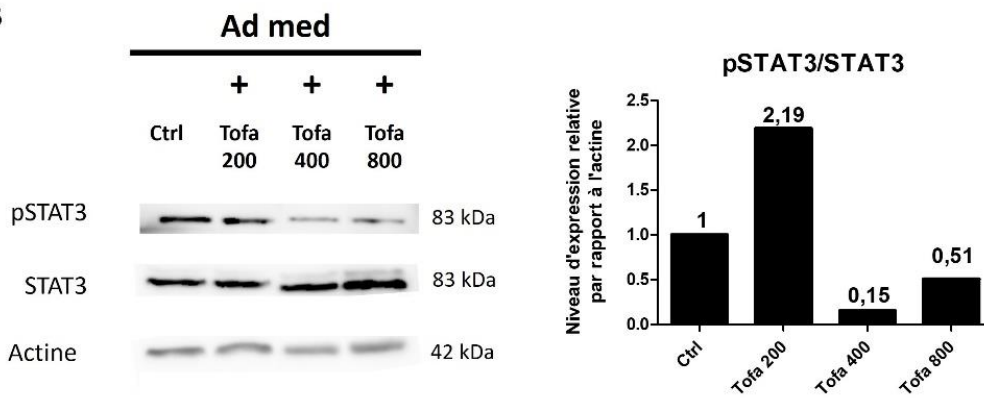


Figure 14 : Analyse du profil de pSTAT3 chez les Ad med

Analyse en RT-PCR quantitative de JAK3 et STAT3 (A) pendant la différenciation adipocytaire par rapport au jour 0 (confluence des hCSMs). L'activité de STAT3 (pSTAT3) durant la différenciation adipocytaire a été analysée par western blot. Les Ad med ont été différenciés pendant 48 heures dans un milieu de différenciation adipogénique et comparés à des hCSMs. (B) L'analyse des western blot a été utilisée pour déterminer l'expression relative pSTAT3/STAT3 chez les Ad med après 48 heures de différenciation et traitement pendant 3 jours par Tofa (200, 400, 800 nM). L'actine a servi de témoin de charge. Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Ad med= Adipocytes médullaires. Ctrl : contrôle. hCSMs : cellules stromales humaines Ob : ostéoblastes.

b. Discussion

Plusieurs études ont rapporté un risque accru de perte osseuse et de fractures chez les patients atteints de PR[255]. Le Tofa pourrait avoir des effets bénéfiques sur le tissu osseux, qui pourraient être dus à des effets directs sur le microenvironnement osseux et ne pas reposer exclusivement sur sa fonction anti-inflammatoire. Dans l'ostéoporose, de nombreuses études *in vitro* et cliniques ont démontré que la perte osseuse était liée à une augmentation de l'adiposité médullaire qui pourrait s'expliquer par une différenciation privilégiée des hCSMs vers la voie adipocytaire au détriment de la voie ostéoblastique [256–261]. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la capacité du Tofa à favoriser l'engagement des hCSMs vers l'une ou l'autre des voies de différenciation afin de déterminer un effet positif ou non du Tofa sur le tissu osseux.

Tout d'abord, le manque de données sur ce sujet nous a conduits à explorer l'influence du Tofa dans des conditions non inflammatoires. Les résultats aux niveaux cellulaire et moléculaire ont révélé que le Tofa favorise la différenciation adipocytaire, même à de faibles concentrations, mais inhibe la différenciation ostéoblastique après 3 jours de traitement. Le Tofa a un début d'action rapide, puisque l'effet du Tofa sur les Ad med et la différenciation des Ob a été observé dès 3 jours de traitement.

De façon concomitante à notre travail, un effet stimulant du Tofa sur les Ad med différenciés a également été rapporté sur des cellules primaires de moelle osseuse humaine isolées de patients subissant une chirurgie orthopédique [262]. Dans cette étude, Russell *et al.* ont rapporté une augmentation du nombre d'Ad med issus des hCSMs à 14 ou 21 jours de différenciation traités par Tofa [262].

Au vu de ces résultats, révélant un effet positif du Tofa sur l'engagement des hCSM vers la voie adipocytaire, nous avons recherché l'origine de l'expansion du tissu adipeux traité par Tofa. Cette question, également soulevée par Russell *et al.*, a trouvé une réponse dans les expériences menées dans notre étude. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la surface des Ad med et aux nombres d'Ad med puisque l'expansion du tissu adipeux résulte soit d'une augmentation de la taille des Ad med différenciés (hypertrophie adipocytaire) et/ou soit d'une augmentation de la formation de nouveaux Ad med (hyperplasie adipocytaire). Ainsi, les mesures de la surface des Ad med n'ont pas montré d'augmentation de la surface des cellules sous Tofa, mais en revanche le nombre d'Ad med a été augmenté pour les plus fortes concentrations de Tofa (400 et 800 nM). Ces nouveaux résultats confirment que le Tofa participe à l'expansion du tissu adipeux en recrutant davantage de préadipocytes et en activant leur différenciation. Par conséquent, nous pouvons également conclure que l'augmentation de l'expression de la protéine PLIN observée par western blot est donc liée à l'apparition de nouveaux Ad med plutôt qu'à l'augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques dans les Ad med déjà formés.

Cet effet du Tofa sur les Ad med pourrait être médié par l'inactivation de STAT3, une des principales cibles du Tofa. Cependant, il a été démontré dans différentes études que STAT3 était plutôt un facteur pro-adipogénique [263,264]. Toutefois, son inactivation à un stade très précoce de la différenciation adipocytaire pourrait retarder l'arrêt de la prolifération cellulaire et donc augmenter le nombre de préadipocytes.

Dans un autre modèle *in vitro*, un traitement de cellules par le Tofa a également entraîné une action hors cible, ce qui sous-entend une grande complexité dans sa signalisation [265,266]. Par conséquent, des études supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre le mécanisme qui induit une augmentation de l'adipogenèse sous Tofa.

Deuxièmement, pour se rapprocher le plus possible des conditions inflammatoires de la pathologie, nous avons ajouté au milieu de culture du TNF α . De nombreuses études se sont intéressées à l'effet du TNF α sur le phénotype ostéoblastique et ont montré l'effet délétère de cette molécule sur la différenciation, caractérisé par une diminution drastique des facteurs de l'Ob tels que Runx2 ou Dlx5 [267]. Cependant, même lorsque les niveaux d'expression génique de Runx2/Dlx5 étaient abaissés par l'effet du TNF α , le Tofa n'était pas en mesure de limiter l'action du TNF α et de stimuler Runx2 ou Dlx5 comme dans les conditions non inflammatoires. Ces résultats confirment ceux très récemment publiés et s'opposent à l'effet anabolique osseux décrit antérieurement dans la littérature [214,268]. En effet, Russell *et al.* ont observé que le Tofa n'affectait pas la différenciation ostéoblastique à 14 jours, évaluée par l'activité ALP et l'accumulation de calcium[262]. De même, les expériences de Gaber *et al.* n'ont pas révélé de changements dans l'expression génique des marqueurs ostéoblastiques dans les hCSMs traitées par Tofa après 7 jours de différenciation ostéoblastique, cultivées dans des conditions standard. Une augmentation de l'expression de Runx2 a été observée uniquement dans des conditions hypoxiques [268]. Les auteurs précisent que l'hypoxie favorise l'ostéogenèse dans leur modèle via l'expression du *Hypoxia-inducible factor* (HIF-1)[269].

Cependant, le Tofa semble atténuer l'effet délétère du TNF α sur la viabilité cellulaire des hCSMs placées en milieu ostéogénique. Dans une étude récente et dans un contexte différent, l'effet protecteur du Tofa sur la viabilité cellulaire a également été rapporté [270]. Les auteurs ont utilisé un modèle de cellules épithéliales de l'intestin grêle de rat normal induit par la privation d'oxygène-glucose/réoxygénation (OGD/R) pour simuler l'environnement physiologique de la lésion I/R intestinale, traité ou non par Tofa. Les résultats ont montré que le Tofa exerçait des effets protecteurs sur le stress oxydatif et l'inflammation dans ces cellules, mais aussi sur l'apoptose au cours de l'OGD/R. Cet effet pourrait être médié par l'action du Tofa sur le stress oxydatif et l'inflammation. Il pourrait être aussi induit par l'inhibition de la voie JAK/STAT3 puisque l'utilisation d'un agoniste de cette voie a partiellement abrogé l'effet bénéfique du Tofa.

Une des limites de notre étude *in vitro* est l'utilisation de hCSMs obtenues à partir de donneurs sains et traitées avec du TNF α , ce qui ne reflète que partiellement la pathologie. Il serait intéressant de valider ces résultats en utilisant des hCSMs collectées chez des patients atteints de PR.

II. Effet du Tofa sur l'adiposité médullaire, la densité minérale osseuse et la composition corporelle

a. Résultats

Les caractéristiques initiales des patients inclus dans **TOFAT** sont dans le **Tableau 5**. Cette étude a inclus 10 patients, dont 9 avec un suivi disponible à six mois. Deux patients ont bénéficié d'une évaluation à 12 mois (données non présentées). L'âge moyen de ces 10 patients inclus était de $56,1 \pm 11,3$ ans et la durée moyenne d'évolution de la maladie était de $5,7 \pm 5,7$ ans. Six patients étaient sous prednisone avec une posologie inférieure à 10 mg/jour (moyenne de $6,5 \pm 2,7$ mg/jour). Deux patients avaient bénéficié antérieurement d'une biothérapie (une avait reçu de l'abatacept et l'autre patient de l'adalimumab puis du tocilizumab). Six patients avaient au moins deux facteurs de risque cardiovasculaire. D'un point de vue osseux, six patients avaient un antécédent de corticothérapie prolongée et une patiente un antécédent familial de fracture de l'extrémité supérieure du fémur chez un apparenté du 1^{er} degré. La majorité des patientes incluses étaient ménopausées (4/5).

Après six mois de traitement par Tofa, il n'était pas noté de différence significative concernant les indices d'activité de la maladie (NAD, EVA activité, DAS 28-CRP et CRP). La diminution du nombre d'articulations gonflées était à la limite de la significativité ($p=0,06$). Le nombre de patients sous corticoïdes diminuait à 6 mois avec 4 patients sur 5 ayant pu être sevrés (**Tableau 6**).

Il n'était pas noté de modification significative après 6 mois de traitement par Tofa pour la DMO à la hanche (col fémoral et hanche totale). La DMO au rachis lombaire tendait à diminuer ($p=0,057$). Il n'était pas observé également de modification significative pour le Trabecular Bone Score (TBS) ni pour les CTX sériques (**Tableau 7**).

Tableau 5 : Caractéristiques initiales des patients

Patients	N=10
Âge, ans	56,1 ± 11,3
Genre, femme (%)	5/10 (55,5)
Indice de Charlson	1,2 ± 1,5
Présence de Facteurs rhumatoïdes, n (%)	7/10 (70)
Présence d'Anticorps anti-Peptides Citrullinés, n (%)	6/10 (60)
Présence d'érosions, n (%)	6/10 (60)
Durée d'évolution de la maladie, ans	5,7 ± 5,7
Corticothérapie actuelle, n (%)	6/10 (60)
Dose actuelle de la corticothérapie, mg/jour	6,5 ± 2,7
Prise actuelle de méthotrexate, n (%)	2/10 (20)
Patients traités antérieurement par biothérapies, n (%)	2/10 (20)
Antécédents familiaux de fracture de l'extrémité supérieure du fémur chez un apparenté du 1 ^{er} degré	1/10 (10)
Antécédent de diabète	0/10
Tabagisme, n (%)	
Actif	3/10 (30)
Sevré	4/10 (30)
Jamais	3/10 (30)
Consommation d'alcool excessive (≥2 unités/j chez la femme et ≥ 3 unités chez l'homme)	0
Ménopause	4/5 (80)
Antécédent d'une corticothérapie prolongée (≥ 7,5 mg/j d'équivalent prednisolone et ≥ 3mois)	7/10 (70)
Apports calciques, mg/jour	607,3 ± 197,1
Antécédents familiaux au 1er degré de maladie cardiovasculaire	6/10 (60)
Hypertension artérielle, n (%)	3/10 (30)
Dyslipidémie, n (%)	2/10 (20)

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écarts-type ou en valeur absolue et pourcentage selon la variable. Antécédents familiaux au 1er degré de maladie cardiovasculaire, c'est-à-dire un infarctus du myocarde ou mort subite du père ou d'un frère avant 55 ans, ou de la mère ou d'une sœur avant 65 ans ; un accident vasculaire cérébral d'un parent du premier degré avant 45 ans.

Tableau 6 : Variations des paramètres inflammatoires chez les patients atteints de PR après 6 mois de traitement par Tofa

Patients	M0 N=9	M6 N=9	Différence absolue	p-value
Nombre d'articulations douloureuses	5,1 ± 6,4	2,2 ± 2,2	-2,9	0,11
Nombre d'articulations gonflées	7,1 ± 5,6	2,7 ± 3,4	-4,4	0,06
EVA maladie	44,4 ± 25,9	32,2 ± 19,7	-12,2	0,28
DAS 28-CRP	3,81 ± 1,19	2,83 ± 1,16	-0,98	0,10
CRP, mg/L	5,6 ± 6,1	4,4 ± 4,2	-1,2	0,37
Nombre de patients sous corticothérapie	5/9 (55,5)	1/9 (11,1)	-4	0,049

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type ou en valeur absolue et pourcentage selon la variable. DAS : Disease Activity Score. CRP : Protéine C Réactive

Tableau 7 : Variations des paramètres osseux chez les patients atteints de PR après 6 mois de traitement par Tofa

Patients	M0 N=9	M6 N=9	Différence absolue	p-value
DMO du rachis lombaire, g/cm ²	1,011 ± 0,142	0,996 ± 0,146	-0,015	0,057
T-score au rachis lombaire, D.S	-0,3 ± 1,5	-0,4 ± 1,5	-0,1	0,30
DMO du col fémoral, g/cm ²	0,728 ± 0,108	0,713 ± 0,095	-0,015	0,27
T-score au col fémoral, D.S	-1,2 ± 1,0	-1,4 ± 0,9	-0,2	0,12
DMO de la hanche totale, g/cm ²	0,902 ± 0,130	0,891 ± 0,105	-0,011	0,52
T-score à la hanche totale, D.S	-0,6 ± 1,1	-0,7 ± 0,9	-0,1	0,39
Trabecular Bone Score (TBS)	1,393 ± 0,111	1,389 ± 0,085	-0,004	0,91
CTX, pmol/L	2619 ± 1830	2712 ± 2196	-93	0,91

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type ou en valeur absolue et pourcentage selon la variable. CTX : Cross laps. DMO : Densité Minérale Osseuse. D.S : Écart-type.

Après 6 mois de traitement par Tofa, il était noté une amélioration significative de la force de préhension ($p=0,01$) et des performances physiques évaluées par le test « Get up and Go » ($p=0,02$). Il n'était pas observé de modification significative de la quantité musculaire. Deux patientes étaient sarcopéniques dont une sévère selon les critères de l'EWGSOP2 [227] à l'initiation du traitement par Tofa. Après 6 mois de traitement par Tofa, ces deux patientes n'étaient plus considérées comme sarcopéniques (**Tableau 8**).

Il n'était pas retrouvé de différence significative pour les paramètres anthropométriques (IMC, tour de taille, tour de hanche), ni pour les paramètres adipeux mesurés en composition corporelle (masse grasse totale, pourcentage de graisse corporelle, indice de masse corporelle), ni pour la leptine ou le bilan lipidique après 6 mois de traitement par Tofa. Seul le HDL-cholestérol tendait à augmenter. Au contraire, le PDFF était significativement augmentée passant de $46,3 \pm 7,0$ % à $53,2 \pm 9,2$ % à 6 mois ($p=0,008$) (**Tableau 9** et **Figure 15**).

Tableau 8 : Variations des paramètres musculaires chez les patients atteints de PR après 6 mois de traitement par Tofa

Patients	M0 N=9	M6 N=9	Différence absolue	p-value
Force de préhension, kg	22,5 ± 8,9	27,9 ± 14,0	+5,4	0,01
Short Physical Performance Battery (SPPB), côté sur 12	10,8 ± 2,4	11,1 ± 1,5	+0,3	0,59
SARC-F	1,7 ± 2	0,8 ± 1,4	-0,9	0,14
Activité physique en score continu selon IPAQ-SF, MET-minute/semaine	6203 ± 8461	7110 ± 4111	+907	0,49
Activité physique en score catégoriel selon IPAQ-SF, n (%)				0,53
Faible	2/9 (22,2)	0/9 (0)	-2	
Modérée	3/9 (33,3)	3/9 (33,3)	0	
Forte	4/9 (44,5)	6/9 (66,7)	+2	
Test « Get up and Go », secondes	9,6 ± 4,6	7,9 ± 3,3	-1,7	0,02
Maintien de la station unipodale	9/9 (100)	8/9 (88,9)	-1	1
Masse maigre totale, kg	40,9 ± 9,8	41,8 ± 10,1	+0,9	0,15
Indice de muscle squelettique, kg/m ²	14,3 ± 1,1	14,8 ± 1,7	+0,5	0,20
Masse maigre appendiculaire, kg	16,6 ± 4,5	16,7 ± 4,9	+0,1	0,50
Indice de masse appendiculaire, kg/m ²	5,7 ± 0,9	5,9 ± 1,0	+0,2	0,28
Patients sarcopéniques, n (%)	2/9 (22,2)	0/9 (0)	-2	0,47

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écarts-type ou en valeur absolue et pourcentage selon la variable. SARC-F : questionnaire pour évaluer la sarcopénie. IPAQ-SF : International Physical Activity Questionnaire - Short Form. MET : Metabolic Equivalent of Task.

Tableau 9 Variations des paramètres adipeux et du bilan lipidique chez les patients atteints de PR après 6 mois de traitement par Tofa

Patients	M0 N=9	M6 N=9	Différence absolue	p-value
Indice de masse corporelle, kg/m ²	25,9 ± 3,4	26,1 ± 6,3	+0,2	0,64
Tour de taille, cm	91,2 ± 12,6	92,7 ± 13,5	+1,5	0,39
Tour de hanche, cm	98,9 ± 8,4	100,3 ± 9,2	+1,4	0,36
Masse grasse totale, kg	28,4 ± 9,2	29,5 ± 11,0	+1,1	0,41
Pourcentage de graisse corporelle, %	39,4 ± 8,5	39,4 ± 9,0	0	0,46
Indice de masse grasse, kg/m ²	10,3 ± 3,5	10,7 ± 4,3	+0,1	0,45
Adiposité viscérale, cm ²	150 ± 81	173 ± 88	+23	0,18
Leptine, ng/L	14,9 ± 19,7	19,4 ± 24,9	+4,5	0,30
PDFF au rachis lombaire (%)	46,3 ± 7,0	53,2 ± 9,2	+6,9	0,008
Cholestérol total, g/L	2,18 ± 0,49	2,17 ± 0,59	-0,01	0,82
HDL cholestérol, g/L	0,61 ± 0,18	0,71 ± 0,28	+0,10	0,056
LDL cholestérol total, g/L	1,39 ± 0,18	1,29 ± 0,46	-0,10	0,19
Triglycérides, g/L	1,05 ± 0,67	0,87 ± 0,18	-0,18	0,37

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écarts-type ou en valeur absolue et pourcentage selon la variable. HDL : High Density Lipoprotein. LDL : Low Density PDFF: PDFF : Proton Density Fat Fraction.

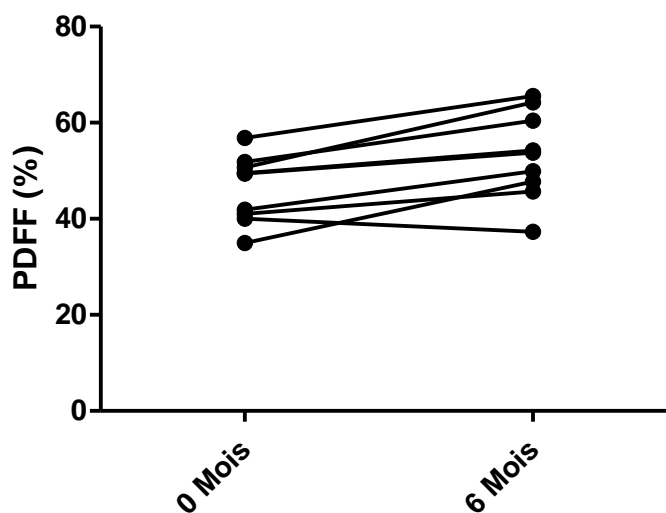


Figure 15 : Variations de l'adiposité médullaire après 6 mois de Tofa

L'adiposité médullaire est quantifiée en fraction grasseuse (Proton Density Fat Fraction PDFF), mesurée en IRM au rachis lombaire et exprimée en pourcentage.

b. Discussion

Notre étude TOFAT conforte les résultats de notre étude *in vitro* en montrant une augmentation de l'adiposité médullaire après un traitement par Tofa. Cette augmentation a été détectée malgré un faible effectif et une durée de suivi courte. Au vu de notre étude, le Tofa pourrait avoir une action stimulatrice préférentielle sur l'adiposité médullaire sans modification des autres compartiments adipeux évalués par la composition corporelle.

Comme nous l'avons indiqué en introduction, il n'existe pas d'étude publiée sur l'effet des DMARDs sur l'adiposité médullaire dans la PR, ce qui souligne l'originalité de cette étude pilote.

D'un point de vue osseux, les paramètres évalués (DMO, TBS ou CTX sériques) n'étaient pas modifiés après 6 mois de traitement par Tofa. Ces résultats confortent également les résultats de notre étude *in vitro*, puisque le Tofa ne modifiait pas le profil d'expression génique des Ob en condition inflammatoire. Néanmoins, l'étude TOFAT présente des limites avec un faible effectif, entraînant un manque de puissance statistique pour détecter des différences avant et après 6 mois de traitement. Ce manque de puissance statistique explique probablement que la diminution de la DMO au rachis lombaire n'était pas statistiquement significative, mais tendait à la significativité.

Par ailleurs, la période d'évaluation de 6 mois reste courte pour détecter des variations des paramètres osseux, notamment densitométriques. L'absence de groupe contrôle avec un traitement de référence comme un anti-TNF α est également une limite importante. Enfin, le remodelage osseux n'a été évalué que par mesure des CTX sériques. Le dosage de P1NP1, marqueur de formation osseuse, aurait été intéressant.

Comme nous l'avons mentionné en introduction, les données restent limitées sur l'effet des DMARDs sur le tissu osseux dans la PR. La majorité des études concernent les anti-TNF α et montrent une stabilité des chiffres densitométriques après 1 an de traitement [174–178]. La population de l'étude TOFAT différait des études précédemment publiées avec un sex-ratio plus équilibré, une durée d'évolution plus courte (à l'exception de deux études [183,185]) et une activité de la maladie plus faible. La majorité des patients avaient une corticothérapie, ce qui était en accord avec la majorité des études publiées. En revanche, la dose moyenne quotidienne de corticoïdes était plus faible.

Au vu des limites de l'étude TOFAT, il est difficile de conclure sur les effets du Tofa sur les paramètres osseux. Dans une analyse post-hoc récemment publiée, incluant le programme de développement du Tofa dans la PR et l'étude ORAL Surveillance, il n'était pas retrouvé de différence significative pour le risque fracturaire entre le Tofa et le placebo, mais aussi entre le Tofa et les anti-TNF α (étanercept et adalimumab) [271]. La limite principale de cette étude reste la période d'évaluation courte (de 3 à 6 mois) pour comparer le Tofa au placebo concernant le risque fracturaire.

Concernant la composition corporelle, seules les performances physiques et la force musculaire étaient améliorées après 6 mois de traitement par Tofa. Il n'y avait pas de modification des autres paramètres de la composition corporelle.

Cette amélioration des paramètres musculaires peut être expliquée soit par une amélioration des paramètres inflammatoires, ce qui est le plus probable, soit par une action directe du Tofa au niveau musculaire. Cette dernière hypothèse semble moins probable, comme les autres paramètres quantitatifs de la composition corporelle sont restés inchangés.

À l'heure actuelle, aucune étude n'a été publiée à propos de l'effet des csDMARDs sur la composition corporelle dans la PR. Les études se sont focalisées sur l'effet des biothérapies sur la composition corporelle dans la PR [272–279]. Sous anti-TNF α , la composition corporelle est peu modifiée [226,273,274,276]. Une augmentation de la masse grasse après 2 ans de traitement par infliximab a été décrite dans une étude [272]. La masse maigre était augmentée après 1 an de traitement par anti-TNF α (étanercept, adalimumab et golimumab) dans l'étude avec le plus gros effectif jusqu'à ce jour (n=47) [279].

Dans deux études prospectives ouvertes avec un suivi d'un an, le traitement par tocilizumab a été associé à un gain de masse maigre, mais sans changement de la masse grasse [277,278]. Il n'y a pas de données disponibles sur l'effet des autres biothérapies (tels que l'abatacept ou le rituximab) sur la composition corporelle des patients atteints de PR.

En comparaison des études précédemment citées, les patients de l'étude TOFAT ont un âge moyen similaire, mais une durée d'évolution plus courte.

L'évaluation des tissus adipeux a été réalisée par dosage de la leptine. Il n'était pas retrouvé de différence significative entre les deux groupes. Nous n'avons pas pu réaliser le dosage de l'adiponectine lors de l'étude TOFAT faute de financements pour cette analyse. Ces deux adipokines sont associées dans la PR au risque cardiométabolique et à l'activité inflammatoire [280–282].

Dans une étude prospective de 30 patients traités par Tofa (15 par Tofa 5mg 2/jour et 15 par Tofa 10mg 2/jour), les taux sériques d'adiponectine ne variaient pas significativement, au contraire des taux sériques de leptine qui augmentaient significativement à 6 et 12 mois [216]. Les patients de cette étude avaient une durée d'évolution de la maladie plus longue ainsi qu'un IMC plus élevé que les patients de TOFAT. La très grande majorité des patients de cette étude étaient des femmes (27/30).

Les limites de l'étude TOFAT soulevées pour les paramètres osseux sont également valables pour la composition corporelle. La période d'évaluation est courte et l'effectif est faible. De plus, il manque un groupe de contrôle avec un traitement de référence comme un anti-TNF α . L'hypothèse d'une action stimulatrice préférentielle du Tofa sur l'adiposité médullaire est à prendre avec précaution au vu de ces limites. Néanmoins, l'augmentation de l'adiposité médullaire sous Tofa malgré ces limites est un résultat intéressant qui nécessite d'être validé.

L'ensemble des résultats de l'étude TOFAT et l'étude *in vitro* ont été publiés dans un article que nous présentons en **Annexe VII** [283].

III. Comparaison des paramètres osseux et de la composition corporelle dans l'étude RAFAT

a. Résultats

L'étude **RAFAT** qui a succédé à l'étude TOFAT est en cours. Au moment de l'écriture de ce manuscrit, nous avons pu inclure 8 patients atteints de PR et 8 témoins.

Les caractéristiques des patients atteints de PR sont décrites dans le **Tableau 10**. Le sex-ratio était équilibré et l'âge moyen était de $57,8 \pm 12,7$ ans contre $57,4 \pm 14,3$ ans pour les témoins ($p=0,96$). La durée moyenne d'évolution de la PR était de $2,5 \pm 1,8$ ans. Une seule patiente était sous méthotrexate. Les 7 autres patients issus de l'étude TOFAT avaient arrêté le méthotrexate pour cause d'intolérance et allaient débiter le Tofa, ce qui explique ce nombre aussi bas de patients sous méthotrexate. Le DAS 28-CRP était de $3,9 \pm 1,5$, témoin d'une activité modérée de la maladie. La CRP moyenne était de $5,3 \pm 6,9$ mg/L.

D'un point de vue osseux, il n'y avait pas de différence significative entre les patients atteints de PR et les témoins pour la DMO aux 3 sites (rachis lombaire, col fémoral et hanche totale), le TBS ou les taux sériques de CTX (**Tableau 11**).

Tableau 10 : Caractéristiques des paramètres inflammatoires chez les patients atteints de PR dans l'étude RAFAT

	Patients N=8	Témoins N=8	p-value
Âge, ans	57,8 ± 12,7	57,4 ± 14,3	0,96
Genre, femme (%)	4/8 (50)	4/8 (50)	NA
Indice de Charlson	1,4 ± 1,3	1,1 ± 1,3	0,70
Présence de facteurs rhumatoïdes, n (%)	5/8 (62,5)	NA	NA
Présence d'Anticorps anti-Peptides Citrullinés, n (%)	5/8 (62,5)	NA	NA
Présence d'érosions, n (%)	5/9 (62,5)	NA	NA
Durée d'évolution de la maladie, ans	2,5 ± 1,8	NA	NA
Corticothérapie actuelle, n (%)	5/8 (62,5)	NA	NA
Dose actuelle de la corticothérapie, mg/jour	5,4 ± 2,9	NA	NA
Prise actuelle de méthotrexate, n (%)	1/8 (12,5)	NA	NA
Patients traités antérieurement par biothérapies, n (%)	1/8 (12,5)	NA	NA
Nombre d'articulations douloureuses	4,6 ± 4,9	NA	NA
Nombre d'articulations gonflées	7,9 ± 6,1	NA	NA
EVA activité de la maladie	55 ± 29,6	NA	NA
DAS 28 -CRP	3,88 ± 1,45	NA	NA
CRP, mg/L	5,3 ± 6,9	NA	NA

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écarts-type ou en valeur absolue et pourcentage selon la variable. N.A : non applicable

Tableau 11 : Comparaison des paramètres osseux dans l'étude RAFAT

	Patients N=8	Témoins N=8	Différence absolue	p-value
DMO au rachis lombaire, g/cm ²	0,980 ± 0,131	0,918 ± 0,160	+0,062	0,41
T-score au rachis lombaire, D.S	-0,6 ± 1,6	-1,2 ± 1,3	-0,6	0,40
DMO au col fémoral, g/cm ²	0,700 ± 0,102	0,719 ± 0,088	-0,019	0,70
T-score au col fémoral, D.S	-1,5 ± 0,9	-1,4 ± 0,6	+0,1	0,90
DMO à la hanche totale, g/cm ²	0,861 ± 0,118	0,899 ± 0,134	-0,011	0,56
T-score à la hanche totale, D.S	-0,9 ± 0,9	-0,7 ± 0,8	-0,2	0,59
Trabecular Bone Score (TBS)	1,382 ± 0,118	1,386 ± 0,122	-0,004	0,96
CTX, pmol/L	2991 ± 1820	3445 ± 1639	-454	0,61

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écarts-type ou en valeur absolue et pourcentage selon la variable. CTX : Cross laps. DMO : Densité Minérale Osseuse. D.S : Déviation standard.

D'un point de vue musculaire, les patients atteints de PR avaient un score SARC-F significativement plus élevé ($p=0,001$) par rapport aux témoins. Les performances physiques évaluées par le test «Get up and Go» était significativement plus faible dans le groupe PR ($p=0,03$). Il n'y avait pas de différence significative pour le test SPPB, la station unipodale, l'activité physique évaluée par le score IPAQ-SF ou pour les paramètres musculaires quantitatifs (masse maigre totale, indice de muscle squelettique, masse maigre appendiculaire, indice de masse maigre appendiculaire). Une patiente était considérée comme sarcopénique selon les critères EWGSOP2 [227] dans le groupe PR, à l'inverse du groupe témoins dans lequel aucun n'était sarcopénique (**Tableau 12**).

D'un point de vue adipeux, il n'y avait pas de différence significative concernant les paramètres anthropométriques (IMC, tour de taille, tour de hanche), ni pour ceux mesurés en composition corporelle (masse grasse totale, pourcentage de graisse corporelle, indice de masse corporelle), ni pour la leptine ou l'adiposité médullaire entre les deux groupes (**Tableau 13**). Cinq patients atteints de PR et 6 témoins avaient au moins 2 facteurs de risque cardiovasculaires.

Tableau 12 : Comparaison des paramètres musculaires dans l'étude RAFAT

	Patients N=8	Témoins N=8	Différence absolue	p-value
Force de préhension, kg	24,7 ± 12,6	36,9 ± 13,0	-12,2	0,08
Short Physical Performance Battery (SPPB), côté sur 12	10,9 ± 2,5	11,8 ± 0,5	-0,9	0,84
SARC-F	2,3 ± 1,9	0	+2,3	0,001
Activité physique en score continu selon IPAQ-SF, MET-minute/semaine	4575 ± 6482	5983 ± 4420	-1408	0,24
Activité physique en score catégoriel selon IPAQ-SF, n (%)				0,13
Faible	3/8 (37,5)	0/8 (0)	+3	
Modérée	1/8 (12,5)	4/8 (50)	-3	
Forte	4/8 (50)	4/8 (50)	0	
Test « Get up and Go », secondes	9,6 ± 4,9	6,3 ± 1,3	-3,3	0,03
Maintien de la station unipodale	9/9 (100)	9/9 (100)	0	1
Masse maigre totale, kg	38,5 ± 9,6	39,8 ± 11,2	-1,3	0,81
Indice de muscle squelettique, kg/m ²	14,1 ± 1,4	14,4 ± 2,4	-0,3	0,81
Masse maigre appendiculaire, kg	15,4 ± 4,6	16,8 ± 5,1	-1,4	0,55
Indice de masse maigre appendiculaire, kg/m ²	5,6 ± 0,9	6,0 ± 1,2	+0,4	0,43
Patients sarcopéniques, n (%)	1/8 (12,5)	0/8 (0)	+1	0,26

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écarts-type ou en valeur absolue et pourcentage selon la variable. SARC-F : questionnaire pour évaluer la sarcopénie. IPAQ-SF : International Physical Activity Questionnaire - Short Form. MET : Metabolic Equivalent of Task.

Tableau 13 : Comparaison des paramètres adipeux dans la population de l'étude RAFAT

	Patients N=8	Témoins N=8	Différence absolue	p-value
Indice de masse corporelle, kg/m ²	24,2 ± 2,2	24,1 ± 3,0	+0,1	0,89
Tour de taille, cm	87,1 ± 10,1	86,8 ± 13,9	+0,3	0,95
Tour de hanche, cm	95,3 ± 7,6	96,4 ± 9,1	-1,4	0,79
Masse grasse totale, kg	23,8 ± 5,9	23,6 ± 7,8	+0,2	0,98
Pourcentage de graisse corporelle, %	37,2 ± 7,6	35,2 ± 10,6	+2,0	0,68
Indice de masse grasse, kg/m ²	9,0 ± 2,6	8,4 ± 2,8	+0,6	0,67
Adiposité viscérale, cm ²	112 ± 40	125 ± 58	-13	0,60
Leptine, ng/L	12,9 ± 10,1	6,9 ± 5,9	+0,9	0,79
PDFF au rachis lombaire (%)	50,0 ± 7,6	47,5 ± 13,4	+2,5	0,65

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écarts-type ou en valeur absolue et pourcentage selon la variable. HDL : High Density Lipoprotein. LDL : Low Density Lipoprotein. PDFF : Proton Density Fat Fraction.

b. Discussion

Dans notre étude cas-témoins RAFAT, il n'y avait pas de différence significative entre les patients atteints de PR et les témoins appariés pour le tissu osseux (DMO, TBS, CTX sériques), la composition corporelle et l'adiposité médullaire. Le seul paramètre qui différait significativement entre les deux groupes était la performance physique évaluée par le test du « Get up and Go ».

