



HAL
open science

Reprogrammation cellulaire pour améliorer la régénération tissulaire altérée dans les pathologies du vieillissement

Enora Le Borgne

► **To cite this version:**

Enora Le Borgne. Reprogrammation cellulaire pour améliorer la régénération tissulaire altérée dans les pathologies du vieillissement. Gériatrie et gérontologie. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONT003 . tel-04033816

HAL Id: tel-04033816

<https://theses.hal.science/tel-04033816>

Submitted on 17 Mar 2023

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé

École doctorale : *Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2 - ED n°168)*

Unité de recherche: *Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy (IRMB - INSERM U1183)*

Reprogrammation cellulaire pour améliorer la régénération tissulaire altérée dans les pathologies du vieillissement

Présentée et soutenue publiquement par Enora LE BORGNE
Le 11 Mars 2022

Sous la direction du Dr Ollivier MILHAVET
et la codirection du Dr Jean-Marc LEMAITRE

Devant le jury composé de

Dr Frédérique MAGDINIER, Directrice de recherche Inserm, GMGF

Dr Anne BOULOUMIE, Directrice de recherche Inserm, I2MC

Dr Armelle YART, Chargée de recherche Inserm, RESTORE

Dr Anaïs BRIOT, Chargée de recherche Inserm, I2MC

Pr Simon GALAS, Professeur, Université de Montpellier, IBMM

Dr Ollivier MILHAVET, Chargé de recherche CNRS, IRMB

Dr Jean-Marc LEMAITRE, Directeur de recherche INSERM, IRMB

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Président

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury pour avoir accepté de relire mon manuscrit et d'assister à la soutenance de cette thèse. En particulier Frédérique Magdinier qui a accepté de se replonger pour la troisième fois dans ce projet qu'elle suit régulièrement depuis ses débuts. Merci à elle et à Anne Bouloumié qui ont bien voulu évaluer ce travail en qualité de rapporteur. Merci à Armelle Yart d'avoir répondu positivement à notre invitation. Je voudrais également remercier Simon Galas, qui me suit et suit ce projet depuis quelques années déjà, merci d'avoir été présent chaque année depuis le début de cette thèse (et même avant), notamment à travers mes comités de suivi aux côtés de Matthieu Lacroix et François Casas. Merci messieurs pour vos précieux conseils et vos encouragements, vous m'avez parfois poussée dans mes retranchements et je vous en suis reconnaissante aujourd'hui !

Je tiens également à remercier mon chef d'équipe et co-directeur de thèse, Jean-Marc Lemaitre. Tu m'as ouvert les portes de ton laboratoire pour mon stage de Master 2 et nous voilà aujourd'hui près de 4 ans plus tard. Tu m'as accordé ta confiance et m'as offert de nombreuses opportunités ; celles de me former, de collaborer avec des personnes exceptionnelles sur des projets captivants et de présenter les résultats de nos travaux lors de différents congrès.

Je n'en oublie évidemment pas mon autre co-directeur, Ollivier Milhavet. Tu as été présent à mes côtés au quotidien depuis mon arrivée au laboratoire. Ton oreille attentive, ton soutien et tes conseils ont été une aide précieuse, dans les bons comme dans les mauvais moments (dont j'ai peut-être parfois abusé ^^), ils m'ont permis de traverser au mieux cette longue épreuve. Je garderai bien sûr en mémoire notre escapade scientifique mais pas que, à Copenhague : le bistrot Oscar, les smørrebrød, notre dîner décontracté chez Aamanns, cette incroyable soirée aux jardins de Tivoli, sans oublier bien sûr le bar 7, notre chère Tatiana et ses fameux cocktails ! Je suis navrée de n'avoir pu t'offrir d'escapade rétrospective dans ta jeunesse sur la côte est, mais je n'ai pas encore perdu espoir de pouvoir me rattraper, bien que sans doute un peu plus à l'ouest.