Nos patients atteints de PR avaient en moyenne une durée d'évolution de la maladie relativement précoce (moins de 3 ans). Il existe quelques études dans la littérature qui se sont intéressées aux modifications de la composition corporelle chez des patients atteints de PR à un stade précoce. En 2009, Book *et al.* [223] ont comparé 132 patients atteints de PR précoce (femmes : 72 %, âge moyen \approx 60 ans, durée de la maladie \leq 1 an) avec des témoins appariés pour l'âge et le sexe. Tous les patients qui avaient été traités par des corticoïdes ou des csDMARDs, avant l'inclusion, avaient été traités pendant moins de 30 jours. La composition corporelle a été évaluée par DXA. La masse maigre appendiculaire était inférieure chez les patients atteints de PR par rapport aux témoins, tant chez les femmes que chez les hommes (femmes : 16,8 contre 17,6 kg, $p=0,007$; hommes : 23,0 contre 25,8 kg, $p<0,001$). La masse maigre totale était significativement plus faible chez les hommes atteints de PR (54,4 contre 58,3 kg, $p=0,012$), ce qui n'était pas le cas pour les femmes. Le poids, l'IMC et la masse grasse totale étaient significativement plus élevés chez les femmes atteintes de PR (68,1 contre 64,0 kg, $p=0,016$; 25,1 kg/m² contre 23,7 kg/m², $p=0,012$; et 26,1 contre 23,0 kg, $p=0,012$). Il n'y avait pas de différence chez les hommes pour ces paramètres entre les patients et les témoins.

Dans un suivi longitudinal de leur étude précédente, Book *et al.* [284] ont comparé 63 patients atteints de PR avec 63 témoins sains appariés pour l'âge et le sexe. Après 2 ans, les changements observés dans le groupe RA étaient généralement moins prononcés que ceux observés dans le groupe témoin. Cependant, en raison de la taille relativement modeste de l'échantillon et de la durée courte du suivi, aucune conclusion définitive ne peut être tirée. Par ailleurs, cette étude a été menée avant l'ère des biothérapies. L'apparition de modifications de la composition corporelle à un stade précoce de la PR a été confirmée dans trois autres études [285–287].

L'absence de différence entre les patients et les témoins dans notre étude RAFAT sur les paramètres osseux, la composition corporelle et l'adiposité médullaire peut être liée à un manque de puissance, puisque l'effectif est petit. Les résultats définitifs de cette étude pourraient être différents, puisque l'étude doit inclure au total 42 patients et 42 témoins.

Les forces de l'étude RAFAT sont une étude originale sur l'évaluation de l'adiposité médullaire dans la PR, ce qui n'a jamais été fait auparavant. Cette évaluation est faite chez des patients avec une durée d'évolution de la maladie relativement précoce. La composition corporelle est évaluée de manière quantitative, mais également qualitative avec l'évaluation de la force musculaire et des performances physiques. L'âge moyen des patients de cette étude correspond à celui des patients des études précédemment publiées sur l'effet de la PR sur la composition corporelle.

Les limites des résultats actuels de l'étude RAFAT sont : l'effectif de taille relativement modeste et le sex-ratio équilibré qui n'est pas représentatif des patients atteints de PR où il existe une forte prédominance féminine.

L'absence de différence de l'adiposité médullaire, de la DMO et de la composition corporelle entre les patients atteints de PR et les témoins dans cette étude cas-témoins pourrait indiquer que la PR à un stade précoce n'entraîne pas de modification de ces différents paramètres. Les résultats finaux de l'étude RAFAT avec un effectif de plus grande taille pourront infirmer ou confirmer cette hypothèse.

Conclusion et Perspectives

L'étude *in vitro* menée, nous a permis de mettre en évidence un effet positif du Tofa sur la différenciation adipocytaire avec une implication de STAT3 qui reste à confirmer. Pour cela, nous pourrions utiliser un inhibiteur spécifique de STAT3 (par exemple le C188-9 [288] ou le BP-1-102 [289]) afin de confirmer que l'effet du Tofa sur les Ad med est liée en partie à l'inhibition de la phosphorylation de STAT3. D'autre part, des effets hors cibles du Tofa ont été mis en avant dans d'autres études *in vitro* afin d'expliquer un effet pro-adipogénique du Tofa non dépendant de la voie JAK/STAT [265,266]. Une analyse plus globale du transcriptome des Ad med traités par le Tofa par rapport à des contrôles devrait nous permettre de mieux caractériser les modifications induites par le Tofa dans ces cellules.

Enfin, notre laboratoire a montré que les produits de sécrétion des Ad med avaient un effet négatif sur la différenciation des Ob. Il serait intéressant de comparer l'effet des produits de sécrétions obtenus à partir d'Ad med traités par le Tofa par rapport à des Ad med non traités sur la différenciation Ob. Si un effet majoré était observé sous Tofa, l'effet négatif du Tofa sur l'os serait conforté.

L'étude pilote TOFAT a renforcé les résultats *in vitro* en montrant une augmentation de l'adiposité médullaire après 6 mois de traitement par Tofa. Les paramètres osseux n'étaient pas modifiés, de même que ceux mesurés pour la composition corporelle, indiquant, peut-être, une action stimulatrice préférentielle du Tofa sur l'adiposité médullaire.

En perspective, une étude avec un effectif plus conséquent et une durée de suivi plus importante (un an minimalement) serait intéressante pour confirmer nos résultats concernant l'adiposité médullaire et évaluer avec un suivi suffisant les modifications potentielles sur la DMO. La comparaison des résultats avec un groupe contrôle est également indispensable.

L'étude TOFAT était initialement prévue pour une évaluation à 12 mois, mais les résultats préliminaires de l'étude ORAL Surveillance [290] nous ont obligé à modifier l'étude prospective TOFAT en étude cas-témoins transversale RAFAT. Il n'a donc pas été possible d'évaluer les variations de la DMO à 12 mois de traitement par Tofa. Notre faible effectif a probablement entraîné un manque de puissance pour détecter des différences avant et après six mois.

L'évaluation d'autres JAKi ayant l'AMM dans la PR comme le baricitinib (inhibiteur de JAK1 et 2), le filgotinib (inhibiteur de JAK1), l'upadacitinib (inhibiteur de JAK1) et le deucravacitinib (inhibiteur de TYK2) dans une étude translationnelle comme celle que nous avons conduite pourrait mettre en évidence que l'effet stimulant sur l'engagement et la différenciation des Ad med est retrouvée chez tous les JAKi, ou uniquement avec le Tofa. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de JAK1 comme l'upadacitinib et le filgotinib pourrait nous indiquer si l'effet stimulant sur les Ad med est spécifique de JAK3.

Nous pourrions également évaluer l'adiposité médullaire au fémur qui est un autre site classique de mesure [291]. Nous pourrions ainsi confirmer que l'augmentation de l'adiposité médullaire observée n'est pas spécifiquement rachidienne, mais concerne également le fémur. Nous pourrions ainsi évaluer les corrélations entre les valeurs densitométriques et les PDFF aux différents sites de mesure.

L'utilisation d'autres techniques de mesure de l'adiposité médullaire pourrait être intéressante afin de confirmer nos résultats avec la spectro-IRM, le scanner double énergie ou la 2-deoxy-2-[fluorine-18] fluoro- D-glucose (¹⁸F FDG) tomographie par émission de positrons couplée à l'IRM [292].

Cependant, les dernières recommandations de l'Agence européenne des médicaments sur les JAKi qui limitent l'utilisation de cette classe thérapeutique, rendent probablement difficiles de réaliser une telle étude à court terme [64]. L'Agence européenne des médicaments recommande l'utilisation des JAKi seulement en cas d'impossibilité d'alternative thérapeutique chez les patients âgés de 65 ans ou plus, à haut risque cardiovasculaire, fumeurs ou ayant fumé pendant une longue période et ceux à risque de cancer. La posologie devrait être réduite chez ces patients.

L'inclusion de patients pourrait prendre un temps beaucoup trop important puisqu'un nombre non négligeable de patients ne pourraient pas être inclus, car fumeurs actifs ou ayant eu une exposition tabagique prolongée. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les patients atteints de PR ont également un surrisque cardiovasculaire. Par ailleurs, le potentiel surrisque néoplasique des JAKi peut effrayer à juste titre les patients qui refuseraient de prendre ce traitement. Un recul est nécessaire pour avoir une vision plus claire sur les surrisques cardiovasculaire et néoplasique de cette classe thérapeutique avant de pouvoir réaliser à nouveau des études académiques prospectives.

Les résultats intermédiaires de notre deuxième étude clinique RAFAT n'ont pas démontré de différence significative entre les patients et les témoins sur les paramètres osseux, l'adiposité médullaire et la composition corporelle. Cette absence de différence statistiquement significative peut être liée à un manque de puissance également. En perspective, les résultats finaux de l'étude RAFAT avec un effectif plus important (42 patients et 42 témoins) permettront de confirmer ou d'infirmer ces résultats intermédiaires avec un intérêt tout particulier concernant l'adiposité médullaire en raison de son originalité et des conséquences potentielles.

Références bibliographiques

1. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:18001.
2. Pina Vegas L, Drouin J, Dray-Spira R, Weill A. Prevalence, mortality, and treatment of patients with rheumatoid arthritis: A cohort study of the French National Health Data System, 2010-2019. *Joint Bone Spine* 2022;90:105460.
3. 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;62:1576-82.
4. Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* 2010;35:10-4.
5. Guillemin F, Saraux A, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Ann. Rheum. Dis.* 2005;64:1427-30.
6. Carmona L, Villaverde V, Hernández-García C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:88-95.
7. Kojima M, Nakayama T, Tsutani K, Igarashi A, Kojima T, Suzuki S, et al. Epidemiological characteristics of rheumatoid arthritis in Japan: Prevalence estimates using a nationwide population-based questionnaire survey. *Mod Rheumatol* 2019;1-7.
8. Li R, Sun J, Ren LM, Wang HY, Liu WH, Zhang XW, et al. Epidemiology of eight common rheumatic diseases in China: a large-scale cross-sectional survey in Beijing. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:721-9.
9. Joshi VL, Chopra A. Is there an urban-rural divide? Population surveys of rheumatic musculoskeletal disorders in the Pune region of India using the COPCORD Bhigwan model. *J. Rheumatol.* 2009;36:614-22.
10. Usenbo A, Kramer V, Young T, Musekiwa A. Prevalence of Arthritis in Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2015;10:e0133858.
11. Peschken CA, Esdaile JM. Rheumatic diseases in North America's indigenous peoples. *Semin. Arthritis Rheum.* 1999;28:368-91.
12. Radner H, Lesperance T, Accortt NA, Solomon DH. Incidence and Prevalence of Cardiovascular Risk Factors Among Patients With Rheumatoid Arthritis, Psoriasis, or Psoriatic Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2017;69:1510-8.
13. Houge IS, Hoff M, Thomas R, Videm V. Mortality is increased in patients with rheumatoid arthritis or diabetes compared to the general population - the Nord-Trøndelag Health Study. *Sci Rep* 2020;10:3593.

14. Sparks JA, Chang SC, Liao KP, Lu B, Fine AR, Solomon DH, et al. Rheumatoid Arthritis and Mortality Among Women During 36 Years of Prospective Follow-Up: Results From the Nurses' Health Study. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2016;68:753-62.
15. Hyldgaard C, Hilberg O, Pedersen AB, Ulrichsen SP, Løkke A, Bendstrup E, et al. A population-based cohort study of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: comorbidity and mortality. *Ann Rheum Dis* 2017;76:1700-6.
16. Abhishek A, Nakafero G, Kuo CF, Mallen C, Zhang W, Grainge MJ, et al. Rheumatoid arthritis and excess mortality: down but not out. A primary care cohort study using data from Clinical Practice Research Datalink. *Rheumatology (Oxford)* 2018;57:977-81.
17. Morales-Etcheagaray I, Garcia-Carrasco M, Munguía-Realpozo P, Mendoza-Pinto C, Méndez-Martínez S, Navarro-Milán O, et al. Changing trends in rheumatoid arthritis mortality in Mexico, from 1998 to 2017. *Rheumatol Int* 2021;41:2225-31.
18. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgrén AK, Nicholas AP, Zendman AJW, Eklund A, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1488-92.
19. Dissick A, Redman RS, Jones M, Rangan BV, Reimold A, Griffiths GR, et al. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J Periodontol* 2010;81:223-30.
20. König MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 2016;8:369ra176.
21. Kinslow JD, Blum LK, Deane KD, Demoruelle MK, Okamoto Y, Parish MC, et al. Elevated IgA Plasmablast Levels in Subjects at Risk of Developing Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2016;68:2372-83.
22. Ai R, Whitaker JW, Boyle DL, Tak PP, Gerlag DM, Wang W, et al. DNA Methylome Signature in Synoviocytes From Patients With Early Rheumatoid Arthritis Compared to Synoviocytes From Patients With Longstanding Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2015;67:1978-80.
23. Smolen JS, Breedveld FC, Eberl G, Jones I, Leeming M, Wylie GL, et al. Validity and reliability of the twenty-eight-joint count for the assessment of rheumatoid arthritis activity. *Arthritis Rheum* 1995;38:38-43.
24. Ellatif M, Sharif B, Baxter D, Saifuddin A. Update on imaging of the cervical spine in rheumatoid arthritis. *Skeletal Radiol* 2022;51:1535-51.

25. Drosos AA, Pelechas E, Voulgari PV. Conventional radiography of the hands and wrists in rheumatoid arthritis. What a rheumatologist should know and how to interpret the radiological findings. *Rheumatol Int* 2019;39:1331-41.
26. Llopis E, Kroon HM, Acosta J, Bloem JL. Conventional Radiology in Rheumatoid Arthritis. *Radiol Clin North Am* 2017;55:917-41.
27. Hench PS, Kendall EC. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1949;24:181-97.
28. Ward LE, Slocumb CH, Polley HF, Lowman EW, Hench PS. Clinical effects of cortisone administered orally to patients with rheumatoid arthritis. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1951;26:361-70.
29. Kirwan JR. The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:142-6.
30. Daien C, Hua C, Gaujoux-Viala C, Cantagrel A, Dubremetz M, Dougados M, et al. Update of French society for rheumatology recommendations for managing rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2019;86:135-50.
31. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann. Rheum. Dis.* 2020;
32. Cronstein BN, Aune TM. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2020;16:145-54.
33. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA* 2018;320:1360-72.
34. Bartlett RR, Anagnostopoulos H, Zielinski T, Mattar T, Schleyerbach R. Effects of leflunomide on immune responses and models of inflammation. *Springer Semin Immunopathol* 1993;14:381-94.
35. Abbasi M, Mousavi MJ, Jamalzahi S, Alimohammadi R, Bezvan MH, Mohammadi H, et al. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *J Cell Physiol* 2019;234:10018-31.
36. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, et al. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* 1999;354:1932-9.

37. Emery P, Breedveld FC, Hall S, Durez P, Chang DJ, Robertson D, et al. Comparison of methotrexate monotherapy with a combination of methotrexate and etanercept in active, early, moderate to severe rheumatoid arthritis (COMET): a randomised, double-blind, parallel treatment trial. *Lancet* 2008;372:375-82.
38. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum* 2003;48:35-45.
39. Keystone E, Heijde D van der, Mason D, Landewé R, Vollenhoven RV, Combe B, et al. Certolizumab pegol plus methotrexate is significantly more effective than placebo plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: findings of a fifty-two-week, phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum* 2008;58:3319-29.
40. Smolen JS, Kay J, Doyle MK, Landewé R, Matteson EL, Wollenhaupt J, et al. Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis after treatment with tumour necrosis factor alpha inhibitors (GO-AFTER study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Lancet* 2009;374:210-21.
41. Mysler E, Caubet M, Lizarraga A. Current and Emerging DMARDs for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Open Access Rheumatol* 2021;13:139-52.
42. Huizinga TWJ, Fleischmann RM, Jasson M, Radin AR, van Adelsberg J, Fiore S, et al. Sarilumab, a fully human monoclonal antibody against IL-6R α in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: efficacy and safety results from the randomised SARIL-RA-MOBILITY Part A trial. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1626-34.
43. Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, Mysler EF, da Silva NA, Alecock E, et al. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum* 2008;58:2968-80.
44. Dougados M, Kissel K, Sheeran T, Tak PP, Conaghan PG, Mola EM, et al. Adding tocilizumab or switching to tocilizumab monotherapy in methotrexate inadequate responders: 24-week symptomatic and structural results of a 2-year randomised controlled strategy trial in rheumatoid arthritis (ACT-RAY). *Ann Rheum Dis* 2013;72:43-50.
45. Schiff M, Weinblatt ME, Valente R, van der Heijde D, Citera G, Elegbe A, et al. Head-to-head comparison of subcutaneous abatacept versus adalimumab for rheumatoid arthritis: two-year efficacy and safety findings from AMPLE trial. *Ann Rheum Dis* 2014;73:86-94.

46. Anderson DR, Grillo-López A, Varns C, Chambers KS, Hanna N. Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochem Soc Trans* 1997;25:705-8.
47. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000;6:443-6.
48. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994;83:435-45.
49. Emery P, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A, Schechtman J, Szczepanski L, Kavanaugh A, et al. The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum* 2006;54:1390-400.
50. Courvoisier DS, Chatzidionysiou K, Mongin D, Lauper K, Mariette X, Morel J, et al. The impact of seropositivity on the effectiveness of biologic anti-rheumatic agents: results from a collaboration of 16 registries. *Rheumatology (Oxford)* 2021;60:820-8.
51. Owen KL, Brockwell NK, Parker BS. JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers (Basel)* 2019;11:E2002.
52. Xin P, Xu X, Deng C, Liu S, Wang Y, Zhou X, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *Int. Immunopharmacol.* 2020;80:106210.
53. Partanen J, Mäkelä TP, Alitalo R, Lehvälaiho H, Alitalo K. Putative tyrosine kinases expressed in K-562 human leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:8913-7.
54. Wilks AF, Harpur AG. Cytokine signal transduction and the JAK family of protein tyrosine kinases. *Bioessays* 1994;16:313-20.
55. Xu P, Shen P, Yu B, Xu X, Ge R, Cheng X, et al. Janus kinases (JAKs): The efficient therapeutic targets for autoimmune diseases and myeloproliferative disorders. *Eur J Med Chem* 2020;192:112155.
56. Cai B, Cai J ping, Luo Y long, Chen C, Zhang S. The Specific Roles of JAK/STAT Signaling Pathway in Sepsis. *Inflammation* 2015;38:1599-608.
57. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009;9:798-809.
58. Fleischmann R, Kremer J, Cush J, Schulze-Koops H, Connell CA, Bradley JD, et al. Placebo-controlled trial of tofacitinib monotherapy in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2012;367:495-507.

59. Genovese MC, Kremer J, Zamani O, Ludivico C, Krogulec M, Xie L, et al. Baricitinib in Patients with Refractory Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2016;374:1243-52.
60. Genovese MC, Kalunian K, Gottenberg JE, Mozaffarian N, Bartok B, Matzkies F, et al. Effect of Filgotinib vs Placebo on Clinical Response in Patients With Moderate to Severe Rheumatoid Arthritis Refractory to Disease-Modifying Antirheumatic Drug Therapy: The FINCH 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2019;322:315-25.
61. Burmester GR, Kremer JM, Van den Bosch F, Kivitz A, Bessette L, Li Y, et al. Safety and efficacy of upadacitinib in patients with rheumatoid arthritis and inadequate response to conventional synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs (SELECT-NEXT): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2018;391:2503-12.
62. Clark JD, Flanagan ME, Telliez JB. Discovery and development of Janus kinase (JAK) inhibitors for inflammatory diseases. *J Med Chem* 2014;57:5023-38.
63. Ytterberg SR, Bhatt DL, Mikuls TR, Koch GG, Fleischmann R, Rivas JL, et al. Cardiovascular and Cancer Risk with Tofacitinib in Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* 2022;386:316-26.
64. EMA. Janus Kinase inhibitors (JAKi) [Internet]. European Medicines Agency 2022 [cité 2022 déc 29]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/janus-kinase-inhibitors-jaki>
65. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol* 2011;6:121-45.
66. Miller PD. Management of severe osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* 2016;17:473-88.
67. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 2014;94:25-34.
68. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015;2015:421746.
69. Sroga GE, Vashishth D. Effects of bone matrix proteins on fracture and fragility in osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2012;10:141-50.
70. Lin X, Patil S, Gao YG, Qian A. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Front Pharmacol* 2020;11:757.
71. Young MF. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int* 2003;14 Suppl 3:S35-42.
72. Tavafoghi M, Cerruti M. The role of amino acids in hydroxyapatite mineralization. *J R Soc Interface* 2016;13:20160462.

73. Faibish D, Ott SM, Boskey AL. Mineral changes in osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res* 2006;443:28-38.
74. Benedetti MG, Furlini G, Zati A, Letizia Mauro G. The Effectiveness of Physical Exercise on Bone Density in Osteoporotic Patients. *Biomed Res Int* 2018;2018:4840531.
75. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3 Suppl 3:S131-139.
76. Boskey AL, Coleman R. Aging and bone. *J Dent Res* 2010;89:1333-48.
77. Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci* 2007;12:3068-92.
78. Amarasekara DS, Kim S, Rho J. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *Int J Mol Sci* 2021;22:2851.
79. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 2010;339:189-95.
80. Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ. Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005;75:213-25.
81. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, et al. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 2000;20:8783-92.
82. Narayanan A, Srinaath N, Rohini M, Selvamurugan N. Regulation of Runx2 by MicroRNAs in osteoblast differentiation. *Life Sci* 2019;232:116676.
83. Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R, et al. Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Dev Dyn* 2007;236:1876-90.
84. Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori T. Runx2 regulates cranial suture closure by inducing hedgehog, Fgf, Wnt and Pthlh signaling pathway gene expressions in suture mesenchymal cells. *Hum Mol Genet* 2019;28:896-911.
85. Komori T. Whole Aspect of Runx2 Functions in Skeletal Development. *Int J Mol Sci* 2022;23:5776.
86. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 1993;14:424-42.
87. Rutkovskiy A, Stenslkken KO, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med Sci Monit Basic Res* 2016;22:95-106.

88. Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 2005;8:751-64.
89. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011;26:229-38.
90. Candelieri GA, Liu F, Aubin JE. Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone* 2001;28:351-61.
91. Palumbo C, Palazzini S, Marotti G. Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone* 1990;11:401-6.
92. Buenzli PR, Sims NA. Quantifying the osteocyte network in the human skeleton. *Bone* 2015;75:144-50.
93. Sims NA. Senescent Osteocytes: Do They Cause Damage and Can They Be Targeted to Preserve the Skeleton? *J Bone Miner Res* 2016;31:1917-9.
94. Martin A. Bone and heart health in chronic kidney disease: role of dentin matrix protein 1. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2019;28:297-303.
95. Choi JUA, Kijas AW, Lauko J, Rowan AE. The Mechanosensory Role of Osteocytes and Implications for Bone Health and Disease States. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:770143.
96. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev* 2013;34:658-90.
97. Prideaux M, Findlay DM, Atkins GJ. Osteocytes: The master cells in bone remodelling. *Curr Opin Pharmacol* 2016;28:24-30.
98. Yao Z, Getting SJ, Locke IC. Regulation of TNF-Induced Osteoclast Differentiation. *Cells* 2021;11:132.
99. Russo S, Scotto di Carlo F, Gianfrancesco F. The Osteoclast Traces the Route to Bone Tumors and Metastases. *Front Cell Dev Biol* 2022;10:886305.
100. Muto A, Mizoguchi T, Udagawa N, Ito S, Kawahara I, Abiko Y, et al. Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. *J Bone Miner Res* 2011;26:2978-90.
101. Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab* 2021;39:19-26.
102. Amarasekara DS, Yun H, Kim S, Lee N, Kim H, Rho J. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Netw* 2018;18:e8.
103. Fazeli PK, Horowitz MC, MacDougald OA, Scheller EL, Rodeheffer MS, Rosen CJ, et al. Marrow fat and bone--new perspectives. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:935-45.

104. Li Z, Hardij J, Bagchi DP, Scheller EL, MacDougald OA. Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues. *Bone* 2018;110:134-40.
105. Piotrowska K, Tarnowski M. Bone Marrow Adipocytes-Role in Physiology and Various Nutritional Conditions in Human and Animal Models. *Nutrients* 2021;13:1412.
106. Hawkes CP, Mostoufi-Moab S. Fat-bone interaction within the bone marrow milieu: Impact on hematopoiesis and systemic energy metabolism. *Bone* 2019;119:57-64.
107. Hardouin P, Rharass T, Lucas S. Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2016;7:85.
108. Clabaut A, Delplace S, Chauveau C, Hardouin P, Broux O. Human osteoblasts derived from mesenchymal stem cells express adipogenic markers upon coculture with bone marrow adipocytes. *Differentiation* 2010;80:40-5.
109. Clabaut A, Grare C, Rolland-Valognes G, Letarouilly JG, Bourrier C, Andersen TL, et al. Adipocyte-induced transdifferentiation of osteoblasts and its potential role in age-related bone loss. *PLoS One* 2021;16:e0245014.
110. Salmi A, Quacquarelli F, Chauveau C, Clabaut A, Broux O. An integrative bioinformatics approach to decipher adipocyte-induced transdifferentiation of osteoblast. *Genomics* 2022;114:110422.
111. Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2009;20:107-14.
112. Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, et al. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet* 2007;3:e64.
113. Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol* 2013;92:229-36.
114. Wang X, Hai C. Redox modulation of adipocyte differentiation: hypothesis of "Redox Chain" and novel insights into intervention of adipogenesis and obesity. *Free Radical Biology and Medicine* 2015;89:99-125.
115. Sebo ZL, Rendina-Ruedy E, Ables GP, Lindskog DM, Rodeheffer MS, Fazeli PK, et al. Bone Marrow Adiposity: Basic and Clinical Implications. *Endocr Rev* 2019;40:1187-206.
116. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009;360:1509-17.
117. Cinti S. Adipose Organ Development and Remodeling. *Compr Physiol* 2018;8:1357-431.

118. Lucas S, Clabaut A, Ghali O, Haren N, Hardouin P, Broux O. Implication of fatty acids in the inhibitory effect of human adipocytes on osteoblastic differentiation. *Bone* 2013;55:429-30.
119. Scheller EL, Khandaker S, Learman BS, Cawthorn WP, Anderson LM, Pham HA, et al. Bone marrow adipocytes resist lipolysis and remodeling in response to β -adrenergic stimulation. *Bone* 2019;118:32-41.
120. Attané C, Estève D, Chaoui K, Iacovoni JS, Corre J, Moutahir M, et al. Human Bone Marrow Is Comprised of Adipocytes with Specific Lipid Metabolism. *Cell Rep* 2020;30:949-958.e6.
121. Miggitsch C, Meryk A, Naismith E, Pangrazzi L, Ejaz A, Jenewein B, et al. Human bone marrow adipocytes display distinct immune regulatory properties. *EBioMedicine* 2019;46:387-98.
122. Poloni A, Maurizi G, Serrani F, Mancini S, Zingaretti MC, Frontini A, et al. Molecular and functional characterization of human bone marrow adipocytes. *Exp Hematol* 2013;41:558-566.e2.
123. Corre J, Barreau C, Cousin B, Chavoïn JP, Caton D, Fournial G, et al. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *J Cell Physiol* 2006;208:282-8.
124. Li Y, Cao S, Gaculenko A, Zhan Y, Bozec A, Chen X. Distinct Metabolism of Bone Marrow Adipocytes and their Role in Bone Metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:902033.
125. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994;9:1137-41.
126. Haugeberg G, Uhlig T, Falch JA, Halse JI, Kvien TK. Bone mineral density and frequency of osteoporosis in female patients with rheumatoid arthritis: results from 394 patients in the Oslo County Rheumatoid Arthritis register. *Arthritis Rheum* 2000;43:522-30.
127. Hauser B, Riches PL, Wilson JF, Horne AE, Ralston SH. Prevalence and clinical prediction of osteoporosis in a contemporary cohort of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2014;53:1759-66.
128. Lee JH, Sung YK, Choi CB, Cho SK, Bang SY, Choe JY, et al. The frequency of and risk factors for osteoporosis in Korean patients with rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2016;17:98.
129. Kweon SM, Sohn DH, Park JH, Koh JH, Park EK, Lee HN, et al. Male patients with rheumatoid arthritis have an increased risk of osteoporosis: Frequency and risk factors. *Medicine (Baltimore)* 2018;97:e11122.
130. Briot K, Roux C, Thomas T, Blain H, Buchon D, Chapurlat R, et al. 2018 update of French recommendations on the management of postmenopausal osteoporosis. *Joint Bone Spine* 2018;85:519-30.

131. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, McCloskey E. FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int* 2008;19:385-97.
132. Choi ST, Kwon SR, Jung JY, Kim HA, Kim SS, Kim SH, et al. Prevalence and Fracture Risk of Osteoporosis in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Multicenter Comparative Study of the FRAX and WHO Criteria. *J Clin Med* 2018;7.
133. Lindner L, Callhoff J, Alten R, Krause A, Ochs W, Zink A, et al. Osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis: trends in the German National Database 2007-2017. *Rheumatol Int* 2020;40:2005-12.
134. Jin S, Hsieh E, Peng L, Yu C, Wang Y, Wu C, et al. Incidence of fractures among patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2018;29:1263-75.
135. Mazzucchelli R, Pérez Fernandez E, Crespí-Villarías N, Quirós-Donate J, García Vadillo A, Espinosa M, et al. Trends in hip fracture in patients with rheumatoid arthritis: results from the Spanish National Inpatient Registry over a 17-year period (1999-2015). TREND-AR study. *RMD Open* 2018;4:e000671.
136. Wang Y, Zhao R, Gu Z, Dong C, Guo G, Li L. Effects of glucocorticoids on osteoporosis in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 2020;31:1401-9.
137. Wilson JC, Sarsour K, Gale S, Pethö-Schramm A, Jick SS, Meier CR. Incidence and Risk of Glucocorticoid-Associated Adverse Effects in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2019;71:498-511.
138. Robinson DE, van Staa TP, Dennison EM, Cooper C, Dixon WG. The limitations of using simple definitions of glucocorticoid exposure to predict fracture risk: A cohort study. *Bone* 2018;117:83-90.
139. Fraenkel L, Bathon JM, England BR, St Clair EW, Arayssi T, Carandang K, et al. 2021 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2021;73:924-39.
140. Ozen G, Pedro S, Wolfe F, Michaud K. Medications associated with fracture risk in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2019;78:1041-7.
141. Acurcio FA, Moura CS, Bernatsky S, Bessette L, Rahme E. Opioid Use and Risk of Nonvertebral Fractures in Adults With Rheumatoid Arthritis: A Nested Case-Control Study Using Administrative Databases. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68:83-91.
142. Dubrovsky AM, Lim MJ, Lane NE. Osteoporosis in Rheumatic Diseases: Anti-rheumatic Drugs and the Skeleton. *Calcif. Tissue Int.* 2018;102:607-18.

143. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology* 2000;141:3956-64.
144. Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, et al. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/PeBP2 α) is inhibited by tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 2002;277:2695-701.
145. Abbas S, Zhang YH, Clohisy JC, Abu-Amer Y. Tumor necrosis factor- α inhibits pre-osteoblast differentiation through its type-1 receptor. *Cytokine* 2003;22:33-41.
146. Du D, Zhou Z, Zhu L, Hu X, Lu J, Shi C, et al. TNF- α suppresses osteogenic differentiation of MSCs by accelerating P2Y2 receptor in estrogen-deficiency induced osteoporosis. *Bone* 2018;117:161-70.
147. Coury F, Peyruchaud O, Machuca-Gayet I. Osteoimmunology of Bone Loss in Inflammatory Rheumatic Diseases. *Front Immunol* 2019;10:679.
148. Sudół-Szopińska I, Kontny E, Maśliński W, Prochorec-Sobieszek M, Warczyńska A, Kwiatkowska B. Significance of bone marrow edema in pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Pol J Radiol* 2013;78:57-63.
149. Jimenez-Boj E, Nöbauer-Huhmann I, Hanslik-Schnabel B, Dorotka R, Wanivenhaus AH, Kainberger F, et al. Bone erosions and bone marrow edema as defined by magnetic resonance imaging reflect true bone marrow inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:1118-24.
150. Okada A, Yamasaki S, Koga T, Kawashiri SY, Tamai M, Origuchi T, et al. Adipogenesis of the mesenchymal stromal cells and bone oedema in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2012;30:332-7.
151. Torti FM, Torti SV, Larrick JW, Ringold GM. Modulation of adipocyte differentiation by tumor necrosis factor and transforming growth factor beta. *J. Cell Biol.* 1989;108:1105-13.
152. Palacios-Ortega S, Varela-Guruceaga M, Algarabel M, Ignacio Milagro F, Alfredo Martínez J, de Miguel C. Effect of TNF- α on Caveolin-1 Expression and Insulin Signaling During Adipocyte Differentiation and in Mature Adipocytes. *Cell Physiol Biochem* 2015;36:1499-516.
153. Cawthorn WP, Heyd F, Hegyi K, Sethi JK. Tumour necrosis factor- α inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway. *Cell Death Differ* 2007;14:1361-73.
154. Stemmler F, Simon D, Liphardt AM, Englbrecht M, Rech J, Hueber AJ, et al. Biomechanical properties of bone are impaired in patients with ACPA-positive rheumatoid arthritis and associated with the occurrence of fractures. *Ann. Rheum. Dis.* 2018;77:973-80.

155. Krishnamurthy A, Joshua V, Haj Hensvold A, Jin T, Sun M, Vivar N, et al. Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann. Rheum. Dis.* 2016;75:721-9.
156. Ahmad M, Hachemi Y, Paxian K, Mengele F, Koenen M, Tuckermann J. A Jack of All Trades: Impact of Glucocorticoids on Cellular Cross-Talk in Osteoimmunology. *Front Immunol* 2019;10:2460.
157. Reid IR. Glucocorticoid effects on bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998;83:1860-2.
158. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J. Clin. Invest.* 1998;102:274-82.
159. Hartmann K, Koenen M, Schauer S, Wittig-Blaich S, Ahmad M, Baschant U, et al. Molecular Actions of Glucocorticoids in Cartilage and Bone During Health, Disease, and Steroid Therapy. *Physiol. Rev.* 2016;96:409-47.
160. Frenkel B, White W, Tuckermann J. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015;872:179-215.
161. Morimoto E, Li M, Khalid AB, Krum SA, Chimge NO, Frenkel B. Glucocorticoids Hijack Runx2 to Stimulate Wif1 for Suppression of Osteoblast Growth and Differentiation. *J. Cell. Physiol.* 2017;232:145-53.
162. Weinstein RS. Glucocorticoid-induced osteonecrosis. *Endocrine* 2012;41:183-90.
163. Sivagurunathan S, Muir MM, Brennan TC, Seale JP, Mason RS. Influence of glucocorticoids on human osteoclast generation and activity. *J. Bone Miner. Res.* 2005;20:390-8.
164. Rauch A, Seitz S, Baschant U, Schilling AF, Illing A, Stride B, et al. Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metab.* 2010;11:517-31.
165. Hofbauer LC, Zeitz U, Schoppet M, Skalicky M, Schüler C, Stolina M, et al. Prevention of glucocorticoid-induced bone loss in mice by inhibition of RANKL. *Arthritis Rheum.* 2009;60:1427-37.
166. Buckley L, Guyatt G, Fink HA, Cannon M, Grossman J, Hansen KE, et al. 2017 American College of Rheumatology Guideline for the Prevention and Treatment of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2017;69:1521-37.
167. Minaur NJ, Kounali D, VEDI S, Compston JE, Beresford JN, Bhalla AK. Methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. II. In vivo effects on bone mineral density. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:741-9.

168. di Munno O, Mazzantini M, Sinigaglia L, Bianchi G, Minisola G, Muratore M, et al. Effect of low dose methotrexate on bone density in women with rheumatoid arthritis: results from a multicenter cross-sectional study. *J. Rheumatol.* 2004;31:1305-9.
169. Carbone LD, Kaeley G, McKown KM, Cremer M, Palmieri G, Kaplan S. Effects of long-term administration of methotrexate on bone mineral density in rheumatoid arthritis. *Calcif. Tissue Int.* 1999;64:100-1.
170. Cranney AB, McKendry RJ, Wells GA, Ooi DS, Kanigsberg ND, Kraag GR, et al. The effect of low dose methotrexate on bone density. *J. Rheumatol.* 2001;28:2395-9.
171. Tascioglu F, Oner C, Armagan O. The effect of low-dose methotrexate on bone mineral density in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2003;23:231-5.
172. Torikai E, Kageyama Y, Takahashi M, Nagano A. The effect of methotrexate on bone metabolism markers in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2006;16:350-4.
173. Arai K, Hanyu T, Sugitani H, Murai T, Fujisawa J, Nakazono K, et al. Risk factors for vertebral fracture in menopausal or postmenopausal Japanese women with rheumatoid arthritis: a cross-sectional and longitudinal study. *J. Bone Miner. Metab.* 2006;24:118-24.
174. Vis M, Voskuyl AE, Wolbink GJ, Dijkmans B a. C, Lems WF, OSTRAL Study Group. Bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab. *Ann Rheum Dis* 2005;64:336-7.
175. Vis M, Havaardsholm EA, Haugeberg G, Uhlig T, Voskuyl AE, van de Stadt RJ, et al. Evaluation of bone mineral density, bone metabolism, osteoprotegerin and receptor activator of the NFkappaB ligand serum levels during treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1495-9.
176. Marotte H, Pallot-Prades B, Grange L, Gaudin P, Alexandre C, Miossec P. A 1-year case-control study in patients with rheumatoid arthritis indicates prevention of loss of bone mineral density in both responders and nonresponders to infliximab. *Arthritis Research & Therapy* 2007;9:R61.
177. Chopin F, Garnero P, Henanff A le, Debiais F, Daragon A, Roux C, et al. Long-term effects of infliximab on bone and cartilage turnover markers in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2008;67:353-7.
178. Eekman DA, Vis M, Bultink IEM, Kuik DJ, Voskuyl AE, Dijkmans BAC, et al. Stable bone mineral density in lumbar spine and hip in contrast to bone loss in the hands during long-term treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2011;70:389-90.

179. Wijbrandts CA, Klaasen R, Dijkgraaf MGW, Gerlag DM, van Eck-Smit BLF, Tak PP. Bone mineral density in rheumatoid arthritis patients 1 year after adalimumab therapy: arrest of bone loss. *Ann Rheum Dis* 2009;68:373-6.
180. Krieckaert CLM, Nurmohamed MT, Wolbink G, Lems WF. Changes in bone mineral density during long-term treatment with adalimumab in patients with rheumatoid arthritis: a cohort study. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52:547-53.
181. Gulyás K, Horváth Á, Végh E, Puztai A, Szentpétery Á, Pethö Z, et al. Effects of 1-year anti-TNF- α therapies on bone mineral density and bone biomarkers in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin. Rheumatol.* 2020;39:167-75.
182. Coulson KA, Reed G, Gilliam BE, Kremer JM, Pepmueller PH. Factors influencing fracture risk, T score, and management of osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis in the Consortium of Rheumatology Researchers of North America (CORRONA) registry. *J Clin Rheumatol* 2009;15:155-60.
183. Kume K, Amano K, Yamada S, Kanazawa T, Ohta H, Hatta K, et al. The effect of tocilizumab on bone mineral density in patients with methotrexate-resistant active rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2014;53:900-3.
184. Abu-Shakra M, Zisman D, Balbir-Gurman A, Amital H, Levy Y, Langevitz P, et al. Effect of Tocilizumab on Fatigue and Bone Mineral Density in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Isr. Med. Assoc. J.* 2018;20:239-44.
185. Briot K, Rouanet S, Schaeffer T, Etchepare F, Gaudin P, Perdriger A, et al. The effect of tocilizumab on bone mineral density, serum levels of Dickkopf-1 and bone remodeling markers in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2015;82:109-15.
186. Tada M, Inui K, Sugioka Y, Mamoto K, Okano T, Koike T. Abatacept might increase bone mineral density at femoral neck for patients with rheumatoid arthritis in clinical practice: AIRTIGHT study. *Rheumatol Int* 2018;38:777-84.
187. Wheeler G, Elshahaly M, Naraghi K, Tuck SP, Datta HK, van Laar JM. Changes in bone density and bone turnover in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab, results from an exploratory, prospective study. *PLoS One* [Internet] 2018 [cité 2020 mai 1];13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6078302/>
188. Fuente R, Gehring N, Bettoni C, Gil-Peña H, Alonso-Durán L, Michalke B, et al. Systemic Jak1 activation causes extrarenal calcitriol production and skeletal alterations provoking stunted growth. *FASEB J* 2021;35:e21721.
189. Neubauer H, Cumano A, Müller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 1998;93:397-409.

190. Gerland K, Bataillé-Simoneau N, Baslé M, Fourcin M, Gascan H, Mercier L. Activation of the Jak/Stat signal transduction pathway in GH-treated rat osteoblast-like cells in culture. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000;168:1-9.
191. Joung YH, Lim EJ, Darvin P, Chung SC, Jang JW, Do Park K, et al. MSM enhances GH signaling via the Jak2/STAT5b pathway in osteoblast-like cells and osteoblast differentiation through the activation of STAT5b in MSCs. *PLoS ONE* 2012;7:e47477.
192. Dieudonne FX, Sévère N, Biosse-Duplan M, Weng JJ, Su Y, Marie PJ. Promotion of osteoblast differentiation in mesenchymal cells through Cbl-mediated control of STAT5 activity. *Stem Cells* 2013;31:1340-9.
193. Kim S, Koga T, Isobe M, Kern BE, Yokochi T, Chin YE, et al. Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation. *Genes Dev.* 2003;17:1979-91.
194. Tajima K, Takaishi H, Takito J, Tohmonda T, Yoda M, Ota N, et al. Inhibition of STAT1 accelerates bone fracture healing. *J. Orthop. Res.* 2010;28:937-41.
195. Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94:3801-4.
196. Li J. JAK-STAT and bone metabolism. *JAKSTAT* 2013;2:e23930.
197. Grimbacher B, Holland SM, Gallin JI, Greenberg F, Hill SC, Malech HL, et al. Hyper-IgE syndrome with recurrent infections--an autosomal dominant multisystem disorder. *N. Engl. J. Med.* 1999;340:692-702.
198. Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, et al. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2007;357:1608-19.
199. Dalagiorgou G, Piperi C, Adamopoulos C, Georgopoulou U, Gargalionis AN, Spyropoulou A, et al. Mechanosensor polycystin-1 potentiates differentiation of human osteoblastic cells by upregulating Runx2 expression via induction of JAK2/STAT3 signaling axis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017;74:921-36.
200. Stephens JM, Morrison RF, Pilch PF. The expression and regulation of STATs during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:10441-4.
201. Zhang K, Guo W, Yang Y, Wu J. JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBP β transcription. *Journal of Cellular Biochemistry* 2011;112:488-97.
202. Wang D, Zhou Y, Lei W, Zhang K, Shi J, Hu Y, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates adipocyte differentiation via peroxisome-proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *Biology of the Cell* 2010;102:1-12.

203. Cantwell MT, Farrar JS, Lownik JC, Meier JA, Hyun M, Raje V, et al. STAT3 suppresses Wnt/ β -catenin signaling during the induction phase of primary Myf5+ brown adipogenesis. *Cytokine* 2018;111:434-44.
204. Yuan Y, Xi Y, Chen J, Zhu P, Kang J, Zou Z, et al. STAT3 stimulates adipogenic stem cell proliferation and cooperates with HMGA2 during the early stage of differentiation to promote adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017;482:1360-6.
205. Deng J, Hua K, Caveney EJ, Takahashi N, Harp JB. Protein inhibitor of activated STAT3 inhibits adipogenic gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006;339:923-31.
206. Deng J, Hua K, Lesser SS, Harp JB. Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 during Proliferative Phases of 3T3-L1 Adipogenesis. *Endocrinology* 2000;141:2370-6.
207. Cernkovich ER, Deng J, Hua K, Harp JB. Midkine Is an Autocrine Activator of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in 3T3-L1 Cells. *Endocrinology* 2007;148:1598-604.
208. Machinal-Quélin F, Dieudonné MN, Leneveu MC, Pecquery R, Giudicelli Y. Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2002;282:C853-63.
209. Jung HS, Lee YJ, Kim YH, Paik S, Kim JW, Lee JW. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma/signal transducers and activators of transcription 5A pathway plays a key factor in adipogenesis of human bone marrow-derived stromal cells and 3T3-L1 preadipocytes. *Stem Cells Dev.* 2012;21:465-75.
210. Shang CA, Waters MJ. Constitutively Active Signal Transducer and Activator of Transcription 5 Can Replace the Requirement for Growth Hormone in Adipogenesis of 3T3-F442A Preadipocytes. *Mol Endocrinol* 2003;17:2494-508.
211. Meraz MA, White JM, Sheehan KCF, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, et al. Targeted Disruption of the Stat1 Gene in Mice Reveals Unexpected Physiologic Specificity in the JAK–STAT Signaling Pathway. *Cell* 1996;84:431-42.
212. Sisler JD, Morgan M, Raje V, Grande RC, Derecka M, Meier J, et al. The Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) Inhibits Mitochondrial Biogenesis in Liver and Fatty Acid Oxidation in Adipocytes. *PLoS ONE* 2015;10:e0144444.
213. Vidal B, Cascão R, Finnilä MAJ, Lopes IP, da Glória VG, Saarakkala S, et al. Effects of tofacitinib in early arthritis-induced bone loss in an adjuvant-induced arthritis rat model. *Rheumatology (Oxford)* 2018;57:1461-71.

214. Adam S, Simon N, Steffen U, Andes FT, Scholtysek C, Müller DIH, et al. JAK inhibition increases bone mass in steady-state conditions and ameliorates pathological bone loss by stimulating osteoblast function. *Sci Transl Med* 2020;12.
215. Gaber T, Brinkman ACK, Pienczikowski J, Diesing K, Damerau A, Pfeiffenberger M, et al. Impact of Janus Kinase Inhibition with Tofacitinib on Fundamental Processes of Bone Healing. *Int J Mol Sci* 2020;21.
216. Hamar A, Szekanecz Z, Pusztai A, Czókolyová M, Végh E, Pethő Z, et al. Effects of one-year tofacitinib therapy on bone metabolism in rheumatoid arthritis. *Osteoporos Int* 2021;32:1621-9.
217. Letarouilly JG, Flipo RM, Cortet B, Tournadre A, Paccou J. Body composition in patients with rheumatoid arthritis: a narrative literature review. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal* 2021;13:1759720X211015006.
218. Bartels CM, Bell CL, Shinki K, Rosenthal A, Bridges AJ. Changing trends in serious extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis among United State veterans over 20 years. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:1670-5.
219. 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;76:1057-63.
220. Yoshida T, Hashimoto M, Kawahara R, Yamamoto H, Tanaka M, Ito H, et al. Non-obese visceral adiposity is associated with the risk of atherosclerosis in Japanese patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Rheumatol. Int.* 2018;38:1679-89.
221. Chodara AM, Wattiaux A, Bartels CM. Managing Cardiovascular Disease Risk in Rheumatoid Arthritis: Clinical Updates and Three Strategic Approaches. *Curr Rheumatol Rep* 2017;19:16.
222. Agca R, Heslinga SC, Rollefstad S, Heslinga M, McInnes IB, Peters MJL, 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.* 2017;76:17-28.
223. Book C, Karlsson MK, Akesson K, Jacobsson LTH. Early rheumatoid arthritis and body composition. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:1128-32.
224. Giles JT, Ling SM, Ferrucci L, Bartlett SJ, Andersen RE, Towns M, et al. Abnormal body composition phenotypes in older rheumatoid arthritis patients: association with disease characteristics and pharmacotherapies. *Arthritis Rheum* 2008;59:807-15.
225. Engvall IL, Brismar K, Hafström I, Tengstrand B. Treatment with low-dose prednisolone is associated with altered body composition but no difference in bone mineral density in rheumatoid arthritis patients: a controlled cross-sectional study. *Scand J Rheumatol* 2011;40:161-8.

226. Toussiroit É, Mourot L, Dehecq B, Wendling D, Grandclément É, Dumoulin G, et al. TNF α blockade for inflammatory rheumatic diseases is associated with a significant gain in android fat mass and has varying effects on adipokines: a 2-year prospective study. *Eur J Nutr* 2014;53:951-61.
227. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing* 2019;48:16-31.
228. Cui C, Mackey RH, Shaaban CE, Kuller LH, Lopez OL, Sekikawa A. Associations of body composition with incident dementia in older adults: Cardiovascular Health Study-Cognition Study. *Alzheimers Dement* 2020;16:1402-11.
229. Tournadre A, Vial G, Capel F, Soubrier M, Boirie Y. Sarcopenia. *Joint Bone Spine* 2019;86:309-14.
230. Radkowski MJ, Sławiński P, Targowski T. Osteosarcopenia in rheumatoid arthritis treated with glucocorticosteroids - essence, significance, consequences. *Reumatologia* 2020;58:101-6.
231. Stanley A, Schuna J, Yang S, Kennedy S, Heo M, Wong M, et al. Distinct phenotypic characteristics of normal-weight adults at risk of developing cardiovascular and metabolic diseases. *Am J Clin Nutr* 2020;112:967-78.
232. Shetty S, Kapoor N, Thomas N, Paul TV. DXA Measured Visceral Adipose Tissue, Total Fat, Anthropometric Indices and its Association With Cardiometabolic Risk Factors in Mother-Daughter Pairs From India. *J Clin Densitom* 2021;24:146-55.
233. Chen Y, He D, Yang T, Zhou H, Xiang S, Shen L, et al. Relationship between body composition indicators and risk of type 2 diabetes mellitus in Chinese adults. *BMC Public Health* 2020;20:452.
234. Wang Z, Wang ZM, Heymsfield SB. History of the study of human body composition: A brief review. *Am J Hum Biol.* 1999;11:157-65.
235. Mazzocchi G. Body composition: Where and when. *Eur J Radiol* 2016;85:1456-60.
236. Ward LC. Human body composition: yesterday, today, and tomorrow. *Eur J Clin Nutr* 2018;72:1201-7.
237. Kuriyan R. Body composition techniques. *Indian J Med Res* 2018;148:648-58.
238. Rothman MS, Miller PD, Lewiecki EM, Bilezikian JP. Bone density testing: science, the media, and patient care. *Curr Osteoporos Rep* 2014;12:227-9.
239. Bazzocchi A, Diano D, Ponti F, Salizzoni E, Albisinni U, Marchesini G, et al. A 360-degree overview of body composition in healthy people: relationships among anthropometry, ultrasonography, and dual-energy x-ray absorptiometry. *Nutrition* 2014;30:696-701.

240. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 2010;39:412-23.
241. Piché ME, Tchernof A, Després JP. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ Res* 2020;126:1477-500.
242. Kobayashi M, Ogawa S, Tayama J, Sagara I, Takeoka A, Bernick P, et al. Intra-abdominal fat accumulation is an important predictor of metabolic syndrome in young adults. *Medicine (Baltimore)* 2020;99:e22202.
243. Tewari N, Awad S, Macdonald IA, Lobo DN. A comparison of three methods to assess body composition. *Nutrition* 2018;47:1-5.
244. Morrell GR, Ikizler TA, Chen X, Heilbrun ME, Wei G, Boucher R, et al. Psoas Muscle Cross-sectional Area as a Measure of Whole-body Lean Muscle Mass in Maintenance Hemodialysis Patients. *J Ren Nutr* 2016;26:258-64.
245. Ceniccola GD, Castro MG, Piovacari SMF, Horie LM, Corrêa FG, Barrere APN, et al. Current technologies in body composition assessment: advantages and disadvantages. *Nutrition* 2018;62:25-31.
246. Buffa R, Mereu E, Succa V, Latini V, Marini E. Specific BIVA recognizes variation of body mass and body composition: Two related but different facets of nutritional status. *Nutrition* 2017;35:1-5.
247. Böhm A, Heitmann BL. The use of bioelectrical impedance analysis for body composition in epidemiological studies. *Eur J Clin Nutr* 2013;67 Suppl 1:S79-85.
248. Bosaeus I, Wilcox G, Rothenberg E, Strauss BJ. Skeletal muscle mass in hospitalized elderly patients: comparison of measurements by single-frequency BIA and DXA. *Clin Nutr* 2014;33:426-31.
249. Shuhart CR, Yeap SS, Anderson PA, Jankowski LG, Lewiecki EM, Morse LR, et al. Executive Summary of the 2019 ISCD Position Development Conference on Monitoring Treatment, DXA Cross-calibration and Least Significant Change, Spinal Cord Injury, Peri-prosthetic and Orthopedic Bone Health, Transgender Medicine, and Pediatrics. *J Clin Densitom* 2019;22:453-71.
250. Santilli V, Bernetti A, Mangone M, Paoloni M. Clinical definition of sarcopenia. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2014;11:177-80.
251. Beudart C, Zaaria M, Pasleau F, Reginster JY, Bruyère O. Health Outcomes of Sarcopenia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 2017;12:e0169548.
252. Chin SO, Rhee SY, Chon S, Hwang YC, Jeong IK, Oh S, et al. Sarcopenia is independently associated with cardiovascular disease in older Korean adults: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) from 2009. *PLoS One* 2013;8:e60119.

253. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2569-81.
254. Karampinos DC, Yu H, Shimakawa A, Link TM, Majumdar S. T₁-corrected fat quantification using chemical shift-based water/fat separation: application to skeletal muscle. *Magn Reson Med* 2011;66:1312-26.
255. Baillet A, Gossec L, Carmona L, Wit M de, van Eijk-Hustings Y, Bertheussen H, et al. Points to consider for reporting, screening for and preventing selected comorbidities in chronic inflammatory rheumatic diseases in daily practice: a EULAR initiative. *Ann. Rheum. Dis.* 2016;75:965-73.
256. Hardouin P, Pansini V, Cortet B. Bone marrow fat. *Joint Bone Spine* 2014;81:313-9.
257. Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2001;2:165-71.
258. Duque G. Bone and fat connection in aging bone. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:429-34.
259. Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. Playing with bone and fat. *J Cell Biochem* 2006;98:251-66.
260. Li Y, Meng Y, Yu X. The Unique Metabolic Characteristics of Bone Marrow Adipose Tissue. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:69.
261. Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2:35-43.
262. Russell T, Rowe H, Bridgwood C, Cuthbert RJ, Watad A, Newton D, et al. Tofacitinib Blocks Enteseal Lymphocyte Activation and Modulates MSC Adipogenesis, but Does Not Directly Affect Chondro- and Osteogenesis. *Immuno* 2021;1:545-57.
263. Zhang K, Guo W, Yang Y, Wu J. JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBP β transcription. *J Cell Biochem* 2011;112:488-97.
264. Deng J, Hua K, Lesser SS, Harp JB. Activation of signal transducer and activator of transcription-3 during proliferative phases of 3T3-L1 adipogenesis. *Endocrinology* 2000;141:2370-6.
265. Ostrovskiy D, Rumpf T, Eib J, Lumbroso A, Slynko I, Klaeger S, et al. Tofacitinib and analogs as inhibitors of the histone kinase PRK1 (PKN1). *Future Med Chem* 2016;8:1537-51.

266. Eberl HC, Werner T, Reinhard FB, Lehmann S, Thomson D, Chen P, et al. Chemical proteomics reveals target selectivity of clinical Jak inhibitors in human primary cells. *Sci Rep* 2019;9:14159.
267. Zhao B. TNF and Bone Remodeling. *Curr Osteoporos Rep* 2017;15:126-34.
268. Gaber T, Brinkman ACK, Pienczikowski J, Diesing K, Damerau A, Pfeiffenberger M, et al. Impact of Janus Kinase Inhibition with Tofacitinib on Fundamental Processes of Bone Healing. *Int J Mol Sci* 2020;21.
269. Wagegg M, Gaber T, Lohanatha FL, Hahne M, Strehl C, Fangradt M, et al. Hypoxia promotes osteogenesis but suppresses adipogenesis of human mesenchymal stromal cells in a hypoxia-inducible factor-1 dependent manner. *PLoS One* 2012;7:e46483.
270. Yang J, Xie X. Tofacitinib protects intestinal epithelial cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury by inhibiting the JAK/STAT3 signaling pathway. *Exp Ther Med* 2021;22:1108.
271. Hansen KE, Mortezaei M, Nagy E, Wang C, Connell CA, Radi Z, et al. Fracture in clinical studies of tofacitinib in rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2022;14:1759720X221142346.
272. Engvall IL, Tengstrand B, Brismar K, Hafström I. Infliximab therapy increases body fat mass in early rheumatoid arthritis independently of changes in disease activity and levels of leptin and adiponectin: a randomised study over 21 months. *Arthritis Res. Ther.* 2010;12:R197.
273. Marcora SM, Chester KR, Mittal G, Lemmey AB, Maddison PJ. Randomized phase 2 trial of anti-tumor necrosis factor therapy for cachexia in patients with early rheumatoid arthritis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006;84:1463-72.
274. Serelis J, Kontogianni MD, Katsiogiannis S, Bletsas M, Tektonidou MG, Skopouli FN. Effect of anti-TNF treatment on body composition and serum adiponectin levels of women with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 2008;27:795-7.
275. Metsios GS, Stavropoulos-Kalinoglou A, Douglas KMJ, Koutedakis Y, Nevill AM, Panoulas VF, et al. Blockade of tumour necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: effects on components of rheumatoid cachexia. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:1824-7.
276. van den Oever I a. M, Baniaamam M, Simsek S, Raterman HG, van Denderen JC, van Eijk IC, et al. The effect of anti-TNF treatment on body composition and insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2021;41:319-28.
277. Tournadre A, Pereira B, Dutheil F, Giraud C, Courteix D, Sapin V, et al. Changes in body composition and metabolic profile during interleukin 6 inhibition in rheumatoid arthritis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2017;8:639-46.

278. Toussirot E, Marotte H, Mulleman D, Cormier G, Coury F, Gaudin P, et al. Increased high molecular weight adiponectin and lean mass during tocilizumab treatment in patients with rheumatoid arthritis: a 12-month multicentre study. *Arthritis Res Ther* 2020;22:224.
279. Vial G, Lambert C, Pereira B, Couderc M, Malochet-Guinamand S, Mathieu S, et al. The Effect of TNF and Non-TNF-Targeted Biologics on Body Composition in Rheumatoid Arthritis. *J Clin Med* 2021;10.
280. Baker JF, England BR, George MD, Wysham K, Johnson T, Lenert A, et al. Adipocytokines and achievement of low disease activity in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2022;55:152003.
281. Baker JF, England BR, George MD, Wysham K, Johnson T, Kunkel G, et al. Elevations in adipocytokines and mortality in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2022;61:4924-34.
282. Federico LE, Johnson TM, England BR, Wysham KD, George MD, Sauer B, et al. Circulating Adipokines and Associations With Incident Cardiovascular Disease in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2022;
283. Letarouilly JG, Paccou J, Badr S, Chauveau C, Broux O, Clabaut A. Stimulatory Effect of Tofacitinib on Bone Marrow Adipocytes Differentiation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:881699.
284. Book C, Karlsson MK, Nilsson JÅ, Akesson K, Jacobsson LTH. Changes in body composition after 2 years with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2011;40:95-100.
285. Dao HH, Do QT, Sakamoto J. Abnormal body composition phenotypes in Vietnamese women with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50:1250-8.
286. Turk SA, van Schaardenburg D, Boers M, de Boer S, Fokker C, Lems WF, et al. An unfavorable body composition is common in early arthritis patients: A case control study. *PLoS One* 2018;13:e0193377.
287. Müller R, Kull M, Pölluste K, Valner A, Lember M, Kallikorm R. Factors Associated With Low Lean Mass in Early Rheumatoid Arthritis: A Cross-Sectional Study. *Medicina (Kaunas)* 2019;55.
288. Wang Q, Li D, Cao G, Shi Q, Zhu J, Zhang M, et al. IL-27 signalling promotes adipocyte thermogenesis and energy expenditure. *Nature* 2021;600:314-8.
289. He GW, Lin L, DeMartino J, Zheng X, Staliarova N, Dayton T, et al. Optimized human intestinal organoid model reveals interleukin-22-dependency of paneth cell formation. *Cell Stem Cell* 2022;29:1333-1345.e6.
290. Ytterberg SR, Bhatt DL, Mikuls TR, Koch GG, Fleischmann R, Rivas JL, et al. Cardiovascular and Cancer Risk with Tofacitinib in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2022;386:316-26.

291. Badr S, Legroux-Gérot I, Vignau J, Chauveau C, Ruschke S, Karampinos DC, et al. Comparison of regional bone marrow adiposity characteristics at the hip of underweight and weight-recovered women with anorexia nervosa using magnetic resonance spectroscopy. *Bone* 2019;127:135-45.
292. Beekman KM, Duque G, Corsi A, Tencerova M, Bisschop PH, Paccou J. Osteoporosis and Bone Marrow Adipose Tissue. *Curr Osteoporos Rep* 2022;
293. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 2000;43:30-7.
294. Stahl EA, Wegmann D, Trynka G, Gutierrez-Achury J, Do R, Voight BF, et al. Bayesian inference analyses of the polygenic architecture of rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 2012;44:483-9.
295. Padyukov L, Seielstad M, Ong RTH, Ding B, Rönnelid J, Seddighzadeh M, et al. A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2011;70:259-65.
296. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987;30:1205-13.
297. El-Gabalawy HS, Robinson DB, Daha NA, Oen KG, Smolik I, Elias B, et al. Non-HLA genes modulate the risk of rheumatoid arthritis associated with HLA-DRB1 in a susceptible North American Native population. *Genes Immun.* 2011;12:568-74.
298. Scally SW, Law SC, Ting YT, Heemst J van, Sokolove J, Deutsch AJ, et al. Molecular basis for increased susceptibility of Indigenous North Americans to seropositive rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2017;76:1915-23.
299. Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.* 1992;117:801-6.
300. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 2014;506:376-81.
301. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat. Genet.* 2010;42:508-14.
302. Karlson EW, Chibnik LB, Kraft P, Cui J, Keenan BT, Ding B, et al. Cumulative association of 22 genetic variants with seropositive rheumatoid arthritis risk. *Ann. Rheum. Dis.* 2010;69:1077-85.

303. Viatte S, Massey J, Bowes J, Duffus K, arcOGEN Consortium, Eyre S, et al. Replication of Associations of Genetic Loci Outside the HLA Region With Susceptibility to Anti-Cyclic Citrullinated Peptide-Negative Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology* (Hoboken, N.J.) 2016;68:1603-13.
304. Viatte S, Plant D, Bowes J, Lunt M, Eyre S, Barton A, et al. Genetic markers of rheumatoid arthritis susceptibility in anti-citrullinated peptide antibody negative patients. *Ann. Rheum. Dis.* 2012;71:1984-90.
305. Trynka G, Sandor C, Han B, Xu H, Stranger BE, Liu XS, et al. Chromatin marks identify critical cell types for fine mapping complex trait variants. *Nat. Genet.* 2013;45:124-30.
306. Gomez-Cabrero D, Almgren M, Sjöholm LK, Hensvold AH, Ringh MV, Tryggvadottir R, et al. High-specificity bioinformatics framework for epigenomic profiling of discordant twins reveals specific and shared markers for ACPA and ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Genome Med* 2016;8:124.
307. Liu Y, Aryee MJ, Padyukov L, Fallin MD, Hesselberg E, Runarsson A, et al. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat. Biotechnol.* 2013;31:142-7.
308. Meng W, Zhu Z, Jiang X, Too CL, Uebe S, Jagodic M, et al. DNA methylation mediates genotype and smoking interaction in the development of anti-citrullinated peptide antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2017;19:71.
309. Frank-Bertoncelj M, Trenkmann M, Klein K, Karouzakis E, Rehrauer H, Bratus A, et al. Epigenetically-driven anatomical diversity of synovial fibroblasts guides joint-specific fibroblast functions. *Nat Commun* 2017;8:14852.
310. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol* 2014;35:347-69.
311. Crowson CS, Matteson EL, Myasoedova E, Michet CJ, Ernste FC, Warrington KJ, et al. The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2011;63:633-9.
312. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2006;36:182-8.
313. Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, et al. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann. Rheum. Dis.* 2010;69:70-81.
314. Vesperini V, Lukas C, Fautrel B, Le Loet X, Rincheval N, Combe B. Association of tobacco exposure and reduction of radiographic progression in early rheumatoid arthritis: results from a French multicenter cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013;65:1899-906.

315. Källberg H, Ding B, Padyukov L, Bengtsson C, Rönnelid J, Klareskog 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;70:508-11.
316. Sokolove J, Wagner CA, Lahey LJ, Sayles H, Duryee MJ, Reimold AM, et al. Increased inflammation and disease activity among current cigarette smokers with rheumatoid arthritis: a cross-sectional analysis of US veterans. *Rheumatology (Oxford)* 2016;55:1969-77.
317. Svendsen AJ, Gervin K, Lyle R, Christiansen L, Kyvik K, Junker P, et al. Differentially Methylated DNA Regions in Monozygotic Twin Pairs Discordant for Rheumatoid Arthritis: An Epigenome-Wide Study. *Front Immunol* 2016;7:510.
318. Stolt P, Källberg H, Lundberg I, Sjögren B, Klareskog L, Alfredsson L, et al. Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. *Ann. Rheum. Dis.* 2005;64:582-6.
319. Webber MP, Moir W, Zeig-Owens R, Glaser MS, Jaber N, Hall C, et al. Nested case-control study of selected systemic autoimmune diseases in World Trade Center rescue/recovery workers. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2015;67:1369-76.
320. Too CL, Muhamad NA, Ilar A, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, et al. Occupational exposure to textile dust increases the risk of rheumatoid arthritis: results from a Malaysian population-based case-control study. *Ann. Rheum. Dis.* 2016;75:997-1002.
321. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2015;15:30-44.
322. Kharlamova N, Jiang X, Sherina N, Potempa B, Israelsson L, Quirke AM, et al. Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Indicate Interaction Between Oral Infection, Smoking, and Risk Genes in Rheumatoid Arthritis Etiology. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2016;68:604-13.
323. Chen J, Wright K, Davis JM, Jeraldo P, Marietta EV, Murray J, et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Med* 2016;8:43.
324. Scher JU, Sczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, Bielski C, et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife* 2013;2:e01202.
325. Pianta A, Arvikar SL, Strle K, Drouin EE, Wang Q, Costello CE, et al. Two rheumatoid arthritis-specific autoantigens correlate microbial immunity with autoimmune responses in joints. *J. Clin. Invest.* 2017;127:2946-56.

326. Naciute M, Mieliauskaite D, Rugiene R, Nikitenkiene R, Jancoriene L, Mauricas M, et al. Frequency and significance of parvovirus B19 infection in patients with rheumatoid arthritis. *J. Gen. Virol.* 2016;97:3302-12.
327. Gasque P, Bandjee MCJ, Reyes MM, Viasus D. Chikungunya Pathogenesis: From the Clinics to the Bench. *J. Infect. Dis.* 2016;214:S446-8.
328. Tan EM, Smolen JS. Historical observations contributing insights on etiopathogenesis of rheumatoid arthritis and role of rheumatoid factor. *J. Exp. Med.* 2016;213:1937-50.
329. Ljung L, Rantapää-Dahlqvist S. Abdominal obesity, gender and the risk of rheumatoid arthritis - a nested case-control study. *Arthritis Res. Ther.* 2016;18:277.
330. Lee YC, Agnew-Blais J, Malspeis S, Keyes K, Costenbader K, Kubzansky LD, et al. Post-Traumatic Stress Disorder and Risk for Incident Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2016;68:292-8.
331. Holers VM. Autoimmunity to citrullinated proteins and the initiation of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol* 2013;25:728-35.
332. Muller S, Radic M. Citrullinated Autoantigens: From Diagnostic Markers to Pathogenetic Mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol* 2015;49:232-9.
333. Trouw LA, Huizinga TWJ, Toes REM. Autoimmunity in rheumatoid arthritis: different antigens--common principles. *Ann Rheum Dis* 2013;72 Suppl 2:ii132-136.
334. Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MHMT, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004;50:380-6.
335. Deane KD, O'Donnell CI, Hueber W, Majka DS, Lazar AA, Derber LA, et al. The number of elevated cytokines and chemokines in preclinical seropositive rheumatoid arthritis predicts time to diagnosis in an age-dependent manner. *Arthritis Rheum* 2010;62:3161-72.
336. Arend WP, Firestein GS. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:573-86.
337. Histologie et physiologie de la membrane synoviale - ClinicalKey Student [Internet]. [cité 2022 sept 3]; Available from: <https://www-clinicalkey-com.ressources-electroniques.univ-lille.fr/student/content/emc/51-s2.0-S0246052108417011>
338. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010;233:233-55.

339. Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med* 2009;15:1414-20.
340. Flanagan ME, Blumenkopf TA, Brissette WH, Brown MF, Casavant JM, Shang-Poa C, et al. Discovery of CP-690,550: a potent and selective Janus kinase (JAK) inhibitor for the treatment of autoimmune diseases and organ transplant rejection. *J Med Chem* 2010;53:8468-84.
341. Russell SM, Tayebi N, Nakajima H, Riedy MC, Roberts JL, Aman MJ, et al. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* 1995;270:797-800.
342. Casanova JL, Holland SM, Notarangelo LD. Inborn errors of human JAKs and STATs. *Immunity* 2012;36:515-28.

Annexes

Annexe I Facteurs de risques de la PR

I. Génétique

La PR est une maladie hétérogène avec une présentation clinique et une sévérité variable selon les individus. Il existe un terrain génétique avec une héritabilité d'environ 60 % selon les études de jumeaux [293]. Cette héritabilité est surtout vraie pour les patients séropositifs pour les ACPA [294], au contraire des patients séronégatifs où le lien est plus faible [295]. La concordance des jumeaux monozygotes n'est seulement que de 12 %, indiquant le rôle important de facteurs non-codants dans la susceptibilité de développer cette maladie.

L'épitope partagé correspond à une séquence d'acides aminés avec une forte association à la PR [296]. Elle est encodée par certains allèles du locus *Human Leukocyte Antigen (HLA) -antigen D related (DR)*, particulièrement *HLA-DRB1* 01* et *HLA-DRB1* 04*. Ainsi, une part importante des populations amérindiennes possèdent l'épitope partagée expliquant la forte prévalence de la PR dans ces populations [297,298]. D'autres locus à risque ont été identifiés, mais les associations sont plus faibles. La majorité concerne des voies de signalisation immunes ou inflammatoires [299,300]. Les études d'association pangénomique ont identifié une centaine de locus ayant des variants de susceptibilité à la PR [301]. La majorité des allèles a une association faible avec la PR. Néanmoins, un effet cumulatif modéré a été observé lorsque plusieurs allèles à risque étaient présents [302].