Il est grand temps de remercier mes collègues, les irréductibles comme ceux qui nous ont déjà quittés. A commencer par toi, Quentin, le meilleur de tous les Quentins, récemment promu Dr Q. Comment te dire que l'aventure n'aurait pas été ce qu'elle a été sans toi... Tout a commencé par un petit bizutage, un lundi à 8h alors que je n'étais qu'une petite stagiaire de M2 innocente qui ne connaissait pas encore ta légendaire ponctualité ! Mais il n'aura pas fallu attendre longtemps pour que naisse une complicité précieuse entre nous, tant sur le plan professionnel qu'amical, qui nous a permis de traverser ensemble les bons comme les mauvais moments. Tu as été un binôme incroyable, j'ai beaucoup appris à tes côtés

et je ne t'en remercierai jamais assez, même si tu as indéniablement été un peu avare en crêpes ! Anaëlle, ton arrivée au labo a été un vrai renouveau pour moi et j'ai trouvé en toi une collègue et amie attentive. Enfin quelqu'un de matinal, enfin quelqu'un qui mange le midi ! Tu fais partie de ces personnes toujours souriantes et de bonne humeur, tellement agréable à vivre. Ce fut un plaisir de t'aider à prendre tes marques au labo, je ne me fais aucun souci pour toi, tu vas gérer ta thèse avec brio. Merci pour tous ces moments partagés, merci pour ton soutien et merci pour ton œil aguerrri à la chasse aux fautes d'orthographe. Je te lègue *tu-sais-qui*, fais-en bon usage ! Mélissa, ton caractère bien trempé donne souvent une première impression trompeuse, mais on a tout à y gagner à creuser un peu. Notre passion commune et dévorante pour la glace (et la nourriture de façon générale) nous a rapidement rapprochées ce à quoi sont venues s'ajouter les séances d'aquaponey puis d'aquapalme, mémorable ! Merci pour ton amitié et ton soutien pendant ces 4 années. Que ce soit dans le bureau d'en face ou entre les bâtiments, j'ai toujours apprécié nos pauses café et commérages (parfois scandaleusement interminables). J'en profite pour faire une grosse papouille au vilain mic, est-ce que sa tata préférée pourra le garder une dernière fois ? Nelly, on formait un sacré quatuor avec Quentin et Mélissa, je garderai le souvenir d'un incroyable drakar de Noël, d'une raclette d'été un peu lourde à digérer et de quelques parties de blanc-manger coco qui vous ont révélé mon côté obscur ^^.

Un grand merci à Paul pour ses conseils et pour tout le travail qu'il a accompli sur ce projet, je t'en suis reconnaissante. Merci également à Fabienne avec qui j'ai eu le plaisir de partager le bureau pendant quelques temps et dont certaines de nos discussions résonnent encore en moi. Roula, nous aurons commencé nos thèses en même temps, nos chemins se séparent ici mais tu y arriveras bientôt aussi, bon courage pour ces derniers mois. A mes collègues de la plateforme Ingestem avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger régulièrement pendant ma thèse : Romain, Mathis et Lydiane. Je n'oublie pas ma petite stagiaire, Emilie qui fut d'abord mon étudiante quand je me suis essayée à l'enseignement. Le travail que tu as accompli pendant ton stage, bien qu'il ait pu te sembler fastidieux, m'a vraiment été d'une aide précieuse et figure d'ailleurs dans ce manuscrit. Merci pour ton implication, ta bonne humeur et tes créations culinaires, tu as vite compris les mœurs de cette équipe. J'en profite aussi pour remercier les enseignantes de l'Université de Montpellier, mesdames Claudine Ménard, Anne-Sophie Gosselin-Grenet et Nelly Godefroy, qui m'ont accompagnée dans mes premiers pas vers l'enseignement supérieur. Merci également à tous les étudiants que j'ai pu encadrer, ce fut une expérience extraordinaire.

Je remercie également l'ensemble du personnel de l'IRMB qui a contribué, de près ou de loin, à l'avancée de ce travail. Merci à Daouda pour ces nombreuses heures passées au Seahorse, à Philippe pour son expertise de la RT-qPCR, à Christina que j'ai eu le plaisir d'épauler à ses débuts, à Karine, Danièle, Anne-Laure, Pauline, Chloé, Jean, Martine, Nicolas, Marie-Luce, Jean-Marc B. et à tous ceux et celles que je n'ai pas cités.