De plus, il existe des différences génétiques entre les patients immunopositifs pour les ACPA et ceux immunonégatifs. Par exemple, les variants des gènes *HLA DRB1*, *PTPN22*, *BLK*, *ANKRD55* et *IL6ST* sont associés à la PR quel que soit le statut sérologique tandis que les variants des gènes *AFF3*, *CD28* et *TNFAIP3* ne sont retrouvés que chez les patients séropositifs et *PRL* et *NFIA* chez les patients séronégatifs [303,304].

II. Épigénétique

Les études ont montré que les variants associés à la PR étaient enrichis en marqueurs épigénétiques de chromatine active dans des lymphocytes T CD4 [305]. Chez les jumeaux homozygotes discordants pour la PR, le niveau de méthylation de l'ADN du gène *EXOSC1* (codant pour une protéine impliquée dans la dégradation de l'ARN) différait entre le jumeau atteint et le jumeau sain [306]. La plus importante étude sur la méthylation de l'ADN dans la PR chez des individus non apparentés a identifié neuf clusters avec un patron de méthylation différent dans la région HLA comparés aux contrôles sains, suggérant que l'effet génétique des variants à risque HLA agit, en partie, en raison du niveau de méthylation de l'ADN [307]. Le niveau de méthylation d'ADN peut être influencé par des facteurs environnementaux. Par exemple, chez les fumeurs, les niveaux de méthylation sont plus élevés chez les individus atteints de PR et séropositifs pour les ACPA qui sont porteurs de l'allèle à risque *HLA-DRB1* que ceux qui n'ont pas cet allèle. Cette différence de méthylation de l'ADN n'était pas observée chez les non-fumeurs [308].

Deux études ont également rapporté une différence de patrons de méthylation d'ADN et de transcription dans les synoviocytes fibroblastiques de différentes articulations de patients atteints de PR. Cette observation pourrait expliquer pourquoi la PR atteint plus sévèrement certaines articulations comme celles des mains [309].

III. Le genre

Les femmes ont généralement deux à trois fois plus de risque de développer une PR que les hommes[310]. Le risque cumulé au cours de la vie de développer une PR est estimé à 3,6 % pour les femmes et à 1,7 % pour les hommes [311]. La fréquence plus élevée chez les femmes a été attribuée en partie aux effets stimulants de l'œstrogène sur le système immunitaire. Cependant, le rôle des facteurs hormonaux dans le développement de la PR reste controversé. La nulliparité augmente souvent le risque de PR, tandis que la grossesse est associée à la rémission de la maladie et le post-partum à un risque de poussées. La plupart des femmes présentent des symptômes vers l'âge de 50 ans et à la ménopause. Les hommes ont un début dans la maladie plus tardif et sont plus à risque d'être séropositifs pour le facteur rhumatoïde et d'avoir des titres plus élevés d'ACPA [312].

IV. Le tabac

Le tabagisme augmente le risque de développer une PR de manière graduelle. Le risque est doublé chez les fumeurs actifs ayant une consommation de 20 paquets-années par rapport à des non-fumeurs [313,314]. L'association entre le tabagisme et la PR est la plus forte ou même limitée à la maladie ACPA-positif chez les personnes ayant au moins une copie de l'épitope partagé [315]. En effet, l'interaction entre l'épitope partagé et le tabagisme peut augmenter le risque de 20 fois ou plus par rapport aux non-fumeurs qui ne sont pas porteurs de l'épitope partagé [315]. Le tabagisme actif est associé à des niveaux accrus de cytokines pro-inflammatoires et à une activité plus élevée de la maladie [316]. Le risque augmenté de PR associé au tabagisme pourrait être lié à des modifications épigénétiques, car le tabagisme est significativement associé à l'hypométhylation de certaines régions de l'ADN, alors que les traitements de fond (Disease-Modifying AntiRheumatic Drugs ou DMARDs) induisent une hyperméthylation de ces mêmes régions [317].

V. Inhalation de poussière

L'exposition professionnelle à la silice, notamment chez les mineurs, est un facteur de risque environnemental connu de la PR [318]. Une étude des pompiers et autres intervenants d'urgence exposés à la poussière sur le site de l'effondrement du World Trade Center a révélé un risque accru de maladies auto-immunes systémiques, dont la PR [319]. La poussière contenait du ciment pulvérisé, de la silice, de l'amiante, des fibres de verre et d'autres matériaux.

L'exposition professionnelle à la poussière textile s'est également avérée être associée de manière significative à un risque accru de développer une PR dans une population de femmes malaisiennes [320], quel que soit le statut sérologique pour les ACPA.

VI. Le microbiote

Les parodontopathies sont également associées au risque de développer une PR [321]. Bien que ce soient deux entités distinctes, la PR et les parodontopathies présentent des similarités avec une inflammation chronique et des érosions osseuses. L'association entre ces deux entités est en partie médiée par le microbiote oral, par exemple *Porphyromonas gingivalis* [322] et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [20].

Outre le microbiote parodontal, le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle important dans la maladie. La diversité du microbiote intestinal est réduite chez les personnes atteintes de PR par rapport à la population générale. En effet, des taxons rares, tels que les actinobactéries, se développent chez les personnes atteintes de PR, tandis que la diversité des taxons abondants est réduite [323]. Il est intéressant de noter que les taux intestinaux de *Prevotella copri* semblent marquer le début de la maladie, car cette bactérie est plus fréquente chez les patients atteints de PR d'apparition récente non traités que chez ceux dont la PR est établie ou chez les témoins sains [324]. Par ailleurs, des auto-antigènes présentés par les molécules HLA-DR de patients atteints de PR peuvent présenter une homologie de séquence significative avec les peptides de *Prevotella sp.* et d'autres espèces de bacilles intestinaux [325]. Ce dernier point soutient un lien entre l'environnement, l'auto-immunité et la maladie.

En ce qui concerne les virus, le rôle de l'infection par le parvovirus B19 dans la PR reste encore à élucider [326], mais l'infection par le virus Chikungunya, qui entraîne généralement des polyarthralgies aiguës (peut parfois évoluer vers des pathologies de type PR [327]. Il est intéressant de noter que l'infection par le virus Epstein-Barr (EBV) est associée à la PR et à d'autres troubles auto-immuns depuis de nombreuses décennies[328].

VII. Autres

Certains facteurs de risque associés à la PR sont modifiables, car liés au mode de vie. Par exemple, l'obésité est associée à un OR de 1,25 pour les personnes ayant un indice de masse corporelle ≥ 30 kg/m² par rapport à celles ayant un IMC de < 25 kg/m² [329]. Le stress post-traumatique peut être aussi associé à un risque accru de développer une PR [330].

Annexe II Modèle physiopathologique actuel sur l'initiation et la progression de la PR

I. Acteurs cytokiniques

À la suite de la citrullination et d'autres modifications post-traductionnelles (par exemple l'acétylation ou la carbamylation), les peptides modifiés se lient à l'hétérodimère du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), surtout ceux ayant l'épitope partagé, entraînant une présentation de ces antigènes aux lymphocytes T qui vont stimuler les lymphocytes B, qui vont, à leur tour, produire une gamme d'autoanticorps dont les facteurs rhumatoïdes et les ACPA (**Figure Annexe IIb**) [331–333].

La présence d'ACPA, de facteurs rhumatoïdes, de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires peut être détectée dans le sérum de patients jusqu'à 10 ans avant l'apparition de signes cliniques [334,335]. La présence d'ACPA n'est pas suffisante pour entraîner l'apparition de synovites cliniques caractérisées par l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'afflux de cellules inflammatoires dans la synovie. Un deuxième acteur doit participer, comme par exemple, la formation de complexes immuns, l'activation du complément ou l'atteinte microvasculaire (**Figure Annexe II c,d**) [336].

II. Acteurs articulaires

Au niveau de l'articulation, un des principaux acteurs du développement de la PR est la membrane synoviale. À l'état physiologique, la membrane synoviale a deux rôles : la production de lubrifiant pour le coulisement des surfaces articulaires (le liquide articulaire) et l'apport en nutriments au cartilage qui n'est pas vascularisé. La membrane synoviale tapisse la face interne des articulations diarthrodiales (dont la fonction principale est de permettre la locomotion), des gaines de tendons et des bourses.

Elle est formée de deux couches : une intimale ou bordante et la sous-intima, tissu conjonctif lâche sous-jacent. La couche intimale est composée d'une à quatre couches cellulaires enchevêtrées dans un réseau de matrice extracellulaire. Il existe deux populations de synoviocytes composant cette couche intimale, les synoviocytes dérivées des macrophages (synoviocytes macrophagiques) et les synoviocytes provenant des fibroblastes (synoviocytes fibroblastiques) [337].

Au cours de la physiopathologie de la PR, on observe deux modifications principales de la membrane synoviale. Tout d'abord, il y a une hypertrophie de la membrane synoviale liée à une prolifération des synoviocytes qui produisent des cytokines et des protéases entraînant la formation d'un tissu synovial inflammatoire au contact du cartilage appelé pannus [1]. Les synoviocytes macrophagiques produisent alors des cytokines pro-inflammatoires dont l'interleukine (IL)-1, l'IL-6 et le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α). Les synoviocytes fibroblastiques produisent de l'IL-6, mais surtout des métalloprotéases matricielles et des médiateurs tels les prostaglandines et les leucotriènes [338]. Les synoviocytes fibroblastiques ont également un phénotype invasif participant à la dégradation du cartilage et peuvent migrer vers d'autres articulations pour propager la maladie [339].

La seconde modification est l'infiltration des cellules de l'immunité adaptative dans la membrane synoviale avec la présence de lymphocytes T CD4 mémoire, de lymphocytes B qui peuvent proliférer, se différencier et produire des anticorps notamment des facteurs rhumatoïdes et des ACPA [1]. Il existe également des cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques folliculaires présentatrices d'antigène, macrophages et mastocytes).

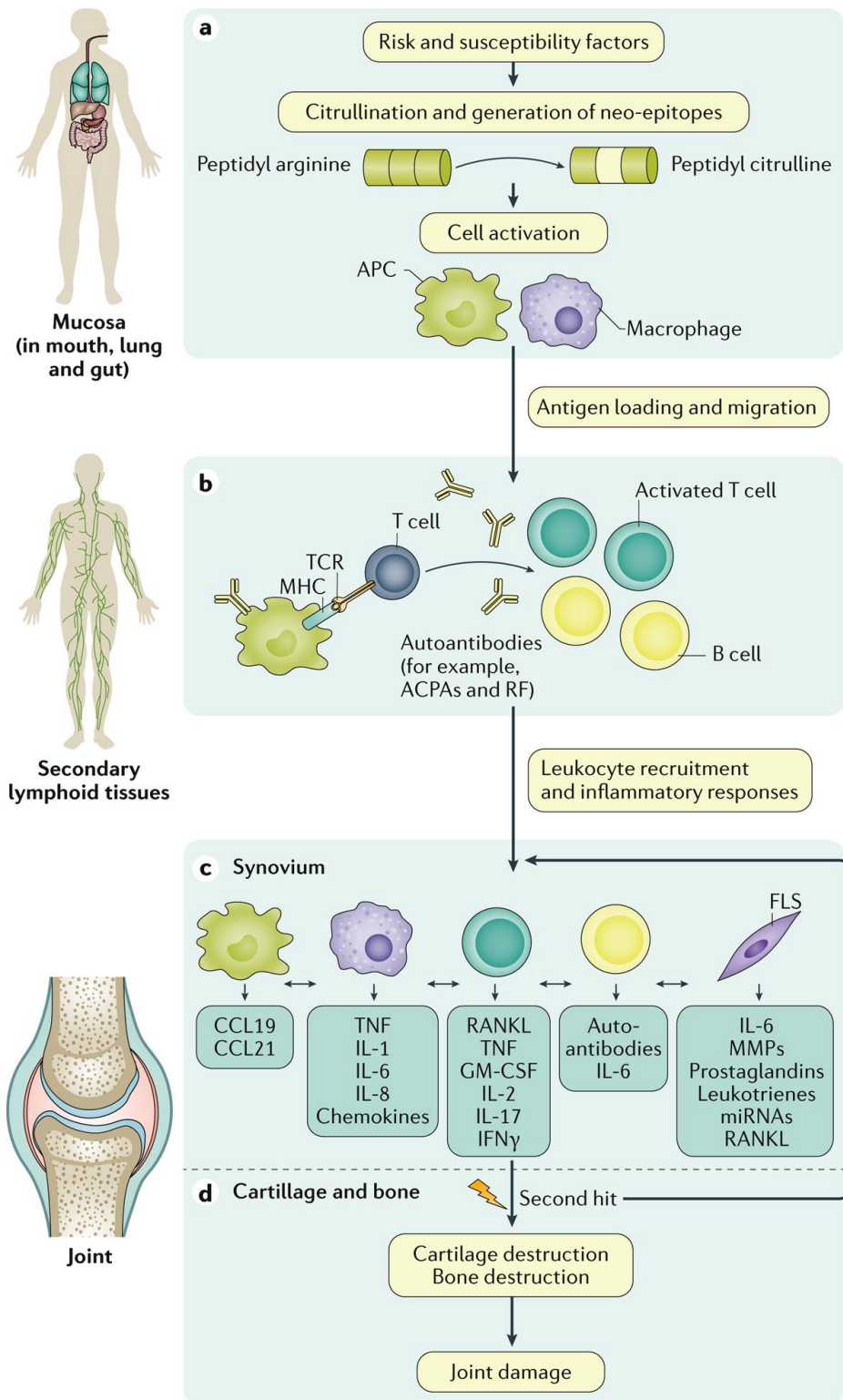


Figure Annexe II Mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression de la polyarthrite rhumatoïde (D'après Smolen *et al.* 2018 [1]).

- (a)** *les modifications post-traductionnelles, comme la citrullination ou la carbamylation, peuvent créer des néo-épitopes dans la muqueuse qui vont être reconnus par le système immunitaire adaptatif.*
- (b)** *ces peptides modifiés sont présentés aux cellules présentatrices d'antigènes, entraînant une réponse immune adaptative dans les tissus lymphoïdes et la production d'auto-anticorps.*
- (c)** *les cellules stromales comme les synoviocytes fibroblastiques, les cellules présentatrices d'antigènes et les macrophages peuvent être activées localement et produire un certain nombre de facteurs pro-inflammatoires. La réponse auto-immune nécessite un deuxième acteur comme la formation de complexes immuns ou l'activation du complément pour induire ou augmenter la production de cytokines et la perméabilité vasculaire synoviale.*
- (d)** *l'action autocrine et paracrine des cytokines associée à une réponse immunitaire adaptative persistante peut installer la maladie et entraîner à la destruction du cartilage et de l'os.*

APCAs : anti-citrullinated protein antibodies. CCL19 : CC- chemokine ligand 19. CCL21: CC-chemokine ligand 21. GM-CSF : granulocyte–macrophage colony-stimulating factor; CMH: complexe majeur d'histocompatibilité. RF : Rheumatoid Factors. miRNA: microRNA. MMP: matrix metalloproteinase. RANKL: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. TCR: T cell receptor; TNF α : tumour necrosis factor alpha

Annexe III Développement pharmaceutique du Tofacitinib

Le composé CP-690,500 ou Tofa représenté par **1** sur la **Figure Annexe IIIa** est un inhibiteur des JAK produit par le laboratoire Pfizer. Il inhibe principalement JAK1 et JAK3. Initialement, Pfizer voulait inhiber spécifiquement JAK3 [340], car son déficit chez l'Homme entraîne un déficit immunitaire combiné sévère [341]. Les patients ayant une mutation homozygote ont un déficit immunitaire profond sans autre anomalie et peuvent être traités par une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Ce rationnel génétique supportait le choix d'une inhibition de JAK3 comme modulation immune sélective du système hématopoïétique. Les parents hétérozygotes des patients atteints de déficit immunitaire combiné sévère ne présentent pas d'immunodépression, suggérant que l'inhibition partielle pourrait être utilisée pour moduler la réponse immune [342]. Pfizer a donc criblé sa chimiothèque d'environ 400 000 composés pour inhiber le domaine catalytique de JAK3.

La firme pharmaceutique a identifié une série d'inhibiteurs représentés par **9** sur la **Figure Annexe IIIa** qui possédaient tous une sous-unité pyrrolo [2,3 -d] pyrimidine. Cet hétérocycle azoté mime le noyau purine de l'adénosine. Il est fondamental pour la liaison au domaine catalytique de JAK3. Les tentatives de modification de ce noyau pyrrolo-pyrimidine par Pfizer ont entraîné une diminution de l'inhibition de JAK3. L'avancée majeure fut l'évolution du groupe fonctionnel principal amine modifié en fonction d'observations empiriques. En effet, les composés ayant un groupement de tête N-méthycycloalkyle illustré par **10** sur la **Figure Annexe IIIa** avaient une meilleure inhibition de la prolifération cellulaire des blastes lymphocytes T IL2. Cette population cellulaire a été choisie, car JAK3 est nécessaire à la voie de signalisation impliquant le récepteur de IL2. Par la suite, un groupe alkyl a été ajouté à la position 2' du groupement cyclohexyl (**11** sur la **Figure Annexe IIIa**).

Ce groupement méthyl sera reconnu plus tard comme contributeur à l'optimisation de la sélectivité du kinome. Cette modification a permis aussi d'augmenter le pouvoir d'inhibition de JAK1. Afin d'optimiser la stéréochimie, Pfizer s'est inspiré des terpénoïdes naturels que sont les carvones. Le noyau cyclohexane a été mis en configuration cis à partir du (S) carvone (**12 sur la Figure Annexe IIIa**). Cependant, la lipophilie du noyau cyclohexane des analogues du carvone entraînait des difficultés de pharmacocinétique. Les chimistes de Pfizer se sont tournés vers le groupement pipéridine (**14 sur la Figure Annexe IIIa**). Finalement, c'est la chaîne latérale cyanoacétamine du Tofa qui a permis la meilleure combinaison de pouvoir d'inhibition, de sélectivité et pharmacocinétique. Le développement prit en tout trois ans avec plus de 1 000 molécules testées [62].

Le Tofa se lie au site de fixation de l'ATP par des liaisons hydrogènes avec la région charnière. Dans la plupart des cas, il peut interagir directement avec une boucle riche en glycine (boucle P). De plus, le groupement méthylpipéridine se lie à une cavité hydrophobe dans le lobe C-terminal à la base du site actif, créant des forces de van der Waals avec des résidus d'acides aminés clés (**Figure Annexe IIIb**). Ce degré élevé de complémentarité de forme explique la fine sélectivité dans le kinome pour le Tofa [106].

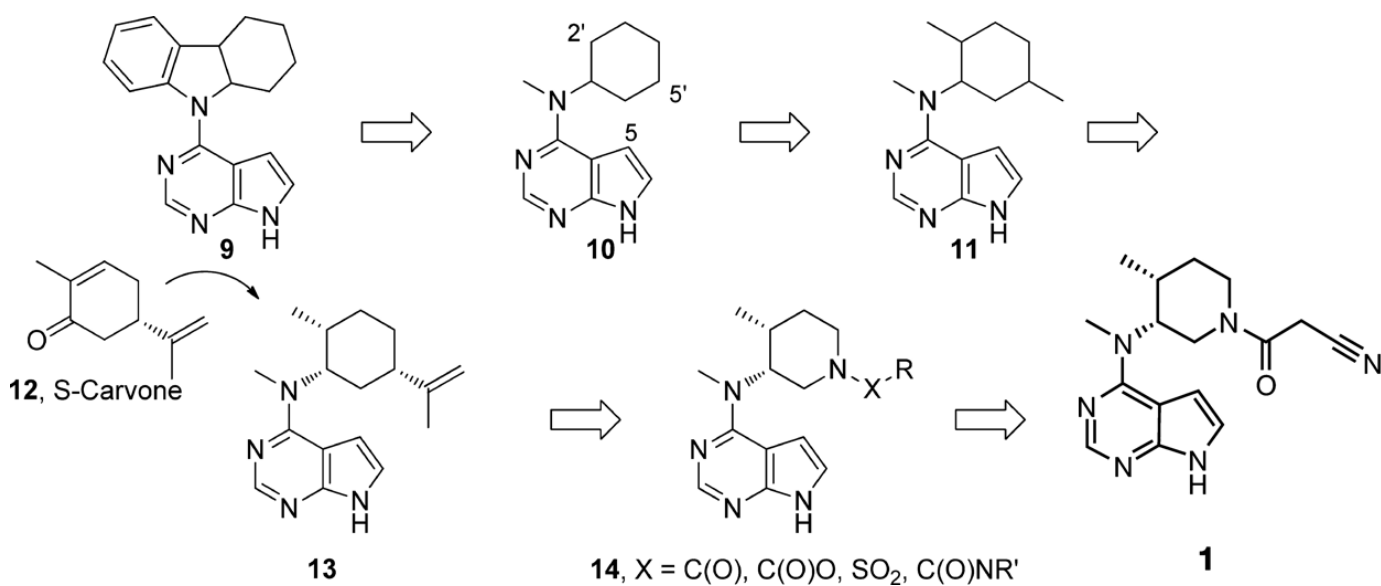


Figure Annexe IIIa Évolution de la structure des composés jusqu'au Tofa

(D'après Flanagan *et al.*[340])

Évolution des structures des composés, de la piste issue du criblage à haut débit (9) au Tofa (1). Ce schéma des composés séminaux représente un effort de chimie pharmaceutique d'environ 3 ans au cours duquel plus de 1000 analogues synthétiques de cette série de pyrrolopyrimidines ont été préparés et évalués.

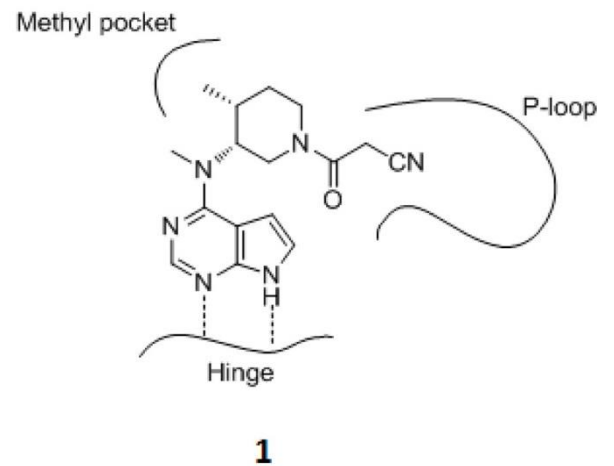
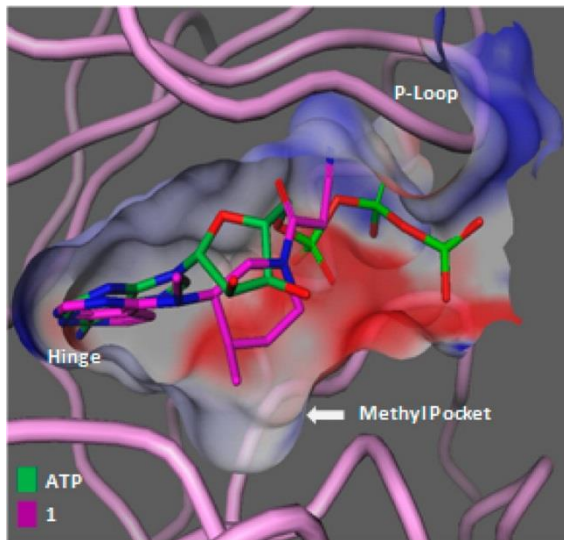


Figure Annexe IIIb Cristallographie montrant la liaison du Tofa au site de fixation de l'ATP (D'après Clark *et al.*[62])

Cette superposition illustre le comportement concurrentiel du Tofa (1) à l'ATP. L'hétérocycle pyrrolo-pyrimidine de 1 se lie à la région charnière de la kinase où la purine de l'ATP se fixe. La disposition du groupement de tête pipéridine de 1 positionne le groupe cyanoacétamide vers la boucle riche en glycine (boucle P) et le cycle méthyl dans une cavité hydrophobe vers le lobe C-terminal à la base du site actif. Ce mode de liaison et la disposition des caractéristiques structurales de l'inhibiteur sont censés conférer le degré élevé de sélectivité dans le kinome observé pour la famille JAK.

Body composition in patients with rheumatoid arthritis: a narrative literature review

Jean-Guillaume Letarouilly , René-Marc Flipo, Bernard Cortet, Anne Tournadre and Julien Paccou 

Abstract

There is growing interest in the alterations in body composition (BC) that accompany rheumatoid arthritis (RA). The purpose of this review is to (i) investigate how BC is currently measured in RA patients, (ii) describe alterations in body composition in RA patients and (iii) evaluate the effect on nutrition, physical training, and treatments; that is, corticosteroids and biologic Disease Modifying Anti-Rheumatic Disease (bDMARDs), on BC in RA patients.

The primary-source literature for this review was acquired using PubMed, Scopus and Cochrane database searches for articles published up to March 2021. The Medical Subject Headings (MeSH) terms used were 'Arthritis, Rheumatoid', 'body composition', 'sarcopenia', 'obesity', 'cachexia', 'Absorptiometry, Photon' and 'Electric Impedance'. The titles and abstracts of all articles were reviewed for relevant subjects.

Whole-BC measurements were usually performed using dual energy x-ray absorptiometry (DXA) to quantify lean- and fat-mass parameters. In RA patients, lean mass is lower and adiposity is higher than in healthy controls, both in men and women. The prevalence of abnormal BC conditions such as overfat, sarcopenia and sarcopenic obesity is significantly higher in RA patients than in healthy controls; these alterations in BC are observed even at an early stage of the disease. Data on the effect treatments on BC in RA patients are scarce. In the few studies published, (a) creatine supplementation and progressive resistance training induce a slight and temporary increase in lean mass, (b) exposure to corticosteroids induces a gain in fat mass and (c) tumour necrosis factor alpha (TNF α) inhibitors might be associated with a gain in fat mass, while tocilizumab might be associated with a gain in lean mass.

The available data clearly demonstrate that alterations in BC occur in RA patients, but data on the effect of treatments, especially bDMARDs, are inconsistent and further studies are needed in this area.

Keywords: body composition, body fat and lean mass, dual energy x-ray absorptiometry, rheumatoid arthritis

Received: 22 November 2020; revised manuscript accepted: 13 April 2021.

Background

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic, immune-mediated disease, characterised by synovitis and/or inflammation of periarticular structures and systemic inflammation.¹ RA is the most prevalent inflammatory rheumatic disease, with estimated

prevalence rates in European adults ranging from 3.1 to 8.5 cases per 10,000.² Patients with RA exhibit alterations in quality of life and a high prevalence of fatigue and depression.^{3,4} The disease also constitutes a major global health burden, as measured in disability-adjusted life years (DALYs).⁵

Ther Adv Musculoskel Dis

2021, Vol. 13: 1–21

DOI: 10.1177/
1759720X211015006

© The Author(s), 2021.
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-
permissions

Correspondence to:

Julien Paccou
MABlab ULR 4490,
Department of
Rheumatology, CHU Lille,
2, Avenue Oscar Lambret-
59037 Lille Cedex
Department of
Rheumatology, University
of Lille, CHU Lille, F-59000
Lille, France
julien.paccou@chru-lille.fr

Jean-Guillaume Letarouilly
Bernard Cortet
University of Lille F-59000
Lille, CHU Lille F-59000
Lille, France; University
of Littoral Côte d'Opale
F-62200 Boulogne-sur-
Mer, France; Marrow
Adiposity and Bone Lab
- MABLab ULR4490Lille,
France

Department of
Rheumatology, University
of Lille, CHU Lille, F-59000
Lille, France

René-Marc Flipo
Department of
Rheumatology, University
of Lille, CHU Lille, F-59000
Lille, France

Anne Tournadre
University of Clermont
Auvergne, CHU Clermont-
Ferrand, UNH-UMR 1019,
INRA Department of
Rheumatology, F-63003
Clermont-Ferrand, France

Twenty years ago, RA often led to joint destruction and considerable disability. Since then, scientific progress has prompted major advances in the treatment of the disease. Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARDs), such as conventional synthetic DMARDs (csDMARDs, e.g. methotrexate), biologic DMARDs [bDMARDs, e.g. tumour necrosis factor alpha (TNF α) inhibitors] and targeting synthetic DMARDs [tsDMARDs, e.g. janus kinase (JAK) inhibitors], can control disease activity and thus prevent joint destruction.^{6–9} Moreover, in the last 20 years, RA has become milder, with patients exhibiting fewer severe extra-articular manifestations and lower mortality rates.^{10,11} However, patients with RA still exhibit excess mortality, especially from cardiovascular disease.¹² As such, for RA patients, better evaluation of comorbidities and patients' cardio-metabolic profiles is essential.^{13,14}

In addition to joint damage and comorbidities, alterations in body composition have been observed in patients with RA.^{15,16} Systemic inflammation is the main factor underlying these alterations, but several other factors, such as malnutrition, physical disability, comorbidities, corticosteroids and bDMARDs, may also induce alterations in body composition in RA patients.^{17,18} Evidence suggests that the proportions and distribution of fat and lean mass throughout the body have important implications for health. Low lean mass and excess body fat are predictors of poor health outcomes in the general population.¹⁹ Low lean mass at its most extreme (a condition known as cachexia) may lead to weakness, disability and metabolic abnormalities.^{20–22} Gains in fat mass may predispose to obesity, diabetes, hypertension and risk of cardiovascular disease.^{12,23–25} A better understanding of the alterations in body composition that occur in RA patients (including those receiving bDMARDs) is important because of the many potential implications in terms of outcome, such as disability and cardio-metabolic risk.

The purpose of this review is three-fold: (i) to investigate how body composition is currently measured in RA patients, and which parameters are associated with abnormal body composition conditions in those patients, (ii) to investigate alterations in body composition in RA patients compared with healthy controls and (iii) to investigate the effect of nutrition, physical training and

treatments (corticosteroids and bDMARDs) on body composition in RA patients.

Methods

Data sources

For this manuscript, the authors searched the PubMed, Scopus and Cochrane databases for articles published up to March 2021. We also searched for conference abstracts from selected Rheumatology meetings: European League Against Rheumatism (EULAR) and the American College of Rheumatology (ACR); and from Nutrition meetings: International Congress of Nutrition, European Nutrition Conference and American Society of Nutrition, from 2018 to 2020. We manually reviewed them for inclusion.

Search terms

The Medical Subject Headings (MeSH) terms used were 'Arthritis, Rheumatoid', 'body composition', 'sarcopenia', 'obesity', 'cachexia', 'Absorptiometry, Photon' and 'Electric Impedance', in the following combination: ['Arthritis, Rheumatoid' (Mesh)] AND ['Body Composition' (Mesh) OR 'Electric Impedance' (Mesh) OR 'Obesity' (Mesh) OR 'Cachexia' (Mesh) OR 'Sarcopenia' (Mesh)].

Inclusion/exclusion criteria

Searches were restricted to adults ≥ 18 years old and human studies in the English language. All types of original studies, including clinical trials, cohort studies, case-control studies, conference abstracts and cross-sectional studies, as well as meta-analyses and reviews were included and analysed. As the definition of sarcopenia has changed with time, we included studies in which sarcopenia is fully described and publications in which patients are reported as having sarcopenia defined as low muscle mass. Protocols, case reports and studies which did not assess whole-body composition were excluded. The terms 'bone assessment' and 'osteoporosis' were excluded from our search. Indeed, bone fragility in patients with RA is beyond the scope of this paper and a detailed discussion of this topic can be found in excellent reviews elsewhere.^{26–28}

The results of the bibliographic search are shown in Supplemental Figure 1.

Measurement of body composition in RA patients

Definition of body composition

The term ‘body composition’ does not refer to an anatomic view of the body, with a description of each tissue and its localization. Instead, it refers to a description of the body from a chemical point of view. For example, the three-compartment model includes two major components (fat mass and fat-free mass) and a minor component (mineral content).²⁹ Body composition is not stable. It is dynamic and variable, with changes occurring in response to external or internal stimuli.³⁰ Body composition is a ‘living memory’ of what we have eaten or experienced. Experiences that affect body composition include trauma, infections and chronic systemic inflammation.³¹ The assessment of body composition provides insights into both the nutritional status and functional capacity of the human body.³² Several techniques are used to measure it. In this review, we focus on those techniques that are used to assess whole-body composition, such as dual energy x-ray absorptiometry (DXA) and bioelectrical impedance analysis (BIA). Body parts assessment of body composition using computed tomography (CT), (high resolution) peripheral quantitative CT, bedside ultrasound (US), or magnetic resonance imaging (MRI) is beyond the scope of this review.

Currently available techniques (Supplemental Table 1)

Dual energy x-ray absorptiometry. Dual energy x-ray absorptiometry (DXA) was primarily used to assess bone mineral density (BMD) and to diagnose osteoporosis.³³ DXA measures energy absorption at two X-ray photon energy levels. By measuring the intensities of the absorbed energy in this way, it is possible to differentiate between bone, fat mass and fat-free mass (FFM), which is also known as ‘soft tissue lean mass’ (i.e. non-bone and non-fat soft tissue), as since these tissues have different X-ray attenuation profiles.³⁴ Nowadays, DXA is recognized as the gold standard for assessing body composition.³⁵ It provides a means of quantifying fat and lean masses, both in a single body region (e.g. arms and legs) and at the whole-body level. With the latest generation of densitometers, body composition can be assessed with a single whole-body scan, with low exposure to radiation [1 μ Sv, less than a standard X-ray (100 μ Sv)] and fast acquisition times.³⁴ Other benefits of this technology include simplicity,

moderate cost, availability and accuracy. DXA is also used to assess BMD and visceral adipose tissue (VAT). VAT is associated with metabolic syndrome and cardiovascular risk.^{36–39} However, there are limitations to using DXA to assess body composition: trunk muscles, for instance, are difficult to evaluate using DXA. Therefore, if DXA fat mass and lean mass measurements are derived from arms and legs, they might over- or underestimate the extent of low muscle mass and obesity.⁴⁰ In addition, oedema or dehydration can bias DXA muscle and fat measurements.⁴¹

Bioelectrical impedance analysis. BIA is used to assess body composition by passing a low intensity (500–800 mA), high frequency (50 kHz) current through the body and then measuring several electrical parameters (resistance, reactance, impedance and phase angle). The measurements obtained provide indirect estimates of whole-body composition. BIA assesses total body water and can predict the amount of FFM. Its use is based on several assumptions, namely that (1) the human body is divided into five cylinders, that is, the trunk and the upper and lower extremities, with uniform electric conductivity; (2) FFM contains virtually all of the water and conduction electrolytes in the body; (3) FFM hydration is constant and (4) conductive length equates to stature.⁴² BIA can be used to assess body composition in elderly and obese patients, as well as in patients with cancer or infections.^{42–44} The benefits of BIA include ease of use, affordability, portability of the device, absence of radiation exposure and non-invasiveness of the technique. It appears to correlate well with DXA and CT.^{38,45} The limitations of BIA as a means of assessing body composition include the fact that (1) it is an indirect method, (2) it cannot be used to assess BMD and VAT and (3) every specific population assessment requires its own equation.⁴⁵

Parameters measured by DXA

Of all the techniques used to assess body composition, DXA seems to be the best compromise between accuracy and accessibility. As DXA is the technique used in most of the studies included in this review, it is important to explain the main parameters of this technique.

In 2019, the International Society for Clinical Densitometry (ISCD) published an updated official position on whole-body composition assessment with DXA.⁴⁶ According to the ISCD, where

adults are concerned, total body (with head) values of body mass index (BMI), total body mass (TBM), total lean mass (TLM), total fat mass (FM) and percent body fat (PBF) should appear on all reports (Supplemental Table 2). Moreover, optional DXA measurements of adiposity and lean mass include VAT (cm²), fat mass index (FMI: FM/height²), appendicular lean mass (ALM, kg), appendicular lean mass index (ALMI: ALM/height²) and skeletal muscle index (SMI: TLM/height²). Data are also lacking on changes in VAT. Indeed, using DXA to measure VAT is a recent practice, but not all DXA machines are designed to do so. Fat-free mass and fat-free mass index (FFMI: FFM/height²) are sometimes reported. The clinical utility of these latter measurements (FFM and FFMI) is currently uncertain. As such, only the recommended DXA parameters and optional DXA parameters, if available, are reported from the studies included in this review.

Categories of abnormal body composition conditions

Overfat. The term ‘obesity’ is commonly used to refer to a BMI ≥ 30 kg/m². However, in RA studies, the term ‘overfat’ is used to refer to excess adiposity (PBF). For instance, in the criteria proposed by Cesari *et al.*,⁴⁷ people aged 60–79 years-old were defined as ‘overfat’ if their PBF was >31% in white men, >29% in African American men, >29% in Asian men, >43% in white women, >41% in African American women and >41% in Asian women.

Sarcopenia. Sarcopenia is a condition that is commonly associated with ageing. It is characterised by the loss of muscle mass and muscle strength, leading to impaired muscle function. However, in RA studies on body composition, ‘sarcopenia’ is generally used to refer to low lean mass (ALM, ALMI or SMI) alone using various cut-offs (Supplemental Table 3).^{19,35,48–55} For instance, in the criteria proposed by Baumgartner *et al.*,⁴⁸ the mean ALMIs of young male and female reference groups, minus two standard deviations (SDs), were defined as the gender-specific cut-offs for sarcopenia, that is, 7.26 kg/m² for men and 5.5 kg/m² for women.

A quantitative assessment is not enough to establish a diagnosis of sarcopenia. A comprehensive assessment of muscle, muscle strength and muscle function are also required. Sarcopenia is

characterised by a loss of lean mass leading to impaired muscle function.⁵⁶ It could also lead to physical disability, falls, fractures and even cardiovascular diseases.^{57,58} While many definitions of sarcopenia have been proposed, the most commonly accepted definition is the one published in 2010 by the European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP).³⁵ In 2019, the EWGSOP published an update to the definition (Supplemental Figure 2). Sarcopenia is now considered a muscle disease (muscle failure), with low muscle strength superseding low muscle mass as a principal determinant. If there is a suspicion of sarcopenia, muscle strength must be assessed.¹⁹ Sarcopenia is probable if low muscle strength is established (i.e. grip strength <26 kg for men and <16 kg for women OR chair stand >15s for five rises). The diagnosis is confirmed if low muscle mass (i.e. ALM/height² <7.0 kg/m² for men and <5.5 kg/m² for women, OR ALM <20 kg for men and <15 kg for women:) or quality (i.e. gait speed ≤ 0.8 m/s, Short Physical Performance Battery ≤ 8 point score, Timed-up-and-go test ≥ 20 s or non-completion or ≥ 6 min for completion of 400 m walk test) is also established. When low muscle strength, low muscle mass/quality and low physical performance are all established, sarcopenia is considered severe.¹⁹

Sarcopenic obesity. In RA studies on whole-body composition, the term ‘sarcopenic obesity’ is used to refer to a loss of lean mass concurrent with excess adiposity (PBF). For instance, according to Giles *et al.*,¹⁶ sarcopenic obesity was defined as fulfilling the criteria for both sarcopenia (as proposed by Janssen *et al.*⁴⁹) and overfat (as proposed by Cesari *et al.*⁴⁷).

Rheumatoid cachexia. The term ‘classic cachexia’ is used to refer to the condition that is characterised by severe loss of weight, fat and muscle mass, accompanied by an increase in protein catabolism due to underlying disease(s).⁵⁹

Despite numerous publications on ‘rheumatoid cachexia’ (RC), there is no consensus on the clinical criteria for its diagnosis. RC is a dramatic change in body composition characterised by the loss of muscle mass with or without loss of fat mass, resulting in no or limited changes in BMI.⁶⁰

The most used criteria for establishing RC are those proposed by Engvall *et al.*,⁶¹ that is FFMI below the 10th percentile and FMI above the 25th percentile. Data from a Swiss population

sample of healthy adults (2986 men and 2649 women) were used to establish a body composition index that determines RC.

Sarcopenia and rheumatoid cachexia: two different conditions! As the loss of muscle mass is commonly evaluated in both RC and sarcopenia, these syndromes are often confused with one another. However, the diagnosis of sarcopenia is established based on an assessment of muscle alone, while the diagnosis of RC is based on an assessment of both muscle and fat.

Alterations in body composition in rheumatoid arthritis

Body composition in RA patients was assessed (mainly by DXA) in several studies. We drew a distinction between studies that included patients with early RA and those that included patients with established RA. Moreover, data on the prevalence of abnormal body composition conditions (sarcopenia, overfat, sarcopenic obesity and RC) are also reported, if available. Results are summarized in Table 1.

Early rheumatoid arthritis

We found four case-control studies ($n = 105$ – 317 cases) in which alterations in body composition were assessed in patients with early RA.^{15,62–65}

In 2009, Book *et al.*¹⁵ compared with 132 early RA patients (women: 72%; mean age: ~60 years old; disease duration: ≤ 1 year) with controls matched one-to-one for age and sex. All of the patients who had been treated with corticosteroids or csDMARDs prior to inclusion had been treated for fewer than 30 days. Fewer women (31%) than men (38%) had been treated with corticosteroids, with a mean daily dose of 6.5 and 8.0 mg, respectively. Body composition was assessed by DXA. Appendicular lean mass was lower in RA patients compared with controls in both women and men (women: 16.8 *versus* 17.6 kg, $p = 0.007$; men: 23.0 *versus* 25.8 kg, $p < 0.001$). TLM was significantly lower in RA men (but not RA women) (54.4 *versus* 58.3 kg, $p = 0.012$), whereas weight, BMI and FM were significantly higher in RA women (but not RA men) (68.1 *versus* 64.0 kg, $p = 0.016$; 25.1 *versus* 23.7 kg/m², $p = 0.012$; and 26.1 *versus* 23.0 kg, $p = 0.014$, respectively).

In a longitudinal follow-up of their previous study, Book *et al.*⁶² compared 63 RA patients

(women: 71%; mean age of women: 58.3 years; mean age of men: 60.7 years; mean disease duration: 7 months) with 63 healthy controls matched for age and sex. At 2 years, the changes observed in the RA group were generally less pronounced than those observed in the control group. In both men and women, loss of TLM was significantly less in RA patients compared with controls (women: -0.29 *versus* -1.48 kg, $p = 0.002$; men: 0.09 *versus* -2.94 kg, $p = 0.002$) and gain in FM was significantly less in female patients compared with female controls (0.44 *versus* 2.83 kg, $p = 0.002$).⁶² However, due to the small sample size and the modest follow-up time, no definitive conclusions can be drawn and this study was conducted in the pre-bDMARDs era.

The occurrence of alterations in body composition in early RA was confirmed in three studies.^{63–65} In 105 Vietnamese women with RA (disease duration ≤ 3 years) compared with healthy age-matched controls, mean weight and BMI values were similar, but higher FM (19.1 *versus* 16.9 kg, $p = 0.007$) and lower ALM (12.9 *versus* 14.1 kg, $p = 0.02$) were observed.⁶³ Moreover, the prevalence of abnormal body composition conditions was significantly higher in RA patients compared with controls (all $p < 0.001$):

(i) sarcopenia (18.1 *versus* 9.5%, using the criteria proposed by Hull *et al.*⁸⁴), (ii) overfat (41.9 *versus* 31.4%, using the criteria proposed by Gallagher *et al.*⁸⁵) and (iii) sarcopenic obesity (12.4 *versus* 3.8%, using the criteria for both sarcopenia and overfat).⁶³ In another recent study, the cohort was composed of 317 early arthritis patients (symptom duration ≤ 2 years; 84% RA according to 2010 ACR/EULAR criteria⁸⁶) with no prior treatment with DMARDs.⁶⁴ Mean age was 61 ± 7 years and mean BMI was 28.0 kg/m². The cohort was compared with 1268 non-arthritis controls from the Rotterdam study, matched one-to-four for age, gender and ethnicity (Caucasian, African or Asian).⁸⁷ Compared with controls, BMI and FMI were higher (both $p < 0.01$) in arthritic women (but not in men), ALMI was lower in both sexes ($p < 0.01$) and sarcopenia was 4–5 times more common in early arthritis patients than in controls (women: 5.5 *versus* 1.3%; men: 8.2 *versus* 1.5%; both $p < 0.01$; using the criteria proposed by Baumgartner *et al.*⁴⁸). Similar results (higher PBF and lower ALM in RA patients) were found in an Estonian study.⁶⁵ In that study, the authors compared the DXA-acquired body composition data of 91 early RA patients (72% women) with those of 328 controls (54% women). 41.8% of

Table 1. Body composition in patients with early and established RA versus controls.

References	Patients (n)	Controls	Mean age in years	Disease duration	Conclusion
Book <i>et al.</i> ¹⁵	132 (95F/37M)	132 (95F/37M) matched for current smoking when possible.	58.4±15.8 (F) 64.5±9.7 (M)	7.5±2.8 months (F) 7.3±2.7 months (M)	Lower ALM, higher BMI, higher FM and higher trunk fat mass in Female RA patients Lower TLM and lower ALM in Male RA patients
Book <i>et al.</i> ⁶²	63 patients (45F/18M) 63 controls matched for sex and age	Early treatment with DMARDs	58.3±15.7 in F patients 66.2±11.5 in M patients	7.2 ± 2.9 in F patients 7.6±3.0 in M patients	In both men and women TLM decreased significantly less in patients compared with controls, $p=0.002$ for women and $p=0.002$ for men FM increased significantly less in female patients compared with female controls ($p = 0.002$)
Dao <i>et al.</i> ⁶³	105 F	105 matched for age	56.3±8.7	21.6±2.8 months	Higher BMI, FM and PBF in RA patients Higher prevalence of sarcopenia, overfat and sarcopenic obesity in Female RA patients.
Turk <i>et al.</i> ⁶⁴	317 (219F/98M)	1268 (875F/393M) from the Rotterdam Study II ³ and matched for ethnicity, gender and age	61.0±7.0	7 (3–22) months	Lower ALMI (both in F and M), higher BMI and FMI (F) Sarcopenia 4–5 times more common in RA patients than in controls
Müller <i>et al.</i> ⁶⁵	91 (66F/25M)	328 matched for sex and age	52±2	215±24 days	Higher PBF and lower in RA patients
Giles <i>et al.</i> ¹⁶	189 (117F/72M)	189 matched for sex, race and age	59.9±8.4	9 (5–17) years	Higher BMI, higher FM, higher FMI, higher trunk fat mass, higher PBF and lower TLM/FM in Female RA patients Higher prevalence of sarcopenia, overfat and sarcopenic obesity in Female RA patients. Lower ALM in Male RA patients
Reina <i>et al.</i> ⁶⁶	89F	100 matched for age	62±8	13.7±9.5 years	ALM, ALMI and TLM lower in RA patients Higher prevalence of sarcopenia in RA patients than in controls
Elkan <i>et al.</i> ⁶⁷	60 (50F/10M)	Age- and sex-matched European reference population	F: 65.5 (60.0–75.0) M: 60.5 (55.0–67.0)	F: 13.0 (9.0–23.0) years M: 15.5 (6.0–24.0) years	Higher BMI and lower FFM/FFMI in F RA patients. Higher FM and FMI in RA patients compared with reference population
Lemmey <i>et al.</i> ⁶⁸	82 (53F/29M)	85 matched for sex and age	60.9±11.7	23.8±19.0 months	Higher PBF and FM and lower % ALM in RA patients
Delgado-Frías <i>et al.</i> ⁶⁹	100F	98 matched for age	55.6±9.3	NR	No difference between the two groups

(continued)

Table 1. (continued)

References	Patients (n)	Controls	Mean age in years	Disease duration	Conclusion
Ngeuleu <i>et al.</i> ⁷⁰	123(107F/16M)	No controls	52.3±13.2	9.8±8years	40% of patients diagnosed with sarcopenia
Vliestra <i>et al.</i> ⁷¹	82 (60F/15M)	75 patients with osteoarthritis (45F/30M)	61.1 (13.3)	NR	17.1% of RA patients diagnosed with sarcopenia <i>versus</i> 29.3% of patients with osteoarthritis (non-significant) Higher prevalence of sarcopenic obesity in patients with osteoarthritis
Torii <i>et al.</i> ⁷²	388F	No controls	65 (54.3–72.0)	9(4.0–21.0) years	37.1% of patients classified as having sarcopenia (14.7%: severe sarcopenia, 22.4%: sarcopenia)
Lin <i>et al.</i> ⁷³	457(378F/79M)	1860 non matched	49.5±13.1	54(24–118) months	Lower ALMI in RA patients
Tada <i>et al.</i> ⁷⁴	100 (78F/22M)	No controls	68.0(59.0, 76.0)	5.5 (1.2, 11.3) years	28% of patients diagnosed with sarcopenia (F: 26.9%; M: 31.8%).
Mochizuki <i>et al.</i> ⁷⁵	240(189F/51)	No controls	75.0±6.2	13.8±11.1	29.6% of patients diagnosed with sarcopenia.
Feklistov <i>et al.</i> ⁷⁶	40F	40F controls	63±7	NR	Sarcopenia occurred in 10 (25%) RA patients and in 5 (12.5%) people without RA ($p>0,05$)
Kondrashov <i>et al.</i> ⁷⁷	110M	30 controls matched for age and BMI	59(53; 65)	NR	Sarcopenia detected in 66 (60%) of RA patients, whereas in the control group it was absent.
Casabella <i>et al.</i> ⁷⁸	55F	55 controls	58±12	NR	Nineteen RA patients (35%) presented sarcopenia
Park <i>et al.</i> ⁷⁹	294	No controls	NR	NR	8.2% of 294 RA patients had sarcopenia at the time of enrolment
El Maghraoui <i>et al.</i> ⁸⁰	178 (147F/31M)	No controls	54.1±11.5	8.9±7.4 years	53.9% of patients diagnosed with RC (F: 53.7% and M: 54.8%)
Engvall <i>et al.</i> ⁶¹	60 (50F/10 M)	No controls	F: 66.0 (63.0–69.0) M: 60.0 (51.0–70.0)	F: 13 (9–23) years M: 16.0 16(6–24) years	38% of patients categorized as having RC
Hugo <i>et al.</i> ⁸¹	57 (41F/16M)	No controls	57.6±10.2	3.8±3.0 years	18% of patients categorized as having RC
Elkan <i>et al.</i> ⁸²	80 (61F/19M)	No controls	F: 60.8(57.3–64.4) M: 63.4 (59.8– 66.9)	F: 6.0(2.0–15.0) M: 5.0 (3.0–9.0)	18% of F patients and 21% of M patients categorized as having RC
Santo <i>et al.</i> ⁸³	90 (78F/12M)	No controls	56.5±7.3	8.5(3.0–18.0) years	13.3% of patients categorized as having RC

Results are expressed as mean ± standard deviation or median (25th–75th percentile).

ALM, appendicular lean mass; ALMI, appendicular lean mass index; BC, body composition; BMI, body mass index; F, female; FFM, fat free mass; FFMI, fat free mass index; FM, total fat mass; FMI, fat mass index; M, male; NR, not reported; PBF, body fat percentage; RA, rheumatoid arthritis; RC, rheumatoid cachexia; TLM, total lean mass.

the early RA patients and 19.8% of the controls were classified as having sarcopenia and 68.1% of the early RA patients and 47.3% of the controls were overfat.

Compared with healthy controls, patients with early RA exhibit alterations in body composition, with higher fat mass and lower lean mass leading to abnormal body composition conditions.

Established rheumatoid arthritis

We found five case-control studies ($n = 60$ –189 cases) in which alterations in body composition were assessed in patients with established RA.^{16,66–69}

In 2008, Giles *et al.*¹⁶ reported alterations in body composition in a cohort of 189 RA patients (women: 62%; mean disease duration: 9 years; no previous exposure to bDMARDs: 55%). The RA patients were compared with non-RA controls matched for age, gender, weight and ethnicity. Weight, BMI and FM were significantly higher in women with RA (all $p < 0.05$), but not in men, compared with controls. No significant differences were found between men with RA and controls in any body composition parameter except for ALM, which was lower (24.7 *versus* 26.1 kg, $p = 0.039$). A significant association was found between RA status and greater prevalence of abnormal body composition conditions in women, but not in men; (i) sarcopenia (21.4 *versus* 7.7%, $p = 0.004$, using the criteria proposed by Janssen *et al.*⁴⁹), (ii) overfat (57.3 *versus* 35.0%, $p = 0.001$, using the criteria proposed by Cesari *et al.*⁴⁷) and (iii) sarcopenic obesity (11.1 *versus* 2.6%, $p = 0.008$).

These results were confirmed in most studies,^{66–68} but not all.⁶⁹ Reina *et al.*⁶⁶ reported alterations in body composition in a case-control study of 89 women with RA (mean disease duration: 13.7 years). The control group was composed of 100 patients with non-inflammatory rheumatic disorders. TLM and ALM were significantly lower ($p < 0.001$) in RA patients compared with controls and no difference in FM was observed. RA patients fulfilled the criteria for sarcopenia in 44% of cases *versus* 19% of controls ($p < 0.001$, using the criteria proposed by Janssen *et al.*⁴⁹). In a study of 60 RA patients (women: 83%; mean disease duration: 13 years; receiving DMARDs such as methotrexate, sulfasalazine, leflunomide and TNF α inhibitors: 68%). Elkan *et al.*⁶⁷

reported higher FM ($p < 0.05$) both in women and men, and lower TLM ($p < 0.001$) in women (but not in men) compared with the reference population. In a case-control study, Lemmey *et al.*⁶⁸ compared 82 RA patients treated exclusively with csDMARDs (mainly methotrexate) in a treat-to-target (T2T) protocol with 85 matched controls. Although the RA patients responded well to the treatment (mean DAS28=2.8, with 49% in remission), they had lower ALM (–9.9%, $p < 0.001$) and higher FM (+26.5%, $p < 0.001$) than controls.⁶⁸

Compared with controls, patients with established RA also have higher fat mass and lower lean mass leading to abnormal body composition conditions. Moreover, the benefits of the T2T strategy in reducing inflammation (i.e. disease activity) failed to improve body composition parameters.

Sarcopenia in patients with RA

We found ten cross-sectional studies ($n = 40$ –457 RA patients) that specifically sought to evaluate the prevalence of sarcopenia in established RA.^{70–79}

Although sarcopenia seems to be more frequent in RA patients compared with controls,^{15,16,63,64,66} it is difficult to provide conclusive evidence since the studies used different definitions for sarcopenia and involved different populations. In a cross-sectional study of 123 Moroccan RA patients (women: 87%; mean disease duration: 9.8 years; patients receiving csDMARDs: 90.2%; patients receiving bDMARDs: 8.1%),⁷⁰ the prevalence of sarcopenia was reported to be 39.8% (using the criteria proposed by Baumgartner *et al.*⁴⁸), but muscle strength and physical performance were not evaluated. In another cross-sectional study involving 82 patients with RA (women: 73.2%), Vlietstra *et al.*⁷¹ found that the prevalence of sarcopenia (using the criteria proposed by Studenski *et al.*⁵⁵) and sarcopenic obesity (using the criteria proposed by Gallagher *et al.*⁸⁵) were 17.1% and 15.9% respectively. On the other hand, in a cross-sectional study of 388 consecutive women with RA, conducted by Torii *et al.*,⁷² sarcopenia was defined as the presence of low muscle mass and either low muscle strength or low physical performance, as per the consensus report of the Asian Working Group for Sarcopenia (AWGS)⁵⁴ and 37.1% of the patients were classified as having sarcopenia.⁷² In another cross-sectional study, Lin *et al.*⁷³ evaluated body composition

by BIA in 457 Chinese RA patients (women: 82.7%; mean age: 49.5 years) and found that low ALMI, with sarcopenia in 45.1% of the patients, using the AWGS criteria,⁵⁴ was the main characteristic of Chinese RA patients. In two other studies using BIA and the same criteria for sarcopenia,^{74,75} the prevalence of sarcopenia among Japanese patients with RA was found to be 28% ($n = 100$; mean age: 66.1 years; women: 78%) and 29.6% ($n = 240$; mean age: 75.0 years; women: 78.8%), respectively.

The prevalence of sarcopenia in RA patients ranged from 17.1% to 60%, depending on the population that was evaluated and the assessment technique and diagnostic criteria that were used.

Rheumatoid cachexia

We found four cross-sectional studies^{80–83} ($n = 57–178$ patients) that specifically sought to evaluate the prevalence of RC using DXA and the criteria proposed by Engvall *et al.*⁶¹

As already mentioned, RC is another alteration in body composition observed in RA. Engvall *et al.* defined RC as FFMI < 10th percentile and FMI > 25th percentile.⁶¹ The prevalence of RC ranged from 18% to 53.9%, depending on the cohort. El Maghraoui *et al.*⁸⁰ found the highest prevalence (53.9%), while Santo *et al.*⁸³ found the lowest prevalence (13.3%). Since this alteration in body composition is characterised by a loss of lean mass, RC is also associated with physical disability and mortality.⁶⁸

The effect of treatments on body composition in patients with RA

Since body composition depends on several factors that can be potentially modified, this raises the question as to whether acting on these factors modifies body composition in RA. In this section, we investigate the effect of non-pharmaceutical treatments (i.e. nutrition and physical activity) and pharmaceutical treatments (i.e. corticosteroids and bDMARDs) on body composition in patients with RA. The results are summarized in Table 2.

Nutritional intervention

We found two small double-blind randomised placebo-controlled trials ($n = 35–40$)^{88,89} in which DXA was used to evaluate changes in body

composition in RA patients 12 weeks after an anabolic nutritional intervention.

Wilkinson *et al.*⁸⁸ investigated whether anabolic nutritional supplementation could increase ALM. The participants were randomized to receive a drink containing either supplementary creatine ($n = 15$) or placebo ($n = 20$) for 12 weeks. A slight increase in ALM ($+0.52 \pm 0.13$ kg) was observed in the creatine supplementation group, while no significant changes were observed in the placebo group (between-group, $p = 0.004$). Twelve weeks after cessation of the creatinine supplementation regimen, no significant differences in ALM were observed between the two groups. Other body composition parameters, such as FM, were not affected by creatine supplementation. Moreover, anabolic nutritional supplementation had no effect on muscle strength and physical performance, either immediately or 12 weeks after cessation of supplementation. In another study, Marcora *et al.*⁸⁹ compared the efficacy on body composition (with ALM as the primary outcome) of a mixture of β -hydroxy- β -methylbutyrate, glutamine and arginine (HMB/GLN/ARG) and a mixture of other non-essential amino acids used as placebo. At 12 weeks, the authors found no significant differences in ALM, or in any of the measured body composition parameters, between the intervention group and the placebo group.

The findings reported in these studies suggest that oral creatine supplementation induces a slight and temporary increase in ALM, with no changes in any of the other body composition parameters. However, due to the limitations of these studies (small number of patients and short period of time), no definitive conclusions can be drawn.

We found one small double-blind randomised placebo-controlled trial ($n = 70$)⁹⁰ in which BIA was used to evaluate changes in BFP in RA patients 3 months after barberry extract (6 capsules of 500 mg per day). The results showed a slight decrease in BFP (-1.03 versus 0.37 , $p = 0.05$) in the intervention group compared with the placebo group. No lean mass measurements were performed.

Physical training

We found three small randomised controlled trials ($n = 20–100$)^{91–94} in which DXA was used to evaluate changes in body composition in RA

Table 2. Effect of nutrition, physical training and DMARDs on body composition in RA.

References	Type of study	Patients	Treatment	Mean age (years)	Disease duration	Conclusion
Wilkinson <i>et al.</i> ⁸⁸	24-week, double-blind, randomized, placebo-controlled trial	35 (15 in treatment group and 20 in placebo group)	Creatine supplementation: 20 grams (4×5g/day) for the initial 5 days (loading dose) followed by 3 g/day for the remainder of the 12-week period (maintenance dose)	63.1±10.0 years in creatine group	112.5±82.8 months in creatine group	Significant increase in ALM in the creatine group (0.52±0.13 kg), with no change in the placebo group (0.05±0.13 kg); between-group $p=0.004$. 12 weeks after cessation of supplementation, no significant difference in ALM or TLM between the two groups
				57.26±10.4 years in placebo group	141.46±160.1 months in placebo group	
Marcora <i>et al.</i> ⁸⁹	Randomized controlled trial	20 patients in supplementation group 20 in placebo group	b-hydroxy-b-methylbutyrate, glutamine and arginine for 12 weeks	54±10	NR	At 12 weeks, no significant difference between the two groups
Aryaeian <i>et al.</i> ⁹⁰	Double-blind, randomized, placebo-controlled trial	31 patients in supplementation group 31 in placebo group	1500 mg barberry extract for 12 weeks	48.61 ± 11.69 in supplementation group 47.1±10.75 in placebo group	NR	At 12 weeks, significant decrease in PBF in the supplementation group <i>versus</i> placebo group
Siqueira <i>et al.</i> ⁹¹	Randomized, blinded, prospective, 16-week controlled trial	100 female patients (33 in land-based exercise group, 33 in water-based exercise group, and 34 in control group)	Water-based aerobic group	55±6 in water-based exercise group 54±5.1 in land-based exercise group 53.2±7 in control group	9.2±3.1 years in water-based exercise group 7.7±2.9 years in land-based exercise group 8.5±4 years in control group	No significant differences in total body composition (including body weight, lean or fat mass) in any of the groups during the period of intervention.
Marcora <i>et al.</i> ⁹²	Randomized controlled trial	10 patients in high-intensity progressive resistance training 10 patients in control group	High-intensity progressive resistance training	53±13 in intervention group 54±10 in control group	8.9±5.7 years in intervention group 7.3±5.3 years in control group	At 12 weeks, significant increase in TLM and significant decrease in PBF in the high-intensity progressive resistance training group compared with controls.
Lemmey <i>et al.</i> ⁹³ Lemmey <i>et al.</i> ⁹⁴	Randomized controlled trial Follow up of the previous trial	13 patients in high-intensity progressive resistance training 15 patients in control group	High-intensity progressive resistance training	55.6±8.3	74±76 months	Significant increase in TLM ($p=0.006$) and ALM ($p=0.004$) in the high-intensity progressive resistance training group compared with controls. No difference between the two groups after 3 years of follow up
Cooney <i>et al.</i> ⁹⁵	Prospective study	10 patients (8F/2M)	8 weeks of exercise	64±6	11±12 years	Significant decrease in PBF

(continued)

Table 2. (continued)

References	Type of study	Patients	Treatment	Mean age (years)	Disease duration	Conclusion
Konijn <i>et al.</i> ⁹⁶	Ancillary study of COBRA-light (non-inferiority) trial	54 patients in COBRA-light group 54 patients in COBRA group	COBRA-light group (prednisolone 30 mg/day, tapered off to 7.5 mg/day in 8 weeks) COBRA group (prednisolone 60 mg/day, tapered off to 7.5 mg/day in 6 weeks)	51±12 in COBRA-light group	20 (9–40) weeks in COBRA-light group	No difference between the two groups. Significant increase in total body and fat masses in all patients. However, no change in trunk/peripheral fat ratio
				54±13 in COBRA group	16 (9–33) weeks in COBRA group	
Engvall <i>et al.</i> ¹⁷	Controlled cross-sectional study	50 patients treated with prednisolone 50 patients never treated with prednisolone	Prednisolone	63 (56–68) in prednisolone group 64 (55–68) in control group	7.5 (4–12) years in prednisolone group 8 (5–18) years in control group	Significant increase in FM and PBF in prednisolone group compared with control group No difference in lean mass between the two groups
Resmini <i>et al.</i> ⁹⁷	Case-control study	26 patients in RA 78 non matched controls	Low doses of prednisone (5 mg every day or 10 mg every 2 days)	62.0±10.1 in RA group	NR	Significant decrease in TLM in RA group
Engvall <i>et al.</i> ⁹⁸	Ancillary study of Swefot (open, multicentre, randomised study)	22 patients in MTX-SLZ-HCQ group 18 patients in MTX-IFX group	To compare MTX-SLZ-HCQ versus MTX-IFX	59.5 (58.0–67.0) in MTX-SLZ-HCQ group 56.0 (42.0–73.0) in MTX-IFX	5.4±2.9 months in MTX-SLZ-HCQ group 4.9±3.4 months in MTX-IFX	Increase in fat mass (+3.77 kg, 1.63–5.90; $p=0.040$) with infliximab at 24 months. Changes in lean mass did not differ significantly between the treatment groups
Marcora <i>et al.</i> ⁹⁹	Randomized phase II controlled trial	12 patients in ETN group 12 patients in MTX group	ETN	54±11 in ETN group 50 ± 15 in MTX group	<6 months	At 24 weeks, only arm lean mass was significantly higher with etanercept compared with MTX
Serelis <i>et al.</i> ¹⁰⁰	Prospective study	19 F patients	TNF α inhibitors	54±18	9±7 years	At 1 year, no change in body composition
Toussiot <i>et al.</i> ¹⁸	Single-centre, prospective, open-label study over 2 years	Eight patients with RA	TNF α inhibitors (IFX, ADA, ETN)	60.5±3.4 in RA group	8.4±2.5 years in RA group	In RA group, significant increase in BMI ($p=0.05$), and trend towards significance for weight ($p=0.07$) and visceral fat ($p=0.059$).
Metsios <i>et al.</i> ¹⁰¹	Prospective study	20 patients in treatment group 12 controls matched for age, sex and BMI	TNF α inhibitors	61.1±6.8	17.3±11.4 years	At 12 weeks, no significant change in body composition

(continued)

Table 2. (continued)

References	Type of study	Patients	Treatment	Mean age (years)	Disease duration	Conclusion
Tournadre <i>et al.</i> ¹⁰²	1 year open follow-up study	21 patients with RA 21 controls matched for age, sex, BMI and criteria for metabolic syndrome	Tocilizumab	57.8±10.5	8.5 (1.7–21.5) years	At 1 year, significant gain in weight and BMI. In contrast, TLM, ALM and FFMI increased at 1 year. No change in VAT
Toussirot <i>et al.</i> ¹⁰³	Multicentre open-label study	107 patients (78F/29M)	Tocilizumab	56.6±13.5	9.9±8.1 years	No change in FM and PBF during the study
Via <i>et al.</i> ¹⁰⁴	1-year open monocentric follow-up study	52 RA patients in TNF α inhibitors 23 RA patients in non TNF α inhibitors 21 RA patients in csDMARDs	TNF α inhibitor Non TNF α inhibitors csDMARDs	TNF α inhibitors: 56.9±11.2 Non TNF α inhibitors: 56.9±11.2 csDMARDs: 57.9±10.8	TNF α inhibitors: 4.2 (1.6–12.0) Non TNF α inhibitors: 5.4 (2.3–14.8) csDMARDs: 0.3 (0.1–3.8)	TLM, FFMI and ALMI increased significantly in TNF α inhibitors group No change in body composition was observed in non TNF α inhibitors group No change in body composition was observed in csDMARDs group
Chikugo <i>et al.</i> ¹⁰⁵	3-month prospective study	8 female patients with RA	Tofacitinib versus bDMARDs	Tofacitinib: 55.3±19.5 bDMARDs: 57.0±14.7	8.5±6.6 years in tofacitinib group 5.8±10.8 years in bDMARDs group	At 3 months, body weight of patients in tofacitinib group tended to increase ($p=0.06$). Significant increase in PBF ($p<0.05$), but no change in TLM. No change in body composition in bDMARDs group

Results are expressed as mean \pm standard deviation or median (25th–75th percentile).
 ADA, adalimumab; ALM, appendicular lean mass; ALMI, appendicular lean mass index; bDMARDs, biological disease-modifying anti-rheumatic drugs; BIA, bioelectrical impedance; BMI, body mass index; COBRA, combinatietherapie bij reumatoide artritis; csDMARDs, conventional synthetic disease modifying anti-rheumatic drugs; DXA, dual X-ray absorptiometry; ETN, etanercept; F, female; FFM, fat free mass; FFMI, fat free mass index; FM, total fat mass; FMI, fat mass index; HCQ, hydroxychloroquine; IFX, infliximab; M, male; MTX, methotrexate; NR, not reported; PBF, body fat percentage; RA, rheumatoid arthritis; SLZ, sulfasalazine; TLM, total lean mass; TNF α , tumour necrosis factor alpha; VAT, visceral adipose tissue.

patients 12–24 weeks after a physical training intervention.

Siqueira *et al.* randomized 100 women with RA to three groups: one with land-based exercises, one with water-based exercises and one without exercise (control group). After 16 weeks, no significant changes in body composition or in muscle strength were observed between the groups.⁹¹ In a pilot trial, 10 patients participating in a supervised progressive resistance training (PRT) program were compared with 10 patients with no training program. At 12 weeks, a significant gain in TLM (primary outcome) (+1.2 kg, $p = 0.005$) and a significant loss of PBF (−1.1%, $p = 0.047$) were observed.⁹² Moreover, it was the increase in ALM that accounted for the significant increase in lean mass; changes in body composition were found to be associated with improvements in various physical function parameters.⁹² In a randomised controlled trial involving 28 patients, Lemmey *et al.* confirmed the efficacy of high-intensity PRT in restoring muscle mass and function in patients with RA.⁹³ At 24 weeks, the authors observed a significant gain in TLM (+1.5 kg, $p < 0.01$) and ALM (+1.2 kg, $p < 0.01$) in the high-intensity PRT group, but no changes in the control group (home-based range of movement exercise).⁹³ In a 3-year follow-up study, the authors reported that long-term resumption of normal activity resulted in the loss of PRT-induced improvements in lean mass and strength-related function.⁹⁴ In a small prospective non-controlled study assessing 8 weeks of exercise (aerobic exercise followed by PRT 3 times per week) in 10 RA patients (eight women; age 64 ± 6 years; disease duration 11 ± 12 years), a significant decrease in PBF assessed by BIA was found (−9%).⁹⁵ No lean mass measurements were performed.

The findings reported in these physical training intervention studies demonstrate that PRT improves lean mass and physical function.

Corticosteroids

Chronic exposure to corticosteroids is known to induce cushingoid appearance and weight gain.¹⁰⁶ Despite this, corticosteroids are recommended at the beginning of treatment for RA, but only as a short-term treatment. They should be tapered off as quickly as clinically feasible.¹⁰⁷

We found three studies (one prospective study and two cross-sectional studies)^{17,96,97} in which

DXA was used to evaluate changes in body composition (particularly fat mass and redistribution) in RA patients following corticosteroid treatment.

In a prospective study, Konijn *et al.* investigated the effects of two different high-dose, step-down prednisolone regimens on body composition in early RA patients after 26 weeks of treatment. This study was part of the larger multicentre COBRA-light trial (*Combinatietherapie Bij Reumatoïde Artritis*), which assessed the non-inferiority of COBRA-light therapy (prednisolone 30 mg/day, tapered off to 7.5 mg/day in 8 weeks, and methotrexate (MTX) escalated to 25 mg/week in 8 weeks) *versus* COBRA therapy (prednisolone 60 mg/day, tapered off to 7.5 mg/day in 6 weeks, MTX 7.5 mg/week and salazopyrine 2 g/day). Overall, 108 patients were evaluated ($n = 54$ in each group). All patients exhibited a significant increase in total body and fat mass (TBM + 1.6 kg, $p < 0.001$ and FM + 1.3, $p < 0.001$ respectively). Surprisingly, no changes in fat redistribution (trunk/peripheral fat ratio) were observed.⁹⁶ No significant changes in lean mass (total and appendicular) were observed in either group. In a cross-sectional study, body composition was assessed by DXA in 100 RA patients (50 women) with a median [interquartile (IQR)] disease duration of 8 (4–15) years. Fifty had been treated with prednisolone (5–7.5 mg) for at least 2 years and 50 gender- and age-matched patients had not. A significant increase in FM and PBF was observed in the prednisolone group compared with the control group, but no significant differences in fat redistribution and TLM were observed between the two groups.¹⁷ In another study, body composition was evaluated after endogenous (Cushing's syndrome) and exogenous (RA women, $n = 26$) exposure to glucocorticoids (5 mg of prednisone every day or 10 mg every 2 days).⁹⁷ However, due to the study design, no definitive conclusions could be drawn.