Je voudrais également remercier l'ensemble des membres de l'unité DMeM qui m'ont accueillie à bras ouverts et pour certains presque adoptée. Vous avez été comme un second labo et une seconde équipe pour moi et pour un temps j'étais bien plus dans vos couloirs qu'à mon propre bureau. Je m'adresse en particulier à toi Christelle, tu m'as accompagnée dès le début de ce projet, tu m'as formée, tu as passé de nombreuses heures à l'animalerie avec, mais aussi sans moi, quand le confinement s'est imposé et tu t'es investie sans compter. Merci infiniment pour ton aide précieuse, une bonne partie de ces résultats n'auraient pas été ce qu'ils sont sans toi. Merci aussi pour ton soutien et ton amitié au quotidien, ton bureau fut un véritable refuge. Il y a également un autre bureau dans lequel j'ai trouvé une oreille attentive et bienveillante, c'est le tien Laurence. Je te remercie pour toute l'aide technique que tu m'as apportée autour de ces centaines de lames, ce fut un véritable plaisir de me former et de travailler en tandem avec toi. J'ai beaucoup appris à tes côtés, scientifiquement et humainement. Pour ses conseils avisés et sa bonne humeur, merci bien sûr à François, qui s'est retrouvé recruté pour d'innombrables séances de prélèvements matinales, ce qui ne l'a jamais pour autant dissuadé de discuter gastronomie ! Merci à Béatrice qui a également accepté de partager une partie de son expérience et de son savoir.

Aux chimistes de l'ex bâtiment 17 et associés, Mathieu, Ryan, Céline, Julien, Lori, Manon, Seb, Fafa, Justine, Guillaume, et Caro. Avec vous je me suis aérée l'esprit, ça parlait souvent boulot mais ça parlait chimie pour changer. Merci pour ces beaux moments passés ensemble, en randonnée, en canoë, ou autour d'une glace mais le plus souvent quand même en terrasse autour d'un verre.

A mes maîtres à danser, Emilie et Christelle, et le gang des anciennes, Sarah, Dodo, Sophie et Katia, ce fut un véritable plaisir de venir me libérer sur les planches de l'académie avec vous, je ne pensais pas retrouver une si belle compagnie sur Montpellier. Je sais que mes grandes cannes et mon style majorette vont manquer à certaines et je regrette de devoir vous quitter sans clôturer cette belle aventure sur scène et en coulisses.

A Arthur et Mélanie, rejoints par leur petit Eden, on s'est rencontrés à Galderma et qui l'eût cru, nous nous sommes involontairement suivis à Montpellier. Le début d'une belle amitié qui s'est manifestée par de beaux festins en tout genre : retours de marché, raclettes (beaucoup de raclettes j'ai l'impression), de la bière et des wings night. Merci pour votre éternelle bonne humeur et joie de vivre !

A mes copines de l'école d'ingé, Evy, Audrey, Charlotte, Julia et Julie, on s'est suivies de près ou de loin depuis notre diplôme, j'avoue ne pas avoir été la plus disponible non plus, mais quelle idée d'avoir choisi le nord de la France aussi ! Je compte bien rattraper le temps perdu avant le prochain départ, à mon tour de vous rendre visite.

A ce groupe de copains un peu fous qui se connaissent pour certains depuis toujours et qui m'ont ouvert leur cercle sans hésiter, Théo, Dylan, Valentin, Cyril, Antoine, et Quentin. Vous serez toujours les bienvenus chez nous et vos +1 aussi bien entendu.