The findings reported in these studies demonstrate that exposure to corticosteroids increases total body and fat mass but, surprisingly, induces no changes in fat redistribution and lean mass.

Biologic disease modifying anti-rheumatic drugs

Individually-tailored treatment strategies featuring early and aggressive DMARDs use and frequent monitoring of treatment response to

achieve low disease activity (preferably clinical remission) form the cornerstone of pharmacological treatment in RA.¹⁰⁷ Conventional synthetic DMARDs are recommended as part of the first-line treatment strategy.¹⁰⁷

To date, no studies have been published that have specifically sought to investigate the effect of csDMARDs on body composition in RA patients. Biologic DMARDs are considered if the response to csDMARDs is insufficient or if the latter are contraindicated.¹⁰⁷ Most of the data on body composition were from studies on TNF α inhibitors.

We found two randomised controlled trials^{98,99} and four small prospective studies^{18,100,101} in which the effect of TNF α inhibitors on body composition in RA patients was assessed, mainly using DXA.

Engvall *et al.* investigated 40 early-RA patients in whom treatment with methotrexate (MTX) at a dose of up to 20 mg/week for 3 months had failed. The patients were randomised to an 'addition of sulfasalazine and hydroxychloroquine' group ($n = 22$) or an 'addition of TNF α inhibitors (infliximab)' group ($n = 18$). At 24 months, a significant increase in FM was observed in the infliximab treatment group (+3.8 *versus* +0.4 kg, $p = 0.04$), while changes in lean mass (both ALM and TLM) did not differ significantly between the two groups.⁹⁸

Marcora *et al.* conducted a study to assess the effect of etanercept on body composition. Twenty-four patients with early RA (disease duration <6 months) were randomized to two groups. In one group, the patients were treated with etanercept ($n = 12$) and in the other with MTX ($n = 12$). At 24 weeks, no significant changes in body composition were found.⁹⁹ Similar findings (i.e. no significant changes in body composition) were reported with TNF α inhibitors in three small prospective studies ($n = 8$ – 20) with various follow-up intervals (12 weeks to 2 years) and without control groups.^{18,100,101} On the other hand, in a 1-year open follow-up study involving 83 RA patients (75% women; mean age 58.5 years; median disease duration 3.7 years), Tournadre *et al.*¹⁰⁴ found significant changes in lean mass parameters in patients treated with TNF α inhibitors. In that study, the body composition parameters of 47 bDMARDs-naïve patients (mainly etanercept, $n = 35$) with active RA were compared with those of patients treated with csDMARDs alone ($n = 18$)

or with non-TNF α inhibitor bDMARDs ($n = 18$ including 2 with tocilizumab, 10 with rituximab and 6 with abatacept). No significant difference in BMI changes over time was observed in any of the treatment group. After 1 year of TNF α inhibitors, lean mass as assessed by TLM ($p = 0.015$), FFMI ($p = 0.013$) and ALMI ($p = 0.010$) increased significantly and was associated with an improvement in muscle function and strength. No change in body composition was observed at 12 months in patients treated with non-TNF α inhibitor bDMARDs or csDMARDs.¹⁰⁴ However, due to the lack of randomisation and the small sample size of the controls, no definitive conclusions can be drawn. Moreover, 45% of patients were on steroids (median dose 6.5 mg/day) with a heterogeneous distribution between the groups (72.2% in the non-TNF inhibitor bDMARDs group *versus* 38.3% in the TNF inhibitor groups *versus* 33.3% in the csDMARDs group).

In two open, prospective 1-year follow-up studies, treatment with the interleukin-6 (IL-6) inhibitor, tocilizumab, was reported to be associated with a gain in lean mass, but with no change in fat mass.^{102,103}

Tournadre *et al.*¹⁰² investigated the effect of tocilizumab on body composition in 21 patients with RA.² At baseline, the patients were compared with 21 controls matched for age, sex, BMI and metabolic syndrome criteria. After 1 year of treatment with tocilizumab, the authors observed a significant gain in weight and BMI (+1.9 kg, $p < 0.01$ and +1.2 kg/m², $p < 0.01$ respectively). Significant gains in ALM and TLM were observed at 12 months (+1.0 kg, $p < 0.001$ and +1.1 kg, $p < 0.05$ respectively). In contrast, no changes in FM were observed.¹⁰⁴ These findings in respect of lean mass were recently confirmed in a French multicentric study (the ADIPRAT study) conducted by Toussirot *et al.*¹⁰³ In that study, the authors assessed 107 RA patients who had begun treatment with tocilizumab. BC was evaluated by DXA at baseline and at 6 and 12 months. Significant increases in TLM were observed at 6 and 12 months (+1.0 kg, $p = 0.01$ and +1.3 kg, $p = 0.02$ respectively). Fat parameters did not change over time.

IL-6 is a myokine (i.e. a cytokine produced and released by myocytes under the action of contractile activity).¹⁰⁸ During exercise, its secretion induces an increase in the production of hepatic glucose, which serves as an energy source for contracting muscles. IL-6 also mediates the crosstalk

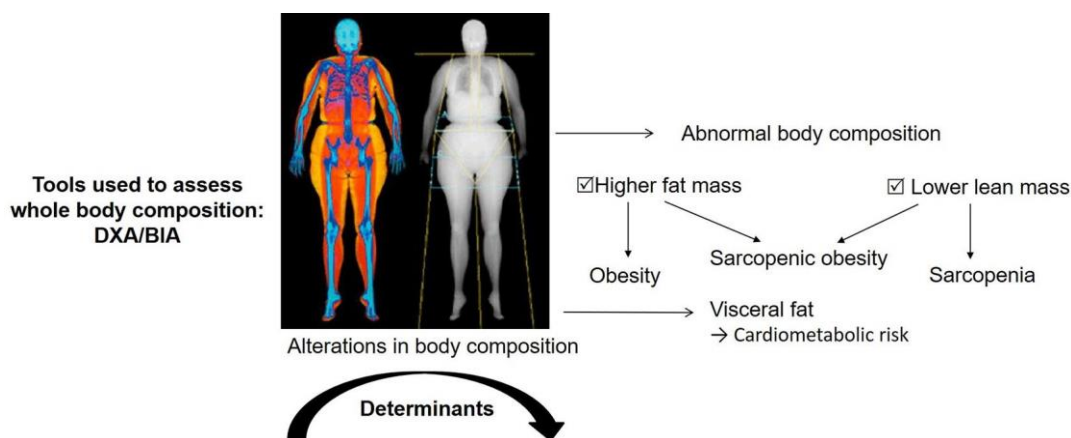


Figure 1. Body composition alterations in rheumatoid arthritis.

between insulin-sensitive tissues.¹⁰⁸ However, chronic exposure to IL-6 has been reported to be associated with muscle atrophy.¹⁰⁹ Inhibition of IL-6 attenuates muscular atrophy and dystrophy in several preclinical models.^{110,111}

There are no data available on the effect of other bDMARDs (such as abatacept or rituximab) on body composition in RA patients. Data on JAK inhibitors are too scarce to draw any definitive conclusions on their effect on body composition.¹⁰⁵

Patients with RA exhibit a significant loss of lean mass and a significant gain in fat mass (Figure 1). The use of TNF inhibitors might be associated with a further gain in fat mass with no major change in lean mass, while the use of the IL-6 inhibitor, tocilizumab, might be associated with a gain in lean mass with no further change in fat mass. However, there are limitations to the studies that sought to investigate the effect of tocilizumab, most notably the small number of patients, no randomization and no assessment of nutritional status and physical performance.

Limitations

Alterations in body composition in RA patients is a growing field of interest. However, there are several limitations to the studies we reviewed. Firstly, only four studies focused on patients with early RA. As a result, few conclusions can be drawn. In addition, in three of the four studies, the number of patients was small (less than 150). Moreover, the prevalence of sarcopenia in RA patients is difficult to estimate since different criteria were used to define sarcopenia. Further

studies are needed with the new EWGSOP criteria, which assess muscle function, mass and strength.¹⁹ Interventional studies are also lacking, especially on the effect of nutrition, exercise, corticosteroids and DMARDs on body composition in patients with RA. The studies assessing bDMARDs also lack statistical power, as few patients were included (less than 100 patients), limiting the conclusions that could be drawn.

Conclusion

In this review we identified several clinical studies on the assessment of and alterations in whole-body composition in patients with RA. However, the studies had several methodological limitations due to inconsistent definitions of altered body composition conditions. The findings reported in the studies demonstrate that (i) RA is characterized by alterations in body composition, and specifically a loss of lean mass and a gain in adiposity compared with healthy controls, regardless of sex, (ii) the prevalence of abnormal body composition conditions, such as overfat, sarcopenia, sarcopenic obesity and RC, is significantly higher in RA patients and (iii) these alterations in body composition are observed even at an early stage of the disease (i.e. before initiation of DMARDs).

Data on the effect of nutritional intervention, physical training and treatments (i.e. corticosteroids and bDMARDs) on body composition in RA patients are scarce. The findings reported in the studies demonstrate that (i) creatine supplementation and PRT programs induce a slight and temporary gain in lean mass, (ii) exposure to corticosteroids induces a gain in fat mass and (iii) the use of TNF

inhibitors might be associated with a gain in fat mass, while the use of tocilizumab might be associated with a gain in lean mass.

Longitudinal studies are needed to evaluate whether alterations in body composition are more pronounced in RA patients compared with controls. There are still many gaps in our understanding of the alterations in body composition that occur in RA patients, including their initiation and progression, their determinants and outcomes and their treatment.

Acknowledgements

The authors of this manuscript certify that they comply with the ethical guidelines for authorship and publishing. As this work is a review, there was no need to seek the approval of an Ethical Review Board.

All authors declare that the submitted work has not been published before (neither in English nor in any other language) and that the work is not under consideration for publication elsewhere.

Authors' note

The corresponding author attests that all listed authors meet authorship criteria and that no others meeting the criteria have been omitted.

Author Contributions

Conceptualization: J.G.L. and J.P.; methodology: J.P.; writing: original draft preparation: J.G.L.; writing: review and editing: J.P., R.M.F, AT and B.C.; visualization, J.P., R.M.F, A.T. and B.C.


Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

Funding

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

ORCID iDs

Jean-Guillaume Letarouilly  <https://orcid.org/0000-0003-2793-6303>

Julien Paccou  <https://orcid.org/0000-0001-6599-8623>

Supplemental material

Supplemental material for this article is available online.

References

1. Oude Voshaar MAH, Das Gupta Z, Bijlsma JWJ, *et al.* International consortium for health outcome measurement set of outcomes that matter to people living with inflammatory arthritis: consensus from an international working group. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2019; 71: 1556–1565.
2. Alamanos Y, Voulgari PV and Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 36: 182–1888.
3. Choy EH and Dures E. Fatigue in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2019; 58: v1–v2.
4. Zhang L, Cai P and Zhu W. Depression has an impact on disease activity and health-related quality of life in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Rheum Dis* 2020; 23: 285–293.
5. Safiri S, Kolahi AA, Hoy D, *et al.* Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990–2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: 1463–1471.
6. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, *et al.* Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primer* 2018; 4: 18001.
7. Kerschbaumer A, Sepriano A, Smolen JS, *et al.* Efficacy of pharmacological treatment in rheumatoid arthritis: a systematic literature research informing the 2019 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2020; 79: 744–759.
8. Ebina K, Hirano T, Maeda Y, *et al.* Drug retention of 7 biologics and tofacitinib in biologics-naïve and biologics-switched patients with rheumatoid arthritis: the ANSWER cohort study. *Arthritis Res Ther* 2020; 22: 142.
9. Sullivan E, Kershaw J, Blackburn S, *et al.* Biologic disease-modifying antirheumatic drug prescription patterns for rheumatoid arthritis among United States physicians. *Rheumatol Ther* 2020; 7: 383–400.
10. Lacaïlle D, Avina-Zubieta JA, Sayre EC, *et al.* Improvement in 5-year mortality in incident rheumatoid arthritis compared with the general population-closing the mortality gap. *Ann Rheum Dis* 2017; 76: 1057–1063.
11. Bartels CM, Bell CL, Shinki K, *et al.* Changing trends in serious extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis among United State veterans

- over 20 years. *Rheumatol Oxf Engl* 2010; 49: 1670–1675.
12. Yoshida T, Hashimoto M, Kawahara R, *et al.* Non-obese visceral adiposity is associated with the risk of atherosclerosis in Japanese patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Rheumatol Int* 2018; 38: 1679–1689.
 13. Chodara AM, Wattiaux A and Bartels CM. Managing cardiovascular disease risk in rheumatoid arthritis: clinical updates and three strategic approaches. *Curr Rheumatol Rep* 2017; 19: 16.
 14. 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* 2017; 76: 17–28.
 15. Book C, Karlsson MK, Akesson K, *et al.* Early rheumatoid arthritis and body composition. *Rheumatol Oxf Engl* 2009; 48: 1128–1132.
 16. Giles JT, Ling SM, Ferrucci L, *et al.* Abnormal body composition phenotypes in older rheumatoid arthritis patients: association with disease characteristics and pharmacotherapies. *Arthritis Rheum* 2008; 59: 807–815.
 17. Engvall I-L, Brismar K, Hafström I, *et al.* Treatment with low-dose prednisolone is associated with altered body composition but no difference in bone mineral density in rheumatoid arthritis patients: a controlled cross-sectional study. *Scand J Rheumatol* 2011; 40: 161–168.
 18. Toussiot É, Mourot L, Dehecq B, *et al.* TNF α blockade for inflammatory rheumatic diseases is associated with a significant gain in android fat mass and has varying effects on adipokines: a 2-year prospective study. *Eur J Nutr* 2014; 53: 951–961.
 19. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, *et al.* Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing* 2019; 48: 16–31.
 20. Cui C, Mackey RH, Shaaban CE, *et al.* Associations of body composition with incident dementia in older adults: cardiovascular health study-cognition study. *Alzheimers Dement* 2020; 16: 1402–1411.
 21. Tournadre A, Vial G, Capel F, *et al.* Sarcopenia. *Joint Bone Spine* 2019; 86: 309–134.
 22. Radkowski MJ, Sławiński P and Targowski T. Osteosarcopenia in rheumatoid arthritis treated with glucocorticosteroids - essence, significance, consequences. *Reumatologia* 2020; 58: 101–106.
 23. Stanley A, Schuna J, Yang S, *et al.* Distinct phenotypic characteristics of normal-weight adults at risk of developing cardiovascular and metabolic diseases. *Am J Clin Nutr* 2020; 112: 967–978.
 24. Shetty S, Kapoor N, Thomas N, *et al.* DXA measured visceral adipose tissue, total fat, anthropometric indices and its association with cardiometabolic risk factors in mother-daughter Pairs from India. *J Clin Densitom* 2020; 24: 146–155.
 25. Chen Y, He D, Yang T, *et al.* Relationship between body composition indicators and risk of type 2 diabetes mellitus in Chinese adults. *BMC Public Health* 2020; 20: 452.
 26. Adami G and Saag KG. Osteoporosis pathophysiology, epidemiology, and screening in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2019; 21: 34.
 27. Wang Y, Zhao R, Gu Z, *et al.* Effects of glucocorticoids on osteoporosis in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 2020; 31: 1401–1409.
 28. Raterman HG, Bultink IE and Lems WF. Osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis: an update in epidemiology, pathogenesis, and fracture prevention. *Expert Opin Pharmacother* 2020; 21: 1725–1737.
 29. Wang Z, Wang Z-M and Heymsfield SB. History of the study of human body composition: a brief review. *Am J Hum Biol* 1999; 11: 157–165.
 30. Mazzocchi G. Body composition: where and when. *Eur J Radiol* 2016; 85: 1456–1460.
 31. Ward LC. Human body composition: yesterday, today, and tomorrow. *Eur J Clin Nutr* 2018; 72: 1201–1207.
 32. Kuriyan R. Body composition techniques. *Indian J Med Res* 2018; 148: 648–658.
 33. Rothman MS, Miller PD, Lewiecki EM, *et al.* Bone density testing: science, the media, and patient care. *Curr Osteoporos Rep* 2014; 12: 227–229.
 34. Bazzocchi A, Diano D, Ponti F, *et al.* A 360-degree overview of body composition in healthy people: relationships among anthropometry, ultrasonography, and dual-energy x-ray absorptiometry. *Nutrition* 2014; 30: 696–701.
 35. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, *et al.* Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: report of the European Working Group on Sarcopenia in older people. *Age Ageing* 2010; 39: 412–423.
 36. Piché M-E, Tchernof A and Després J-P. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases. *Circ Res* 2020; 126: 1477–1500.

37. Kobayashi M, Ogawa S, Tayama J, *et al.* Intra-abdominal fat accumulation is an important predictor of metabolic syndrome in young adults. *Medicine (Baltimore)* 2020; 99: e22202.
38. Tewari N, Awad S, Macdonald IA, *et al.* A comparison of three methods to assess body composition. *Nutrition* 2018; 47: 1–5.
39. Xu L, Cheng X, Wang J, *et al.* Comparisons of body-composition prediction accuracy: a study of 2 bioelectric impedance consumer devices in healthy Chinese persons using DXA and MRI as criteria methods. *J Clin Densitom* 2011; 14: 458–464.
40. Micklesfield LK, Goedecke JH, Punyanitya M, *et al.* Dual-energy X-ray performs as well as clinical computed tomography for the measurement of visceral fat. *Obes Silver Spring* 2012; 20: 1109–1114.
41. Morrell GR, Ikizler TA, Chen X, *et al.* Psoas muscle cross-sectional area as a measure of whole-body lean muscle mass in maintenance hemodialysis patients. *J Ren Nutr* 2016; 26: 258–264.
42. Ceniccola GD, Castro MG, Piovacari SMF, *et al.* Current technologies in body composition assessment: advantages and disadvantages. *Nutrition* 2018; 62: 25–31.
43. Böhm A and Heitmann BL. The use of bioelectrical impedance analysis for body composition in epidemiological studies. *Eur J Clin Nutr* 2013; 67(Suppl. 1): S79–S85.
44. Buffa R, Mereu E, Succa V, *et al.* Specific BIVA recognizes variation of body mass and body composition: two related but different facets of nutritional status. *Nutrition* 2017; 35: 1–5.
45. Bosaeus I, Wilcox G, Rothenberg E, *et al.* Skeletal muscle mass in hospitalized elderly patients: comparison of measurements by single-frequency BIA and DXA. *Clin Nutr* 2014; 33: 426–431.
46. Shuhart CR, Yeap SS, Anderson PA, *et al.* Executive summary of the 2019 ISCD position development conference on monitoring treatment, DXA cross-calibration and least significant change, spinal cord injury, periprosthetic and orthopedic bone health, transgender medicine, and pediatrics. *J Clin Densitom* 2019; 22: 453–471.
47. Cesari M, Kritchevsky SB, Baumgartner RN, *et al.* Sarcopenia, obesity, and inflammation—results from the trial of angiotensin converting enzyme inhibition and novel cardiovascular risk factors study. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 428–434.
48. Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, *et al.* Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 755–763.
49. Janssen I, Baumgartner RN, Ross R, *et al.* Skeletal muscle cutpoints associated with elevated physical disability risk in older men and women. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 413–421.
50. Delmonico MJ, Harris TB, Lee J-S, *et al.* Alternative definitions of sarcopenia, lower extremity performance, and functional impairment with aging in older men and women. *J Am Geriatr Soc* 2007; 55: 769–774.
51. Muscaritoli M, Anker SD, Argilés J, *et al.* Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) “cachexia-anorexia in chronic wasting diseases” and “nutrition in geriatrics”. *Clin Nutr* 2010; 29: 154–159.
52. Fielding RA, Vellas B, Evans WJ, *et al.* Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc* 2011; 12: 249–256.
53. Morley JE, Abbatecola AM, Argiles JM, *et al.* Sarcopenia with limited mobility: an international consensus. *J Am Med Dir Assoc* 2011; 12: 403–409.
54. Chen L-K, Liu L-K, Woo J, *et al.* Sarcopenia in Asia: consensus report of the Asian working group for sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc* 2014; 15: 95–101.
55. Studenski SA, Peters KW, Alley DE, *et al.* The FNIH sarcopenia project: rationale, study description, conference recommendations, and final estimates. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69: 547–558.
56. Santilli V, Bernetti A, Mangone M, *et al.* Clinical definition of sarcopenia. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2014; 11: 177–180.
57. Beaudart C, Zaaria M, Pasleau F, *et al.* Health outcomes of sarcopenia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2017; 12: e0169548.
58. Chin SO, Rhee SY, Chon S, *et al.* Sarcopenia is independently associated with cardiovascular disease in older Korean adults: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) from 2009. *PLoS One* 2013; 8: e60119.
59. Rohm M, Zeigerer A, Machado J, *et al.* Energy metabolism in cachexia. *EMBO Rep* 2019; 20: e47258.

60. Santo RCE, Fernandes KZ, Lora PS, *et al.* Prevalence of rheumatoid cachexia in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2018; 9: 816–825.
61. Engvall I-L, Elkan A-C, Tengstrand B, *et al.* Cachexia in rheumatoid arthritis is associated with inflammatory activity, physical disability, and low bioavailable insulin-like growth factor. *Scand J Rheumatol* 2008; 37: 321–328.
62. Book C, Karlsson MK, Nilsson J-Å, *et al.* Changes in body composition after 2 years with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2011; 40: 95–100.
63. Dao H-H, Do Q-T and Sakamoto J. Abnormal body composition phenotypes in Vietnamese women with early rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl* 2011; 50: 1250–1258.
64. Turk SA, van Schaardenburg D, Boers M, *et al.* An unfavorable body composition is common in early arthritis patients: a case control study. *PLoS One* 2018; 13: e0193377.
65. Müller R, Kull M, Pölluste K, *et al.* Factors associated with low lean mass in early rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Med Kaunas Lith* 2019; 55: 730.
66. Reina D, Gómez-Vaquero C, Díaz-Torné C, *et al.*; Rheumatology Service. Hospital Moisès Broggi. Assessment of nutritional status by dual X-Ray absorptiometry in women with rheumatoid arthritis: a case-control study. *Medicine (Baltimore)* 2019; 98: e14361.
67. Elkan A-C, Engvall I-L, Tengstrand B, *et al.* Malnutrition in women with rheumatoid arthritis is not revealed by clinical anthropometrical measurements or nutritional evaluation tools. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62: 1239–1247.
68. Lemmey AB, Wilkinson TJ, Clayton RJ, *et al.* Tight control of disease activity fails to improve body composition or physical function in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology* 2016; 55: 1736–1745.
69. Delgado-Frías E, González-Gay MA, Muñiz-Montes JR, *et al.* Relationship of abdominal adiposity and body composition with endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2015; 33: 516–523.
70. Ngeuleu A, Allali F, Medrara L, *et al.* Sarcopenia in rheumatoid arthritis: prevalence, influence of disease activity and associated factors. *Rheumatol Int* 2017; 37: 1015–1020.
71. Vlietstra L, Meredith-Jones K, Stebbings S, *et al.* Sarcopenic obesity is more prevalent in osteoarthritis than rheumatoid arthritis: are different processes involved? *Rheumatol Oxf Engl* 2017; 56: 1816–1818.
72. Torii M, Hashimoto M, Hanai A, *et al.* Prevalence and factors associated with sarcopenia in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. Epub ahead of print 11 September 2018. DOI: 10.1080/14397595.2018.1510565.
73. Lin J-Z, Liang J-J, Ma J-D, *et al.* Myopenia is associated with joint damage in rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2019; 10: 355–367.
74. Tada M, Yamada Y, Mandai K, *et al.* Matrix metalloprotease 3 is associated with sarcopenia in rheumatoid arthritis - results from the CHIKARA study. *Int J Rheum Dis* 2018; 21: 1962–1969.
75. Mochizuki T, Yano K, Ikari K, *et al.* Sarcopenia-associated factors in Japanese patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Geriatr Gerontol Int* 2019; 19:907–912.
76. Feklistov A, Demin N and Toroptsova N. AB0330 osteoporosis, sarcopenia and osteosarcopenia in women with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2018; 77(Suppl. 2): 1340.
77. Kondrashov A, Shostak N and Muradyants A. Fri0052 body composition in men with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: 687–688.
78. Casabella A, Ruaro B, Seriola C, *et al.* Sat0549 sarcopenia in rheumatoid arthritis female patients: relationship between whole body and trabecular bone score. *Ann Rheum Dis* 2019; 78(Suppl. 2): 1367.
79. Park D-J, Kang J-H, Xu H, *et al.* Thu0152 sarcopenia is associated with persistent disease activity during follow-up of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2019; 78(Suppl. 2): 349.
80. El Maghraoui A, Sadni S, Rezqi A, *et al.* Does rheumatoid cachexia predispose patients with rheumatoid arthritis to osteoporosis and vertebral fractures? *J Rheumatol* 2015; 42: 1556–1562.
81. Hugo M, Mehseu-Cetre N, Pierreisnard A, *et al.* Energy expenditure and nutritional complications of metabolic syndrome and rheumatoid cachexia in rheumatoid arthritis: an observational study using calorimetry and actimetry. *Rheumatology (Oxford)* 2016; 55: 1202–1209.
82. Elkan A-C, Håkansson N, Frostegård J, *et al.* Rheumatoid cachexia is associated with dyslipidemia and low levels of atheroprotective natural antibodies against phosphorylcholine but not with dietary fat in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R37.

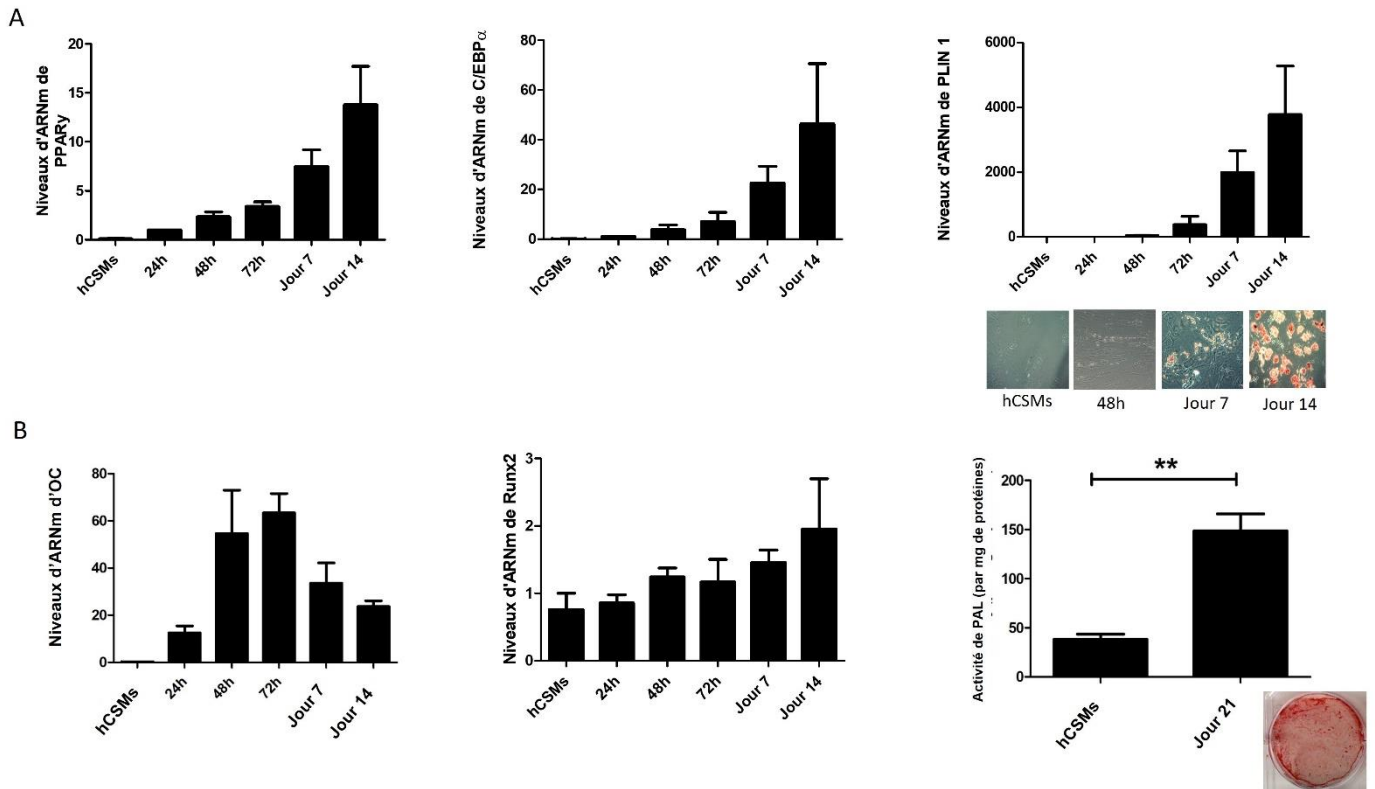
83. Santo RC, Silva JM, Lora PS, *et al.* Cachexia in patients with rheumatoid arthritis: a cohort study. *Clin Rheumatol* 2020; 39: 3603–3613.
84. Hull HR, Thornton J, Wang J, *et al.* Fat-free mass index: changes and race/ethnic differences in adulthood. *Int J Obes* 2005 2011; 35: 121–127.
85. Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, *et al.* Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 694–701.
86. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, *et al.* 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 2569–2581.
87. Hofman A, Brusselle GGO, Darwish Murad S, *et al.* The Rotterdam study: 2016 objectives and design update. *Eur J Epidemiol* 2015; 30: 661–708.
88. Wilkinson TJ, Lemmey AB, Jones JG, *et al.* Can creatine supplementation improve body composition and objective physical function in rheumatoid arthritis patients? A randomized controlled trial. *Arthritis Care Res* 2016; 68: 729–737.
89. Marcora S, Lemmey A and Maddison P. Dietary treatment of rheumatoid cachexia with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, glutamine and arginine: a randomised controlled trial. *Clin Nutr* 2005; 24: 442–454.
90. Aryaeian N, Sedehi SK, Khorshidi M, *et al.* Effects of hydroalcoholic extract of *Berberis Integerrima* on the anthropometric indices and metabolic profile in active rheumatoid arthritis patients. *Complement Ther Med* 2020; 50: 102331.
91. Siqueira US, Orsini Valente LG, de Mello MT, *et al.* Effectiveness of aquatic exercises in women with rheumatoid arthritis: a randomized, controlled, 16-week intervention-the HyDRA trial. *Am J Phys Med Rehabil* 2017; 96: 167–175.
92. Marcora SM, Lemmey AB and Maddison PJ. Can progressive resistance training reverse cachexia in patients with rheumatoid arthritis? Results of a pilot study. *J Rheumatol* 2005; 32: 1031–1039.
93. Lemmey AB, Marcora SM, Chester K, *et al.* Effects of high-intensity resistance training in patients with rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Rheum* 2009; 61: 1726–1734.
94. Lemmey AB, Williams SL, Marcora SM, *et al.* Are the benefits of a high-intensity progressive resistance training program sustained in rheumatoid arthritis patients? A 3-year followup study. *Arthritis Care Res* 2012; 64: 71–75.
95. Cooney JK, Ahmad YA, Moore JP, *et al.* The impact of cardiorespiratory fitness on classical cardiovascular disease risk factors in rheumatoid arthritis: a cross-sectional and longitudinal study. *Rheumatol Int* 2019; 39: 1759–1766.
96. Konijn NPC, van Tuyl LHD, Boers M, *et al.* The short-term effects of two high-dose, step-down prednisolone regimens on body composition in early rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl* 2016; 55: 1615–1622.
97. Resmini E, Farkas C, Murillo B, *et al.* Body composition after endogenous (Cushing's syndrome) and exogenous (rheumatoid arthritis) exposure to glucocorticoids. *Horm Metab Res* 2010; 42: 613–618.
98. Engvall I-L, Tengstrand B, Brismar K, *et al.* Infliximab therapy increases body fat mass in early rheumatoid arthritis independently of changes in disease activity and levels of leptin and adiponectin: a randomised study over 21 months. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R197.
99. Marcora SM, Chester KR, Mittal G, *et al.* Randomized phase 2 trial of anti-tumor necrosis factor therapy for cachexia in patients with early rheumatoid arthritis. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 1463–1472.
100. Serelis J, Kontogianni MD, Katsiogiannis S, *et al.* Effect of anti-TNF treatment on body composition and serum adiponectin levels of women with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2008; 27: 795–797.
101. Metsios GS, Stavropoulos-Kalinoglou A, Douglas KMJ, *et al.* Blockade of tumour necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: effects on components of rheumatoid cachexia. *Rheumatol Oxf Engl* 2007; 46: 1824–1827.
102. Tournadre A, Pereira B, Dutheil F, *et al.* Changes in body composition and metabolic profile during interleukin 6 inhibition in rheumatoid arthritis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2017; 8: 639–646.
103. Toussiot E, Marotte H, Mulleman D, *et al.* Increased high molecular weight adiponectin and lean mass during tocilizumab treatment in patients with rheumatoid arthritis: a 12-month multicentre study. *Arthritis Res Ther* 2020; 22: 224.
104. Vial G, Lambert C, Pereira B, *et al.* The effect of TNF and non-TNF-targeted biologics on body composition in rheumatoid arthritis. *J Clin Med* 2021; 10: 487.
105. Chikugo M, Sebe M, Tsutsumi R, *et al.* Effect of Janus kinase inhibition by tofacitinib on body composition and glucose metabolism. *J Med Invest* 2018; 65: 166–170.

106. Burt MG, Gibney J and Ho KKY. Characterization of the metabolic phenotypes of Cushing's syndrome and growth hormone deficiency: a study of body composition and energy metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 436–443.
107. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis* 2020; 79: 685–699.
108. Manole E, Ceafalan LC, Popescu BO, *et al.* Myokines as possible therapeutic targets in cancer cachexia. *J Immunol Res* 2018; 2018: 8260742.
109. Moresi V, Adamo S and Berghella L. The JAK/STAT pathway in skeletal muscle pathophysiology. *Front Physiol* 2019; 10: 500.
110. Yakabe M, Ogawa S, Ota H, *et al.* Inhibition of interleukin-6 decreases atrogene expression and ameliorates tail suspension-induced skeletal muscle atrophy. *PLoS One* 2018; 13: e0191318.
111. Wada E, Tanihata J, Iwamura A, *et al.* Treatment with the anti-IL-6 receptor antibody attenuates muscular dystrophy via promoting skeletal muscle regeneration in dystrophin-/utrophin-deficient mice. *Skelet Muscle* 2017; 7: 23.

Visit SAGE journals online
[journals.sagepub.com/
home/tab](https://journals.sagepub.com/home/tab)

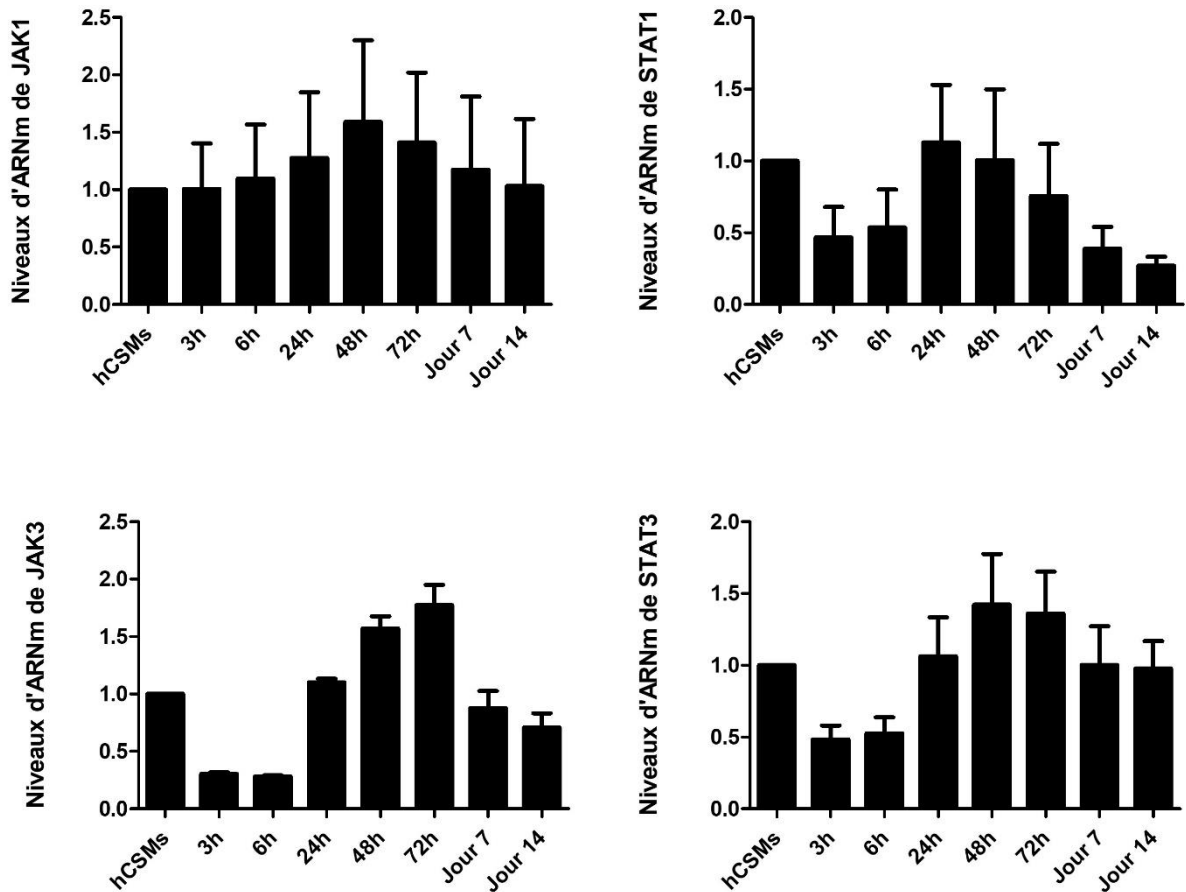
 SAGE journals

Annexe V Validation des différenciations adipocytaire et ostéoblastique dans notre modèle



La différenciation adipogénique des hBMSCs a été confirmée par **(A)** analyse Q-PCR des niveaux d'ARNm de marqueurs adipogéniques (PPAR γ , C/EBP α , PLIN 1) réalisée sur une période de 14 jours à partir de J0 de l'induction (hBMSCs contrôles) et par coloration Oil Red O. La différenciation ostéogénique des hBMSCs a été confirmée **(B)** par analyse Q-PCR des niveaux d'ARNm de marqueurs ostéogéniques (RUNX2, OC) réalisée sur une période de 14 jours à partir de J0 de l'induction (hBMSCs contrôle). L'activité ALP et la coloration rouge alizarine a été réalisée à 21 jours de différenciation. Les données présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Annexe VI Niveau d'expression génique des couples JAK1/STAT1 et JAK3/STAT3 au cours de la différenciation adipocytaire



Le niveau d'expression génique des couples JAK1/STAT1 et JAK3/STAT3 au cours de la différenciation adipogénique des hBMSCs a été évaluée par analyse Q-PCR des niveaux d'ARNm réalisée sur une période de 14 jours à partir de J0 de l'induction (hBMSCs contrôles). Les données présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes.



Stimulatory Effect of Tofacitinib on Bone Marrow Adipocytes Differentiation

Jean-Guillaume Letarouilly¹, Julien Paccou¹, Sammy Badr², Christophe Chauveau³, Odile Broux³ and Aline Clabaut^{3*}

¹ Université de Lille, Centre Hospitalier Universitaire CHU CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE (CHU) Lille, MABLab ULR 4490, Service de Rhumatologie, Lille, France, ² Université de Lille, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Lille, MABLab ULR 4490, Service de Radiologie et Imagerie Musculosquelettique, Lille, France, ³ Université Littoral Côte d'Opale, MABLab ULR 4490, Boulogne-sur-Mer, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Jason Horton,
Upstate Medical University,
United States

Reviewed by:

Silke Frey,
University Hospital Erlangen, Germany
Kaisa K. Ivaska,
University of Turku, Finland

*Correspondence:

Aline Clabaut
aline.clabaut@univ-littoral.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Bone Research,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 22 February 2022

Accepted: 12 May 2022

Published: 06 July 2022

Citation:

Letarouilly J-G, Paccou J,
Badr S, Chauveau C, Broux O and
Clabaut A (2022) Stimulatory Effect of
Tofacitinib on Bone Marrow
Adipocytes Differentiation.
Front. Endocrinol. 13:881699.
doi: 10.3389/fendo.2022.881699

Background: Systemic inflammation is the main factor underlying secondary osteoporosis in patients with rheumatoid arthritis (RA). Janus kinase inhibitors (JAKi), such as tofacitinib (Tofa), can control systemic inflammation and may have beneficial effects on bone in various models. This might be due to direct effects on the bone microenvironment and not exclusively based on their anti-inflammatory function. Bone marrow adipocytes (BMAd) are abundant in the bone microenvironment. The effect of JAKi on BMAd is unknown, but evidence suggests that there is competition between human bone marrow-derived stromal cell (hBMSC) differentiation routes towards BMAd and osteoblasts (Ob) in osteoporosis.

Objectives: The aims of the study are to determine whether Tofa influences BMAd and Ob derived from hBMSCs and to investigate the potential effects of Tofa on bone marrow adiposity in RA patients.

Methods: To determine the effect of Tofa on cellular commitment, hBMSCs were differentiated to BMAd or OBs for 3 days together with Tofa at 200, 400, or 800 nM and TNF α . This study was also conducted using differentiated BMAd. The impact of Tofa was determined by gene and protein expression analysis and cell density monitoring. In parallel, in a pilot study of 9 RA patients treated with Tofa 5 mg twice a day (NCT04175886), the proton density fat fraction (PDFF) was measured using MRI at the lumbar spine at baseline and at 6 months.

Results: In non-inflammatory conditions, the gene expression of Runx2 and Dlx5 decreased in Ob treated with Tofa ($p < 0.05$). The gene expression of PPAR γ 2, C/EBP α , and Perilipin 1 were increased compared to controls ($p < 0.05$) in BMAd treated with Tofa. Under inflammatory conditions, Tofa did not change the expression profiles of Ob compared to TNF α controls. In contrast, Tofa limited the negative effect of TNF α on BMAd differentiation ($p < 0.05$). An increase in the density of differentiated BMAd treated

with Tofa under TNF α was noted ($p < 0.001$). These findings were consolidated by an increase in PDFF at 6 months of treatment with Tofa in RA patients ($46.3 \pm 7.0\%$ versus $53.2 \pm 9.2\%$ $p < 0.01$).

Conclusion: Together, these results suggest a stimulatory effect of Tofa on BMAd commitment and differentiation, which does not support a positive effect of Tofa on bone.

Keywords: tofacitinib, rheumatoid arthritis, human bone marrow-derived stromal cells, bone marrow adipocytes, osteoblasts, differentiation

1 INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic, immune-mediated disease characterized by synovitis and/or inflammation of periarticular structures and systemic inflammation with a prevalence in the range of 0.5–1.0% in Western countries (1, 2). Osteoporosis is a common feature in patients with RA and leads to an increased risk of fractures (3). In a meta-analysis, patients with RA had a significantly higher risk of fractures than patients without RA (relative risk = 2.25, 95% CI [1.76–2.87]) (4).

Systemic inflammation is the main factor underlying this secondary osteoporosis in RA patients. Cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 6 (IL-6) directly stimulate the maturation of osteoclasts and inhibit the differentiation of osteoblasts (Ob), leading to an imbalance in bone resorption and bone formation (5).

Twenty years ago, RA often led to joint destruction and considerable disability. Since then, scientific progress has prompted major advances in the treatment of the disease (2). Janus Kinase inhibitors (JAKi), which inhibit the JAK/STAT (signal transducer and activator of transcription) pathway can control the disease activity and thus prevent joint destruction (6–8). Moreover, JAKi, such as tofacitinib (Tofa), can control systemic inflammation and may have beneficial effects on bone. Tofa inhibits several STATs such as STAT1, STAT3, and STAT5 (9, 10). Two *in vitro* studies showed that Tofa may enhance osteogenic differentiation (11, 12). One study showed an increase in osteocalcin (OC) expression in murine bone marrow-derived stromal cells treated with Tofa 1 day after osteogenic induction. In

contrast, the expression of runt-related transcription factor 2 (Runx2), the key transcription factor in osteogenesis, was not affected by Tofa (11). In the other study, Runx2 expression only increased under hypoxic conditions in human bone marrow-derived stromal cells (hBMSCs) treated with Tofa 7 days after osteogenic induction (12).

In a one-year pilot study, no changes in bone mineral density (BMD) by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) were observed in RA patients under Tofa ($n = 26$) whereas C-terminal collagen crosslinks (CTX) significantly decreased (13). Furthermore, Vidal et al. analyzed how treatment intervention with Tofa prevents the early disturbances of bone structure and mechanics in a rat model of adjuvant-induced arthritis (14). Tofa could control the inflammatory activity and, to increase cortical bone and trabecular hardness measured by nanoindentation, but did not reverse the effects of arthritis on the cortical and trabecular bone structure and on mechanical properties (14).

More studies are needed to understand the impact of Tofa on bone, as previous studies used different models and conditions.

This impact might be due to direct effects on the bone microenvironment and not exclusively based on its anti-inflammatory function. Bone marrow adipocytes (BMAds) are abundant in the bone microenvironment (15) and have been historically viewed as passive ‘fillers’ of bone marrow space that are metabolically inert (16). An increasing number of studies have shown that there is an association between decreased bone mass and the accumulation of bone marrow adipose tissue, suggesting a competition between hBMSCs differentiation routes toward BMAds and Ob in osteoporosis (15)

The study aimed to determine whether Tofa influences the cells of the bone microenvironment, such as BMAds and Ob derived from hBMSCs, under inflammatory and noninflammatory conditions. Then, in a prospective pilot study, we investigated the potential effects of Tofa on bone marrow adiposity and bone parameters in patients with RA.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Cell Culture Experiments

2.1.1 Cell Culture and Induction of Osteogenic and Adipogenic Differentiation

Purified hBMSCs from 3 donors (1 female, 20 years; 2 males, 25 and 22 years) were purchased from RoosterBio (Frederick, MD, USA). Cells were specified as >90% positive for CD73, CD90, and

Abbreviations: bDMARDs, Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drugs; BMAds, Bone Marrow Adipocytes; BMD, Bone Mineral Adiposity; C/EBP α , CCAAT/enhancer-binding protein alpha; CRP, C Reactive Protein; csDMARDs, Conventional Synthetic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs; CTX, C-terminal collagen crosslinks; Dlx5, Distal-less homeobox 5; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DXA, Dual-energy X-ray Absorptiometry; FCS, Fetal Calf Serum; hBMSC, human bone marrow-derived stromal cell; IL, interleukin; IPAQ-SF, International Physical Activity Questionnaire—Short Form; JAK, Janus Kinase; JAKi, JAK inhibitors; MRI, Magnetic Resonance Imaging; Ob, Osteoblast; PBS, Phosphate Buffered Saline; PCR, Polymerase Chain Reaction; PDFF, Proton Density Fat Fraction; PLIN, Perilipin; PPAR γ 2, Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma 2; RA, Rheumatoid Arthritis; RNA, Ribonucleic Acid; Runx2, Runt-related transcription factor 2; STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription; TNF α , Tumor Necrosis Factor alpha; Tofa, Tofacitinib; WST-1, Water Soluble Tetrazolium Salts-1; Ywhaz, tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein.

CD105, and <10% negative for CD14, CD34, and CD45 surface marker expression.

Differentiation experiments were started when hBMSCs reached confluence (D0). To induce osteogenesis, hBMSCs were cultured in DMEM (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) with 10% FCS (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with osteogenic inducers (50 mM ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate, and 10^{-8} M vitamin D3 (Sigma-Aldrich)). For adipogenic differentiation, hBMSCs were cultured in DMEM with 10% FCS supplemented with adipogenic inducers (0.5 mM dexamethasone, 0.5 mM isobutyl-1-methylxanthine, and 50 mM indomethacin (Sigma-Aldrich)). hBMSCs were cultured with 1 ng/ml TNF α (Gibco, Carlsbad, CA, USA) to mimic the inflammatory conditions in RA. The differentiation protocols were previously validated, as presented in Supplementary Figure 1.

To determine the impact of Tofa at an early commitment, hBMSCs were differentiated into Ob or BMAd in appropriate media for 3 days with TNF α and Tofa. To evaluate the effect of Tofa on fully differentiated BMAds, a similar treatment was applied for 6 days after 14 days of differentiation (Figure 1).

2.1.2 Test Reagents

Tofa was graciously provided by Pfizer (New York, NY, USA), dissolved in sterile water and stored at -20°C after sonication. Recombinant human TNF α was purchased from Gibco (Carlsbad, CA, USA), dissolved in sterile water and stored at -20°C . Three concentrations of Tofa were used: 200, 400, and 800 nM. According to Pfizer, Tofa at 400 nM was considered as equivalent of the therapeutic dosage of Tofa used in RA (5 mg twice a day).

2.1.3 Cell Viability Assay

In 96-well plates, Ob and BMAds were incubated with Tofa and TNF- α before being treated with 10 ml of WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1; Roche, Mannheim, Germany).

The mixture was then incubated for 4 h at 37°C , after which the absorbance was measured at 450 nm. The reference wavelength was measured at 690 nm.

2.1.4 Oil Red O Staining

After 20 days, differentiated BMAds were fixed in 2% paraformaldehyde for 15 min, washed in water, incubated with 60% isopropanol for 5 min, and stained with newly filtered Oil Red O solution for 10 min at room temperature. After staining, the cells were rinsed with water before counterstaining with hematoxylin solution, Gill no. 3 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 5 min at room temperature.

2.1.5 BMAd Density, BMAd Droplet Surface, and BMAd Surface

After 20 days, differentiated BMAds were fixed in 2% paraformaldehyde for 15 min, washed in water. BMAd density was assessed by counting the number of BMAds and the total number of cells in 12 images (6 per donor) for each condition. The BMAd droplet surface was assessed in 60 BMAds (30 per donor), and the BMAd surface was assessed in 100 BMAds (50 per donor) using ImageJ software (version 1.45).

2.1.6 RNA Expression Measurement

2.1.6.1 RNA Isolation

Total RNA was extracted from Ob and BMAd using an RNeasy[®] Micro Kit including a DNase I digestion step (Qiagen, Hilden, Germany), according to the instructions of the manufacturer, and quantified by Nanodrop at 260 nm wavelength.

2.1.6.2 mRNA Expression Analysis

Total RNA was reverse transcribed using a Maxima First-Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and subjected to quantitative real-time PCR on the StepOnePlus[®] system (Applied Biosystems, Foster City, CA,

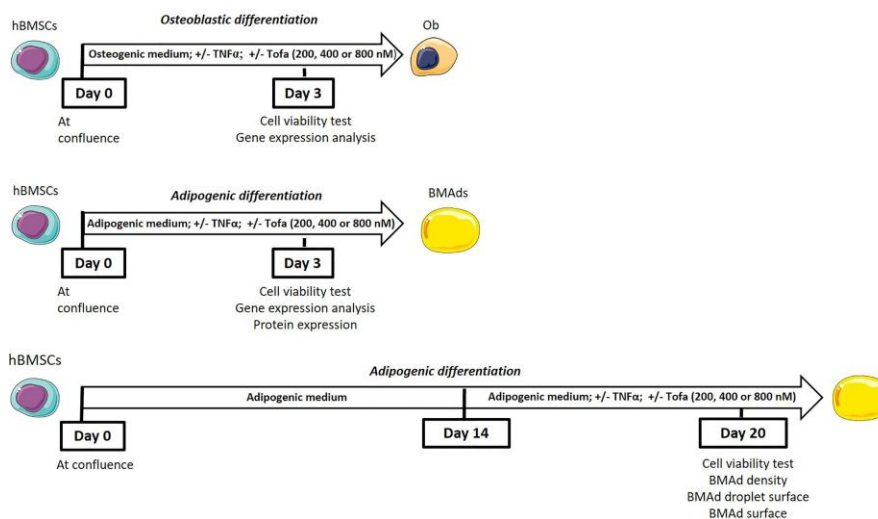


FIGURE 1 | General scheme of the experiments.

TABLE 1 | Primer sequences and conditions of PCR.

cDNA	GenBank	Forward and reverse primers	Ta (°C)	Product (pb)
<i>RNAPol2</i>	NM_000937	F: 5'-CCAAGCAGGACGTAATAGAGG-3' R: 5'-GCGGTCTAGCAACTCGTTCT-3'	55	193
<i>PPIA</i>	NM_021130	F: 5'-ACCGTGTTCTTCGACATTGC-3' R: 5'-CAGGACCCGTATGCTTTAGGA-3'	55	274
<i>PPARg2</i>	NM_015869	F: 5'-CAAACCCCTATTCCATGCTGTT-3' R: 5'-AATGGCATCTCTGTGCAACC-3'	53	135
<i>C/EBPa</i>	NM_004364	F: 5'-ACTGGGACCCTCAGCCTTG-3' R: 5'-TGGACTGATCGTGCTTCGTG-3'	55	75
<i>IL6</i>	NM_000600	F: 5'-CAATGAGGAGACTTGCCCTGG-3' R: 5'-GCACAGCTCGGCTTGTCC-3'	53	113
<i>PLIN 1</i>	NM_002666	F: 5'-GAGACTGCGGAATTTGC-3' R: 5'-ATCGAGAGAGGGTGTGGTC-3'	58,2	222
<i>Ywhaz</i>	NM_145690	F: 5'-GGTCATCTTGGAGGTCGTC-3' R: 5'-GTCATCACGAGCGGCAAC-3'	55	245
<i>Runx2</i>	AF001450	F: 5'-GCTGTTATGAAAACCAAGT-3' R: 5'-GGGAGGATTTGTGAAGAC-3'	60	108
<i>OC</i>	NM_199173	F: 5'-ATGAGAGCCCTCACACTCTC-3' R: 5'-GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC-3'	55	293
<i>Dlx5</i>	BC006226	F: 5'-CCAGAGAAAGAAGTGACCGA-3' R: 5'-CCTGTGTTGTGTCAATCCC-3'	55	190

The primer sequences, annealing temperatures (Ta), lengths of the corresponding PCR products and GenBank accession numbers are shown. F, Forward; R, Reverse. *IL6*, Interleukin 6; *PLIN 1*, Perilipin 1; *C/EBPa*, CCAAT/enhancer-binding protein alpha; *PPARg2*, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2; *PPIA*, peptidylpropyl isomerase; *Runx2*, Runt-related transcription factor 2; *Ywhaz*, Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein; *OC*, Osteocalcin; *Dlx5*, Distal-less homeobox 5.

USA) using POWER SYBR[®] Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) and specific primers designed using Oligo 6 software (MedProbe), or Taqman Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and specific probes (Table 1). Relative gene expression levels were normalized to YWHAZ (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein) and PPIA (peptidylprolyl isomerase A) for Ob and RNAPol2 (RNA polymerase II) and YWAZ transcripts for BMADs and determined using the 2^{-DDCt} method.

2.1.7 Protein Sampling, Quantification, and Western Blot Analysis

For sampling, BMADs were washed in ice-cold PBS (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) and lysed in lysis buffer [HEPES, MgCl₂, Glycerol, KCl, EDTA, DTT] supplemented with Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and sodium orthovanadate. Cellular debris was discarded by centrifugation after cell lysis. To adjust the protein concentration, extracts were quantified using the DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to the instructions of the manufacturer and denatured in 4× Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Protein extracts were separated on 8% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto 0.2 μm nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using a Trans-Blot Turbo System (semidry transfer) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membranes were blocked in 5% bovine serum albumin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for phosphorylated proteins or with 5% skimmed milk for the other proteins in Tris-buffered saline solution with 0.05% Tween 20 (Acros Organics, Morris Plains, NJ, USA) for 1 h. Blots were probed with antibodies against the following targets overnight: anti-phospho-STAT3 (Tyr705; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-STAT 3 (D3Z2G; Cell

Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-Actin (A2066, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and anti-Perilipin (D1D8; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated immunoglobulin G (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) was used as secondary antibody. Blots were developed using Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent substrate (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) in a chemiluminescence imager (Amersham Imager 600, GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Band intensities were measured using ImageQuant TL (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Band intensity was semiquantified using ImageJ software (version 1.45). Actin was used as an internal control for normalization.

2.2 Clinical Research

2.2.1 Study Design and Patients

The TOFAT study was an open, prospective 6-month follow-up study (NCT04175886) assessing the impact of Tofa on bone marrow adiposity, BMD, and body composition in RA patients 18 years and older. Key inclusion criteria include 2010 RA ACR/EULAR classification criteria (17), and an indication for Tofa. Key exclusion criteria included oral corticosteroids >10 mg prednisone/day; patients on or considering a restrictive diet during the study period; patients undertaking or planning to undertake an intense exercise program; history of treatment with bone active substances such as bisphosphonates; weight >160 kg; and any MRI contraindication. In patients who were receiving Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drugs (bDMARDs), a five-half-life washout period was required between bDMARD interruption and inclusion in the study.

2.2.2 Study Approval

The study protocol was approved by the local Institutional Review Board (2019-001159-37), and the study procedures

complied with the ethical standards of the relevant institutional and national Human Experimentation Ethics Committees (reference CPP 40/19). All patients provided written informed consent. The study was designed to include 38 patients but was prematurely stopped due to the results of the safety Phase IV randomized clinical trial (18). Only 10 patients were included, and one participant was excluded at follow-up due to discontinuation of Tofa before 6 months.

2.2.3 Clinical Assessment

Demographic and clinical characteristics were recorded, particularly the 28-joint Disease Activity Score (DAS28), adjusted for C Reactive Protein (CRP) levels, current use of conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (csDMARDs) and corticosteroids, and physical activity using the International Physical Activity Questionnaire-Short Form (IPAQ-SF) and the handgrip test. Past use of bDMARDs was also recorded.

2.2.4 Bone Mineral Density and Body Composition Measurements Using DXA Scan

Bone mineral density (BMD) in RA patients was measured at the lumbar spine (L1-L4) and at the nondominant hip using a DXA scan (HOLOGIC Horizon W S/N 300869M).

All RA patients underwent total body DXA scanning (HOLOGIC Horizon W S/N 300869M). Fat, lean, and bone mass for the total body and per region (arms, legs, and trunk) were measured and analyzed using validated software from the manufacturer (version 13.6.0.5). Body fat percentage (BFP, %) was calculated as the proportion of total fat mass (TFM) to total mass. Appendicular lean mass (kg) was computed as the sum of the tissue compartment (lean) of both arms and legs. Visceral adipose tissue (VAT, cm²) was recorded.

2.2.5 Laboratory Variables

Fasting (at least 8 h) blood samples were obtained. Serum cross-laps (CTX) were measured by a chemiluminescence assay using the IDS-iSYS Multi-Discipline Automated Analyzer (Immunodiagnostic Systems, Inc., Fountain Hills, AZ). Plasma concentrations of leptin were measured by ELISA using the E07 kit provided by Mediagnost (Reutlinger, Germany).

2.2.6 Bone Marrow Adiposity Measurement by MRI

2.2.6.1 Imaging Acquisition

All subjects underwent an MRI examination on a 3 Tesla system (Ingenia; Philips Healthcare, Best, Netherlands) using the built-in 12-channel posterior body coil and a 16-channel anterior coil, under the supervision of a senior musculoskeletal radiologist. Patients were positioned head-first in the supine position. A conventional imaging protocol was performed first, including T1- and T2-weighted 2-point Dixon turbo-spin echo (TSE) acquisitions in the sagittal plane, followed by an optional T2-weighted acquisition in the axial plane based on clinical history and the decision of the radiologist.

Immediately after this clinical exploration, bone marrow adiposity quantification (proton density fat fraction, PDFF) was achieved using a six-echo three-dimensional gradient echo

sequence (mDixon-Quant; Philips Healthcare, Best, Netherlands), permitting a chemical shift encoding-based water-fat separation at the lumbar spine (sagittal). Imaging parameters were repetition time (TR)/echo time (TE)/DTE: 11/ 1.43/1.1 ms; field of view (FOV): 220 × 220 mm; voxel size: 1.8 × 1.8 mm; slice thickness: 3 mm; number of excitations: 1; no SENSE acceleration; fold-over direction: foot-head; bandwidth: 1,563 Hz and scan time: 1 min 41 s. In both situations, a low flip angle of 3° was used to minimize T1-bias (19).

2.2.6.2 Bone Marrow Adiposity Quantification

A senior musculoskeletal radiologist (SB) reviewed all examinations on a dedicated workstation (IntelliSpace Porta; Phillips Healthcare, Best, the Netherlands). A systematic morphological assessment was conducted first, looking for lumbosacral transitional vertebrae, degenerative changes, and bone marrow replacement lesions. Based on the 3 most sagittal slices acquired using the mDixon-Quant sequence, polygonal regions of interest (polygonal ROI) were drawn in the vertebral body of L1 to L4, avoiding subchondral bone, replacing lesions, severe degenerative changes, and the basivertebral vein. For each subject, a mean proton density fat fraction (PDFF) was calculated as an average of all measured values in the lumbar spine, from L1 to L4.

2.3 Statistical Analysis

Categorical variables are expressed as numbers (percentage), and continuous variables are expressed as the means (standard deviation, SD, or standard error of the mean, SEM). The normality of model residuals was assessed graphically and using a D'Agostino's K-squared test. Changes were examined during treatment by comparing baseline and 6-month values using a paired t-test or a Wilcoxon signed-rank test, depending on the normality of intra-patient differences. In the *in vitro* study, all experiments were repeated at least three times, and the Mann-Whitney U test and Student's t-test were used according to the distribution of the data. Statistical testing was performed at the two-tailed α level of 0.05. Data were analyzed using the GraphPad Prism software package, release 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3 RESULTS

3.1 Tofa Does Not Inhibit Survival of hBMSCs During Ob or BMAd Differentiation

Cytotoxicity tests were performed to assess whether cell survival is influenced by Tofa concentrations at 200, 400, and 800 nM (Figure 2).

We observed no changes during BMAd differentiation (BMAds at 3 days) regarding proinflammatory or noninflammatory conditions or the doses of Tofa tested. In Ob differentiated at 3 days, Tofa did not impact cellular viability but rather seemed to improve it when the cells were in the presence of TNF α . In fact, the significant decrease in cellular viability observed in Ob TNF α compared to the control was not observed in Ob TNF α + Tofa.

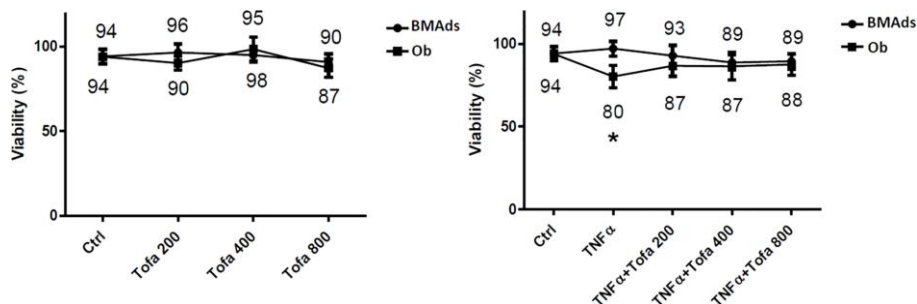


FIGURE 2 | Effect of Tofa and TNF α on the cellular viability of hBMSCs. Ob and BMAds were differentiated from hBMSCs for 3 days and treated with Tofa (200, 400, and 800 nM) and TNF α (1 ng/ml). Cell viability was assessed using the WST-1 method, and the percentage of viability is shown above and below the symbols. Data represent the mean \pm SD of four independent experiments. * p < 0.05 versus control (untreated group) by Mann-Whitney U test.

3.2 Tofa Treatment Has Little Effect on Ob Differentiation But Increases BMAds Differentiation Under Noninflammatory Conditions

To determine the impact of Tofa on cellular commitment, gene expression analysis was performed on specific markers related to Ob and BMAds differentiation. The results of quantitative real-time RT-PCR are displayed as the relative expression of mRNA levels in the Tofa-treated group compared to the control (untreated group).

Under noninflammatory conditions, we showed that Tofa significantly decreased expression levels of Runx2 at 400 nM and at 800 nM and Dlx5 (Distal-less homeobox 5, another key transcription factor of Ob differentiation) for all concentrations compared with the Ob control (p < 0.05) (Figure 3A). No effect of Tofa on osteocalcin gene expression levels was observed (Figure 3A).

Conversely, BMAds treated with Tofa exhibited a significant increase in the gene expression of PPAR γ 2, C/EBP α (two key transcription factors of BMAds differentiation) and Perilipin 1 (PLIN 1), the most specific marker associated with lipid droplet compared with BMAds controls (p < 0.05). An increase was observed from 200-nM Tofa for each marker (Figure 3B).

The increase in expression of PLIN was also confirmed at the protein level in BMAds cultivated for 9 days in adipogenic medium, whatever the Tofa concentration applied (Figure 3C).

3.3 Tofa Limits the Negative Effect of TNF α During Differentiation But Only in an Adipocytic Context

As expected, the addition of TNF α stimulated proinflammatory cytokine expression in both cultures, as demonstrated here by the increase in IL6 gene expression up to 300-fold higher in BMAds TNF α and 9-fold in Ob TNF α compared to the controls, which were untreated BMAds and Ob (Figure 4A).

TNF α also impacted Ob and BMAd differentiation, marked by a significant decrease in Runx2 (40%), Dlx5 (58%), OC (62%) (Figure 4B), PPAR γ 2 (83.5%), C/EBP α (80%), and PLIN 1 (97%) (Figure 4C).

The addition of Tofa to TNF α did not change the expression profiles of Ob compared to TNF α controls (Figure 4B). In

contrast, analysis of PPAR γ 2 gene expression revealed that the addition of Tofa limited the negative effect of TNF α on BMAd differentiation (Figure 4C). Expression levels of PPAR γ 2 were increased by an average of 4, 2.5, and 1.3 times, in response to Tofa 200, 400, and 800 nM, compared to TNF α -treated cells.

3.4 A Positive Effect of Tofa on BMAds Under Inflammatory Condition Was Also Observed at a Later Stage of Maturation

Given our results above, we chose to further evaluate the action of Tofa on BMAds after 14 days of differentiation followed by 6 days of TNF α + Tofa treatment. Previously, the effect of TNF α + Tofa on the cellular viability of differentiated BMAds was assessed and no change was observed compared to the control, BMAds + TNF α (Figure 5A).

To evaluate the effect of Tofa, optical images of BMAds treated with TNF α + Tofa at 200, 400, and 800 nM were analyzed and BMAd density was determined (number of BMAds/number of total cells). First, we observed a phenotypic change and a decrease in BMAd density in response to TNF α treatment. In fact, TNF α induced a phenotypic conversion of BMAds toward a fibroblastic phenotype with a drastic decrease in BMAd surface (p < 0.001) and droplet surface compared to controls (p < 0.001) (Figure 5B).

The addition of Tofa to the culture media limited the phenotypic conversion and maintained a BMAd density close to that of the control (untreated cells) with a dose-response effect (Figure 5C). The surface of BMAds was affected at 200 nM (p < 0.01), but not at 400 or 800-nM Tofa (Figure 5D).

3.5 Tofa Inhibits pSTAT3 in BMAds

Although TOFA is a specific inhibitor of JAK1/3 and inhibits STAT1/3 phosphorylation, we were preferentially interested in the phosphorylation profile of STAT3 (pSTAT3) after 3 days of hBMSC differentiation. Indeed, the JAK3/STAT3 signaling pathway was upregulated during adipocyte differentiation and associated with an upregulation of pSTAT3 expression profile (Figure 6A). For JAK1/STAT1, the expression levels were stable during differentiation and were similar to those found in hBMSCs (data not shown). In response to Tofa, pSTAT3

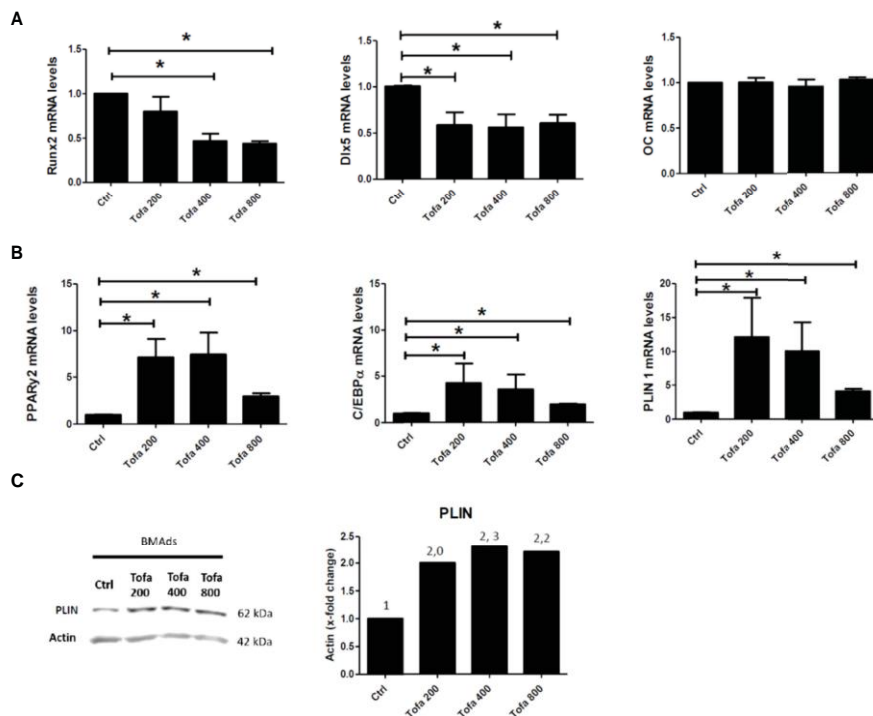


FIGURE 3 | Effect of Tofa on Ob and BMAds differentiation under noninflammatory conditions. Ob and BMAds were differentiated from hBMSCs and treated with Tofa (200, 400, and 800 nM) for 3 days. Ctrl: Ob or BMAds untreated (A, B) Quantitative RT-PCR analysis of osteoblast (A) and adipocyte-specific genes on day 3 (B). Data are expressed as means \pm SEM. Statistical significance was calculated using the Mann-Whitney U test (* $p < 0.05$). (C) Western blot analysis of hBMSCs cultivated 9 days in adipogenic medium with Tofa 200, 400, and 800 nM. Representative western blots for PLIN with actin as a loading control and corresponding quantification of protein quantity (PLIN/Actin).

markedly decreased in BMAds compared to controls (untreated cells), suggesting a potential role for STAT3 in the expansion of bone marrow adipose tissue (Figure 6B).

3.6 Bone Marrow Adiposity is Increased in RA Patients Treated With Tofa

3.6.1 Baseline Characteristics of Patients

Age and disease duration (mean (SD)) were 58.0 (10.1) years and 7.3 (8.3) years, respectively. DAS28-CRP was 3.81 (1.2). Five patients were currently receiving corticosteroids (prednisone) at a dosage of less than 10 mg per day (6.8 (2.9) mg per day). Two patients had previously received at least one anti-TNF α treatment.

3.6.2 Clinical, Physical and Body Composition Changes in RA Patients During Treatment With Tofa

One participant was excluded at follow-up due to discontinuation of Tofa before 6 months. No significant change in disease activity was noted (DAS 28 CRP: 3.81 (1.19) vs 3.00 (1.06), $p = 0.16$). After 6 months of Tofa, a significant increase in the handgrip test was noted, whereas no change in BMI was observed (Table 2).

Changes in body composition, BMD, and lumbar spine PDFF are presented in Table 2. After 6 months of Tofa, a significant

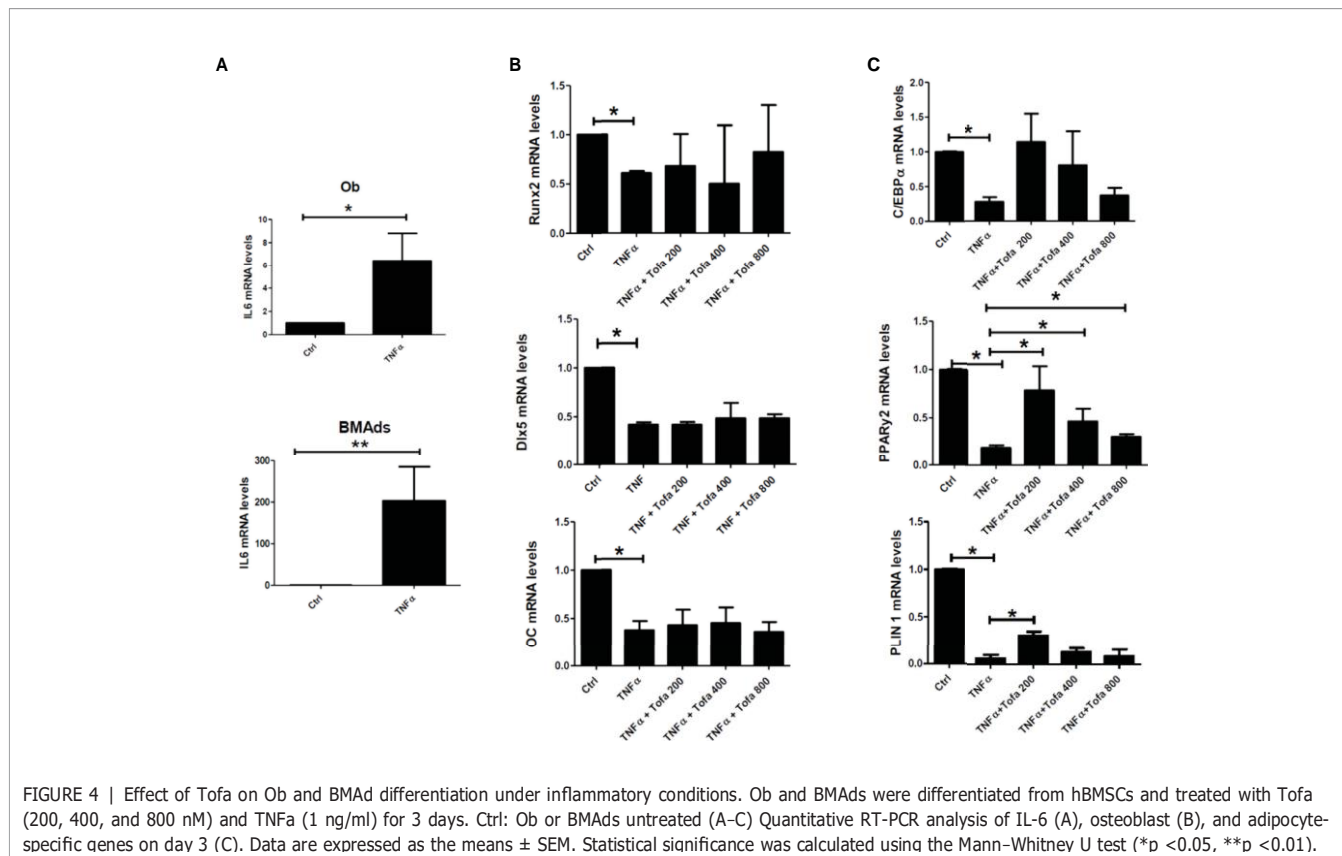
increase in the lumbar spine PDFF was noted (46.3% (7.0) vs 53.2% (9.2), $p = 0.008$) (Figure 7), whereas no changes in BMD or body composition were observed.

No significant changes in CTX (3,503 (1,830) pmol/L vs. 2,712 (2,196) pmol/L, $p = 0.91$), or leptin (14.9 (19.7) ng/L vs. 19.4 (24.9) ng/L, $p = 0.30$) levels were observed at 6 months.

4 DISCUSSION

Studies have reported an increased risk of bone loss and fracture in RA patients (20). Tofa may have beneficial effects on bone, which might be due to direct effects on the bone microenvironment and not exclusively based on its anti-inflammatory function. As common progenitor cells of BMAds and Ob, hBMSCs are delicately balanced in their differentiation commitment (21, 22). In osteoporosis, numerous *in vitro* and clinical investigations have demonstrated the ability of hBMSCs to differentiate in a preferential way toward BMAds (23–28). In this study, the ability of Tofa to counteract this imbalance was investigated. For that, the effects of Tofa on the viability and Ob and BMAd differentiation of hBMSCs were assessed.

First, the lack of data on this subject led us to explore the influence of Tofa under noninflammatory conditions. The results



at the cellular and molecular levels revealed that Tofa promoted adipocyte differentiation, even at low concentrations, but decreased the Ob differentiation after 3 days of treatment. Tofa has a fast onset of action, as the impact of Tofa on adipocytes and Ob differentiation has already been observed after only 3 days of treatment.

Concomitantly to our work, a stimulating effect of Tofa on differentiated adipocytes has also been reported on primary human bone marrow cells isolated from patients undergoing orthopedic surgery (29). In this study, Russell et al. reported an increase in the number of adipocytes for cells differentiated and treated by Tofa for 14 or 21 days.

Considering those results, we investigated the origin of the expansion of the adipose tissue treated with Tofa. Adipose tissue expansion results either from an increase in the size of differentiated adipocytes (adipocyte hypertrophy) and/or an increase in the formation of new adipocytes (adipocyte hyperplasia). This question was also raised by Russell et al. and was answered through the experiments conducted in our study. Indeed, measurements of the BMA surface did not show an increase in the surface under Tofa, but the number of adipocytes was increased for the highest concentrations of Tofa (400 and 800 nM). These new findings confirm that Tofa participates in the expansion of adipose tissue by recruiting more preadipocytes and activating their differentiation. Consequently, we can also conclude that the increase in PLIN protein expression observed by western-blotting is therefore related to the appearance of new

adipocytes rather than to the increase in the number of lipid droplets in the adipocytes already formed. This impact could be mediated through STAT3 inactivation. However, it has been shown in different studies that STAT3 is a rather pro-adipogenic factor (29, 30). Furthermore, in another *in vitro* model, Tofa treatment also resulted in off-target activation, leading to great complexity in its signaling (31, 32). Therefore, further studies are therefore needed to understand the mechanism that induces increased adipogenesis under Tofa.

Second, to get as close as possible to the inflammatory conditions of pathology, we treated the cultures with TNF α in addition to Tofa. Numerous studies have focused on the effect of TNF α on Ob and have shown the deleterious effect of this molecule on differentiation, characterized by a drastic decrease in Ob factors such as Runx2 or Dlx5 (33). However, even when gene expression levels of Runx2/Dlx5 were lowered by the effect of TNF α , tofacitinib was unable to counteract the action of TNF α and to stimulate Runx2 or Dlx5 as in noninflammatory conditions. These results support the latest published results and oppose the osteoanabolic effect previously described in the literature (11, 12). Russell et al. observed that Tofa did not affect the Ob differentiation at 14 days, as assessed by ALP activity and accumulation of calcium (34). Similarly, Gaber's experiments did not reveal any changes in the gene expression of osteoblastic markers in hBMSCs treated with Tofa 7 days after osteogenic induction, grown under standard conditions. An increase in Runx2 expression was observed only under hypoxic conditions (12).

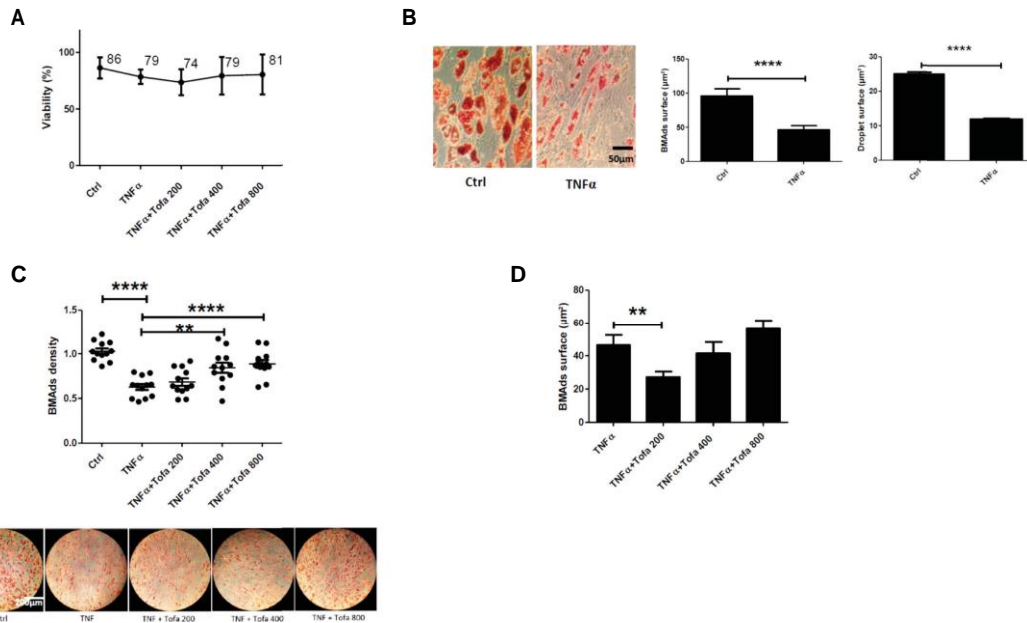


FIGURE 5 | Effect of Tofa on differentiated BMAds under inflammatory condition. BMAds were differentiated from hBMSCs for 14 days and then cultured in the presence or absence of Tofa and TNF α for 6 days. (A) Cell viability was assessed using the WST-1 method, and the percentage of viability is shown above and below the symbols. Data represent the mean \pm SD of four independent experiments. (B) Representative image showing the effect of TNF α treatment on adipogenesis, visualized by the uptake of oil red into lipid vacuoles (red). Quantification of BMAd surface and droplet surface (μm^2) after TNF α treatment. (C) Quantification of the number of BMAds (number of BMAds/number of total cells) and (D) BMAd surface, after TNF α and Tofa treatment. (B–D) Data are expressed as the means \pm SEM (n = 2). Statistical significance was calculated using Mann-Whitney U test for non-parametric variables and Student’s t-test (**p < 0.01, ****p < 0.0001).

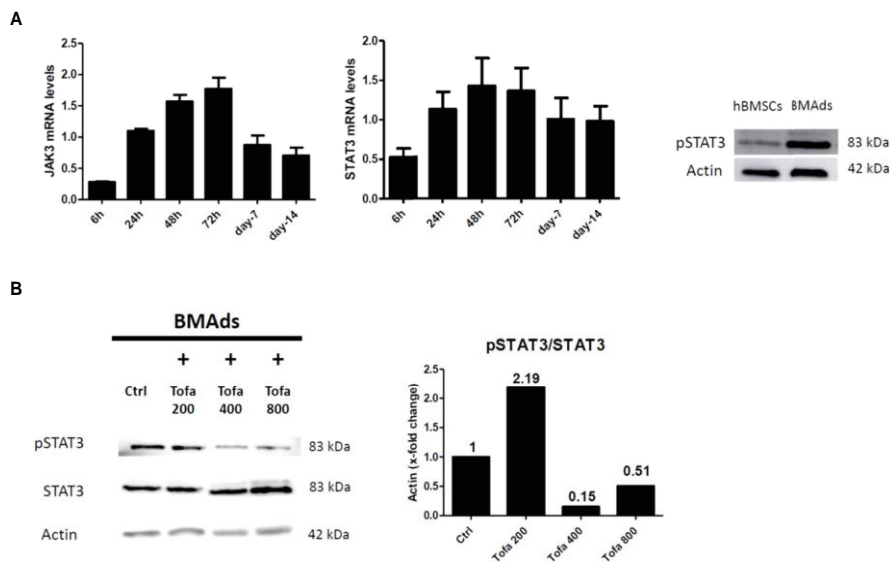
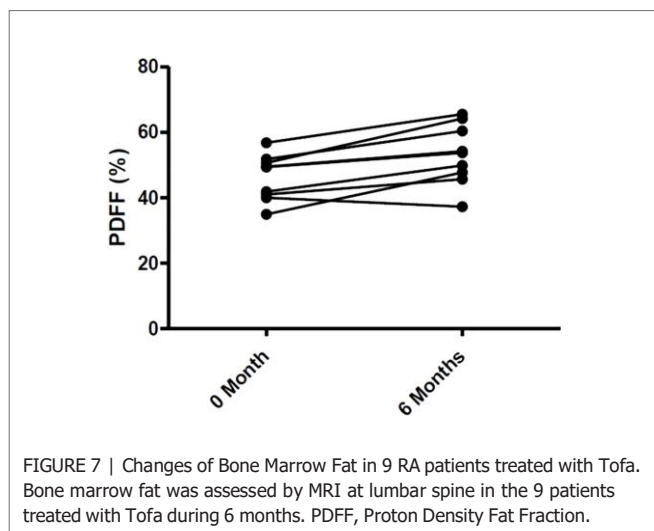


FIGURE 6 | Analysis of pSTAT3 profile in BMAds. Quantitative RT-PCR analysis of JAK3 and STAT3 (A) during adipocyte differentiation compared to day 0 (hBMSCs confluent). STAT3 activity (pSTAT3) during adipocyte differentiation was demonstrated by western blot analysis. BMAds were differentiated 48 h in adipogenic medium and compared to hBMSCs. (B) Western blot analysis was used to determine relative pSTAT3/STAT3 expression in BMAds after 48 h of differentiation and treated 3 days with Tofa (200, 400, and 800 nM). Actin was used as a loading control. Data are representative of three independent experiments.



In contrast, Tofa appears to attenuate the deleterious effect of TNF α on the cellular viability of hBMSCs placed in osteogenic medium. In a recent study and in a different context, the protective effect of Tofa on cellular viability has also been reported (35). The authors used an oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced normal rat small intestinal epithelial cell model to simulate the physiological environment of intestinal I/R injury, treated or not with Tofa. The results showed that Tofa exerted protective effects on oxidative stress and inflammation in these cells but also on apoptosis during OGD/R. This effect could be mediated through the inhibition of the JAK/STAT3 pathway since the use of an agonist of this pathway partially abrogated the beneficial effect of Tofa.

In humans, the effects of Tofa on bone marrow adiposity in RA patients have never been evaluated. We have now conducted a prospective pilot study in 9 patients with RA, in which Tofa increased lumbar spine PDFF and resulted in no changes in BMD or body composition over 6 months. These clinical findings reinforce the *in vitro* results on the stimulatory effect of Tofa on BMAd differentiation, even if several limitations are to be underlined in this study. The hBMSCs used were obtained from

healthy donors and treated with TNF α , which only partially reflected the pathology. It would be interesting to validate these results using hBMSCs collected from RA patients, especially since the clinical data obtained predicts a similar positive effect of Tofa on adipocyte differentiation. Clinically, we acknowledge that 6 months of follow-up is a short period to evaluate the BMD and body composition in patients treated with Tofa, and that 9 patients is a small population, but despite that, we were able to observe an increase in lumbar spine PDFF.

In conclusion, *in vitro* and clinical results suggest a stimulatory effect of Tofa on BMAd commitment and differentiation, which does not seem to support the beneficial effects of Tofa on the bone microenvironment. Studies on the impact of the other JAKi on bone marrow adiposity are needed to determine whether the stimulatory effect on bone marrow adiposity is a class effect or is specific to Tofa.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Institutional Review Board of CHU de Lille (2019-001159-37) and the National Human Experimentation Ethics Committees (reference CPP 40/19). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J-GL and AC performed the experiments. J-GL, JP, and AC wrote the manuscript. All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

TABLE 2 | Changes in rheumatoid arthritis patients treated with Tofacitinib for 6 months.

Patients	MON = 9	M6N = 9	Absolute difference	P-value
Body mass index, kg/m ²	25.9 (3.4)	26.1 (6.3)	+0.2	0.64
Handgrip test, kg	22.5 (8.9)	27.9 (14.0)	+5.4	0.01
IPAQ-SF, MET-min/week	6,203 (8,461)	7,110 (4,111)	+907	0.49
Body Fat Percentage, %	3939.4 (8.5)	39.4 (9.0)	0	0.46
Appendicular lean mass, kg	16.6 (4.5)	16.7 (4.9)	+0.1	0.50
Visceral Adipose Tissue, cm ²	150 (81)	173 (88)	+23	0.18
Lumbar spine BMD, g/cm ²	1.011 (0.142)	0.996 (0.146)	-0.015	0.058
Femoral neck BMD, g/cm ²	0.728 (0.108)	0.713 (0.095)	-0.015	0.30
Total hip BMD, g/cm ²	0.902 (0.130)	0.891 (0.105)	-0.011	0.82
Lumbar spine PDFF (%)	46.3 (7.0)	53.2 (9.2)	+6.9	0.008
CTX, pmol/L	3,503 (1,830)	2,712 (2,196)	-791	0.91
Leptine, ng/L	14.9 (19.7)	19.4 (24.9)	+4.5	0.30

Data reported as mean (Standard Deviation) unless otherwise indicated. CTX, Cross lags; DAS, Disease Activity Score; IPAQ-SF, International Physical Activity Questionnaire—Short Form; MET, Metabolic Equivalent of Task; PDFF, Proton Density Fat Fraction. Bold values mean statistically significant.

FUNDING

JGL was supported by a PhD grant from Société Française de Rhumatologie and from ISite-ULNE. The TOFAT study received funding from Pfizer. The funder was not involved in the study design, collection, analysis, interpretation of data, the writing of this article or the decision to submit it for publication. All authors declare no other competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

Tofacitinib (Tofa) was graciously provided by Pfizer. TOFAT was sponsored by Pfizer with an unrestricted grant.

REFERENCES

- Oude Voshaar MAH, Das Gupta Z, Bijlsma JWJ, Boonen A, Chau J, Courvoisier DS, et al. International Consortium for Health Outcome Measurement Set of Outcomes That Matter to People Living With Inflammatory Arthritis: Consensus From an International Working Group. *Arthritis Care Res (Hoboken)* (2019) 71:1556–65. doi: 10.1002/acr.23799
- Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid Arthritis. *Nat Rev Dis Primers* (2018) 4:18001. doi: 10.1038/nrdp.2018.1
- Tanaka Y. Managing Osteoporosis and Joint Damage in Patients With Rheumatoid Arthritis: An Overview. *J Clin Med* (2021) 10:1241. doi: 10.3390/jcm10061241
- Xue AL, Wu SY, Jiang L, Feng AM, Guo HF, Zhao P. Bone Fracture Risk in Patients With Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *Med (Baltimore)* (2017) 96:e6983. doi: 10.1097/MD.0000000000006983
- Tanaka Y. Clinical Immunity in Bone and Joints. *J Bone Miner Metab* (2019) 37:2–8. doi: 10.1007/s00774-018-0965-5
- Lee EB, Fleischmann R, Hall S, Wilkinson B, Bradley JD, Gruben D, et al. Tofacitinib Versus Methotrexate in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* (2014) 370:2377–86. doi: 10.1056/NEJMoa1310476
- Genovese MC, Kremer J, Zamani O, Ludivico C, Krogulec M, Xie L, et al. Baricitinib in Patients With Refractory Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* (2016) 374:1243–52. doi: 10.1056/NEJMoa1507247
- Flanagan ME, Blumenkopf TA, Brissette WH, Brown MF, Casavant JM, Shang-Poa C, et al. Discovery of CP-690,550: A Potent and Selective Janus Kinase (JAK) Inhibitor for the Treatment of Autoimmune Diseases and Organ Transplant Rejection. *J Med Chem* (2010) 53:8468–84. doi: 10.1021/jm1004286
- Gao W, McGarry T, Orr C, McCormick J, Veale DJ, Fearon U. Tofacitinib Regulates Synovial Inflammation in Psoriatic Arthritis, Inhibiting STAT Activation and Induction of Negative Feedback Inhibitors. *Ann Rheum Dis* (2016) 75:311–5. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-207201
- Migita K, Miyashita T, Izumi Y, Koga T, Komori A, Maeda Y, et al. Inhibitory Effects of the JAK Inhibitor CP690,550 on Human CD4(+) T Lymphocyte Cytokine Production. *BMC Immunol* (2011) 12:51. doi: 10.1186/1471-2172-12-51
- Adam S, Simon N, Steffen U, Andes FT, Scholtyssek C, Müller DIH, et al. JAK Inhibition Increases Bone Mass in Steady-State Conditions and Ameliorates Pathological Bone Loss by Stimulating Osteoblast Function. *Sci Transl Med* (2020) 12:5867. doi: 10.1126/scitranslmed.aay4447
- Gaber T, Brinkman ACK, Pienczikowski J, Diesing K, Damerou A, Pfeiffenberger M, et al. Impact of Janus Kinase Inhibition With Tofacitinib on Fundamental Processes of Bone Healing. *Int J Mol Sci* (2020) 21:865. doi: 10.3390/ijms21030865
- Hamar A, Szekanez Z, Pusztai A, Czókolyová M, Végh E, Pethő Z, et al. Effects of One-Year Tofacitinib Therapy on Bone Metabolism in Rheumatoid Arthritis. *Osteoporos Int* (2021) 32:1621–9. doi: 10.1007/s00198-021-05871-0
- Vidal B, Cascão R, Finnillä MAJ, Lopes IP, da Glória VG, Saarakkala S, et al. Effects of Tofacitinib in Early Arthritis-Induced Bone Loss in an Adjuvant-

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.881699/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Adipogenic differentiation of hBMSCs was confirmed (A) by using Q-PCR analysis of mRNA levels of adipogenic markers (PPAR γ , C/EBP α , PLIN 1) performed over a 14 days period of induction from day 0 (control hBMSCs) and Oil Red O staining. Osteogenic differentiation of hBMSCs was confirmed (B) by using Q-PCR analysis of mRNA levels of osteogenic markers (RUNX2, OC) performed over a 14 days period of induction from day 0 (control hBMSCs), ALP activity and Alizarin Red Staining at 21 days of differentiation. The data are representative of three independent experiments.

- Induced Arthritis Rat Model. *Rheumatol (Oxford)* (2018) 57:1461–71. doi: 10.1093/rheumatology/kex258
- Paccou J, Penel G, Chauveau C, Cortet B, Hardouin P. Marrow Adiposity and Bone: Review of Clinical Implications. *Bone* (2019) 118:8–15. doi: 10.1016/j.bone.2018.02.008
- Li J, Chen X, Lu L, Yu X. The Relationship Between Bone Marrow Adipose Tissue and Bone Metabolism in Postmenopausal Osteoporosis. *Cytokine Growth Factor Rev* (2020) 52:88–98. doi: 10.1016/j.cytogr.2020.02.003
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Ann Rheum Dis* (2010) 62(9):2569–81. doi: 10.1002/art.27584.
- Ytterberg SR, Bhatt DL, Mikuls TR, Koch GG, Fleischmann R, Rivas JL, et al. Cardiovascular and Cancer Risk With Tofacitinib in Rheumatoid Arthritis. *New Engl J Med* (2022) 386:316–26. doi: 10.1056/NEJMoa2109927
- Karampinos DC, Yu H, Shimakawa A, Link TM, Majumdar S. T $+$ -Corrected Fat Quantification Using Chemical Shift-Based Water/Fat Separation: Application to Skeletal Muscle. *Magn Reson Med* (2011) 66:1312–26. doi: 10.1002/mrm.22925.
- Baillet A, Gossec L, Carmona L, de Wit M, van Eijk-Hustings Y, Bertheussen H, et al. Points to Consider for Reporting, Screening for and Preventing Selected Comorbidities in Chronic Inflammatory Rheumatic Diseases in Daily Practice: A EULAR Initiative. *Ann Rheumatol Dis* (2016) 75:965–73. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209233
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* (1999) 284:143–7. doi: 10.1126/science.284.5411.143
- Owen M. Marrow Stromal Stem Cells. *J Cell Sci Suppl* (1988) 10:63–76. doi: 10.1242/jcs.1988.Supplement_10.5
- Hardouin P, Pansini V, Cortet B. Bone Marrow Fat. *Joint Bone Spine* (2014) 81:313–9. doi: 10.1016/j.jbspin.2014.02.013
- Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M. Adipocyte Tissue Volume in Bone Marrow is Increased With Aging and in Patients With Osteoporosis. *Biogerontology* (2001) 2:165–71. doi: 10.1023/a:1011513223894
- Duque G. Bone and Fat Connection in Aging Bone. *Curr Opin Rheumatol* (2008) 20:429–34. doi: 10.1097/BOR.0b013e3283025e9c
- Gimble JM, Zvonick S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. Playing With Bone and Fat. *J Cell Biochem* (2006) 98:251–66. doi: 10.1002/jcb.20777
- Li Y, Meng Y, Yu X. The Unique Metabolic Characteristics of Bone Marrow Adipose Tissue. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2019) 10:69. doi: 10.3389/fendo.2019.00069
- Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of Disease: Is Osteoporosis the Obesity of Bone? *Nat Clin Pract Rheumatol* (2006) 2:35–43. doi: 10.1038/ncprheum0070
- Zhang K, Guo W, Yang Y, Wu J. JAK2/STAT3 Pathway is Involved in the Early Stage of Adipogenesis Through Regulating C/EBP β Transcription. *J Cell Biochem* (2011) 112:488–97. doi: 10.1002/jcb.22936
- Deng J, Hua K, Lesser SS, Harp JB. Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 During Proliferative Phases of 3T3-L1

- Adipogenesis. *Endocrinology* (2000) 141:2370–6. doi: 10.1210/endo.141.7.7551
31. Ostrovskiy D, Rumpf T, Eib J, Lumbroso A, Slynko I, Klaeger S, et al. Tofacitinib and Analogs as Inhibitors of the Histone Kinase PRK1 (Pkn1). *Future Med Chem* (2016) 8:1537–51. doi: 10.4155/fmc-2016-0132
 32. Eberl HC, Werner T, Reinhard FB, Lehmann S, Thomson D, Chen P, et al. Chemical Proteomics Reveals Target Selectivity of Clinical Jak Inhibitors in Human Primary Cells. *Sci Rep* (2019) 9:14159. doi: 10.1038/s41598-019-50335-5
 33. Zhao B. TNF Bone Remodeling. *Curr Osteoporos Rep* (2017) 15:126–34. doi: 10.1007/s11914-017-0358-z
 34. Russell T, Rowe H, Bridgwood C, Cuthbert RJ, Watah A, Newton D, et al. Tofacitinib Blocks Enteseal Lymphocyte Activation and Modulates MSC Adipogenesis, But Does Not Directly Affect Chondro- and Osteogenesis. *Immuno* (2021) 1:545–57. doi: 10.3390/immuno1040038
 35. Yang J, Xie X. Tofacitinib Protects Intestinal Epithelial Cells Against Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation Injury by Inhibiting the JAK/STAT3 Signaling Pathway. *Exp Ther Med* (2021) 22:1108. doi: 10.3892/etm.2021.10542

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Letarouilly, Paccou, Badr, Chauveau, Broux and Clabaut. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Titre : Évaluation de l'effet du tofacitinib sur les tissus osseux et adipeux dans la polyarthrite rhumatoïde	
Mots clés : polyarthrite rhumatoïde, tofacitinib, Inhibiteur des janus kinases, densitométrie osseuse, tissus adipeux, adipocytes, adiposité composition corporelle	
<p>Résumé : L'inflammation systémique est le principal facteur responsable de l'ostéoporose secondaire et du surrisque cardiovasculaire chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR). Les inhibiteurs de la Janus kinase (JAKi), tels que le tofacitinib (Tofa), peuvent contrôler l'inflammation systémique et semblent avoir des effets bénéfiques sur le tissu osseux dans différents modèles précliniques. Cela pourrait être dû à des effets directs sur le microenvironnement osseux et ne pas reposer exclusivement sur le contrôle de l'inflammation systémique. Les adipocytes médullaires (Ad med) sont abondants dans le microenvironnement osseux mais l'effet des JAKi sur les Ad med reste méconnu tout en sachant qu'il existe une compétition entre les voies de différenciation des cellules stromales dérivées de la moelle osseuse humaine (hCSMs) vers les Ad med et les ostéoblastes (Ob) dans l'ostéoporose. Par ailleurs, les JAKi pourraient avoir également un effet sur l'adiposité viscérale, tissu associé au risque cardiovasculaire. Les objectifs de la première partie de la thèse étaient de déterminer si le Tofa influence les Ad med et les Ob dérivés des hCSMs et d'étudier les effets potentiels du Tofa sur la composition corporelle, l'adiposité médullaire et la densité minérale osseuse chez des patients atteints de PR. Les objectifs de la seconde partie de la thèse étaient de déterminer l'effet de la PR sur la composition corporelle, la densité minérale osseuse et l'adiposité médullaire. Pour déterminer l'effet du Tofa sur l'engagement cellulaire, des hCSMs ont été différenciées en Ad med ou Ob pendant 3 jours avec des concentrations de Tofa à 200, 400 ou 800 nM et du TNFα pour simuler l'inflammation systémique. Cette étude a également été menée en utilisant des Ad med différenciés. L'effet du Tofa a été déterminé par l'analyse de l'expression des gènes et des protéines et le suivi de la densité cellulaire.</p>	<p>En parallèle, dans une étude pilote portant sur 9 patients atteints de PR traités par Tofa 5 mg deux fois par jour (NCT04175886), l'adiposité médullaire a été mesurée par IRM au niveau de la colonne lombaire (PDFF, <i>proton density fat fraction</i>) initialement et après 6 mois de traitement par Tofa. L'étude RAFAT en cours (NCT05269069) est une étude cas-témoins avec des volontaires sains appariés pour le sexe, l'âge, l'indice de masse corporelle et le statut ménopausique à des patients PR. Dans des conditions non inflammatoires, l'expression génique de Runx2 et Dlx5 a diminué chez les Ob traités par Tofa ($p < 0,05$). L'expression génétique de PPARγ2, C/EBPα et Périlipine 1 était augmentée par rapport aux contrôles ($p < 0,05$) chez les Ad med traités par Tofa. Dans des conditions inflammatoires, Tofa n'a pas modifié les profils d'expression des Ob par rapport aux contrôles TNFα. En revanche, Tofa a limité l'effet négatif du TNFα sur la différenciation des Ad med ($p < 0,05$). Une augmentation de la densité des Ad med différenciées traitées par Tofa sous TNFα a été observée ($p < 0,001$). Ces résultats ont été consolidés par une augmentation du PDFF à 6 mois de traitement par Tofa chez les patients atteints de PR ($46,3 \pm 7,0$ % versus $53,2 \pm 9,2$ % $p < 0,01$). Il n'y avait pas de modification de la composition corporelle à 6 mois, notamment de l'adiposité viscérale chez les 9 patients atteints de PR sous Tofa. L'ensemble de ces résultats suggère un effet stimulant du Tofa sur l'engagement et la différenciation des Ad med, ce qui ne soutient pas un effet positif du Tofa sur le tissu osseux. L'étude RAFAT est en cours.</p>

Effect of tofacitinib on adipose and bone tissues in rheumatoid arthritis	
Keywords: rheumatoid arthritis, tofacitinib, janus kinases inhibitors, bone mineral density, adipose tissue, adipocytes, adiposity, body composition	
<p>Systemic inflammation is the main factor underlying secondary osteoporosis and cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis (RA). Janus kinase inhibitors (JAKi), such as tofacitinib (Tofa), can control systemic inflammation and may have beneficial effects on bone in various models. This might be due to direct effects on the bone microenvironment and not exclusively based on their anti-inflammatory function. Bone marrow adipocytes (BMAds) are abundant in the bone microenvironment. The effect of JAKi on BMAds is unknown, but evidence suggests that there is competition between human bone marrow-derived stromal cell (hBMSCs) differentiation routes towards BMAds and osteoblasts (Ob) in osteoporosis. JAKi could also have an impact on the visceral adiposity which is associated with the cardiovascular risk. The aims of the first part of the PhD were to determine whether Tofa influences BMAds, and Ob derived from hBMSCs and to investigate the potential effects of Tofa on body composition, on bone marrow adipose tissue (BMAT) and bone mineral density (BMD) in RA patients. The aims of the second part of the PhD were to determine the impact of RA on body composition, BMD and BMAT. To determine the effect of Tofa on cellular commitment, hBMSCs were differentiated to BMAds or Ob for 3 days together with Tofa at 200, 400, or 800 nM and TNFα. This study was also conducted using differentiated BMAds. The impact of Tofa was determined by gene and protein expression analysis and cell density monitoring.</p>	<p>In parallel, in a pilot study of 9 RA patients treated with Tofa 5 mg twice a day (NCT04175886), the proton density fat fraction (PDFF) was measured using MRI at the lumbar spine at baseline and at 6 months. The ongoing RAFAT study (NCT05269069) is a case-control study including healthy volunteers matched for sex, age, body mass index, and menopausal status with RA patients. In non-inflammatory conditions, the gene expression of Runx2 and Dlx5 decreased in Ob treated with Tofa ($p < 0.05$). The gene expression of PPARγ2, C/EBPα, and Perilipin 1 were increased compared to controls ($p < 0.05$) in BMAds treated with Tofa. Under inflammatory conditions, Tofa did not change the expression profiles of Ob compared to TNFα controls. In contrast, Tofa limited the negative effect of TNFα on BMAds differentiation ($p < 0.05$). An increase in the density of differentiated BMAds treated with Tofa under TNFα was noted ($p < 0.001$). These findings were consolidated by an increase in PDFF at 6 months of treatment with Tofa in RA patients ($46.3 \pm 7.0\%$ versus $53.2 \pm 9.2\%$ $p < 0.01$). Together, these results suggest a stimulatory effect of Tofa on BMAds commitment and differentiation, which does not support a positive effect of Tofa on bone. The RAFAT study is still ongoing.</p>