Et enfin, je voudrais remercier ma famille. A mes parents, Hugues et Annie, vous m'avez toujours soutenue quoiqu'il arrive et c'est grâce à vous et à vos sacrifices si j'en suis arrivée là aujourd'hui. Papa, je ne serai malheureusement jamais le genre de Docteur à même de reprendre le flambeau de ton cabinet mais j'espère que tu n'en es pas moins fier ! Maman, tu as dû faire face à de nombreuses épreuves ces dernières années, je ne peux qu'admirer et m'inspirer de la force et du courage avec lesquels tu te bats. A ma petite sœur et amie de toujours, Iléana alias Junior (je ne citerai pas tes autres surnoms rassure toi), notre complicité et notre folie m'ont beaucoup manqué, en particulier en cette fin d'année 2021 qui fut si particulière, mais je compte bien me rattraper très prochainement, c'est promis. A mon frère Amaury et à Lucie, malgré la proximité, nous n'avons pas eu l'occasion de nous voir si souvent mais c'était toujours un plaisir de partager ces week-ends en famille tous ensemble. Enfin et surtout, je ne t'ai pas oublié, tu occupes même une place de choix dans ces remerciements. Rostom, quelques lignes ne suffiront pas à te dire à quel point tu comptes et à te remercier pour tout ce tu m'as apporté au quotidien depuis ce fameux arrêt rocher. Tu m'as toujours écoutée, encouragée et soutenue quels que soient mes choix ou mes doutes, supportée aussi quand je m'écroulais au bout de 30 min devant des chefs d'œuvre pourtant ou quand je passais du rire nerveux aux larmes en une seconde. On aura survécu à 2 thèses, 3 confinements ensemble et un 4^e séparés à des milliers de kilomètres, ces épreuves n'auront fait que nous souder encore plus. Cette drôle de fin d'année aura au moins eu le mérite de me faire réaliser à quel point le simple fait d'être à tes côtés et nos petits bonheurs simples me comblent. L'étape montpelliéraine de notre aventure se termine, mais ce n'est que le début du reste de notre vie. Je ne te le dirai jamais assez : merci d'être toi, merci d'être toujours là, je t'aime.

Je voudrais finir par mes grands-parents maternels, papy et mamie mouchette, que la maladie et la vieillesse emportent un peu plus chaque jour mais qui continuent de se battre, je vous dédie ce travail.

RESUME

Le vieillissement est un processus complexe qui se caractérise par l'altération progressive de la physiologie cellulaire et tissulaire. Modulé par des facteurs génétiques et épigénétiques, il s'accompagne d'une modification du métabolisme cellulaire, d'une diminution de la résistance aux différents stress cellulaires et de la sénescence cellulaire. L'objectif de ce travail est d'utiliser la reprogrammation cellulaire comme stratégie visant à retarder les effets du vieillissement, en induisant un rajeunissement global ou en améliorant les capacités régénératrices de l'organisme.

L'expression de quatre facteurs de transcription : OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC (OSKM) permet l'induction de la reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes. Procéder à une reprogrammation dite transitoire, c'est-à-dire initier le processus sans atteindre l'état de pluripotence, a un effet immédiat qui efface en partie les marques caractéristiques du vieillissement des tissus et des cellules. Afin de déterminer comment une courte reprogrammation cellulaire transitoire réalisée précocement affecte les processus de vieillissement chez un animal entier, nous avons induit l'expression d'OSKM chez des souris progériques reprogrammables jeunes et avons révélé une augmentation de la longévité sur les âges tardifs et un effet protecteur sur l'intégrité des structures tissulaires et sur les pathologies liées à l'âge, associé à des modifications des signatures épigénétiques dans les tissus. Ces résultats sur les âges tardifs après une reprogrammation transitoire précoce suggèrent un effet mémoire, se maintenant tout au long de la vie. Afin d'expliquer ces effets à long terme, nous avons exploré l'impact d'une reprogrammation transitoire précoce sur le métabolisme. Nous avons pu mettre en évidence une modification globale de la composition corporelle des animaux, avec un ralentissement de la prise de masse grasse dans les âges jeunes et un maintien de cette même masse grasse dans les âges tardifs, associé à une modification globale de l'ultrastructure et de l'activité métabolique du tissu adipeux blanc. Cette transition métabolique semble aussi impacter le tissu musculaire selon une dynamique qui lui est propre.

L'identification des mécanismes sous-jacents nous permettra de définir de nouvelles stratégies pour prévenir le vieillissement et la sénescence, à l'origine de l'apparition des pathologies liées à l'âge.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
RESUME	6
TABLE DES MATIERES	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	13
LISTE DES ABREVIATIONS	16
1 INTRODUCTION GENERALE.....	20
1.1 Le vieillissement.....	20
1.1.1 Le vieillissement de la population : exemple de la population européenne.....	20
1.1.1.1 Vieillesse démographique	20
1.1.1.2 Mortalité et espérance de vie	20
1.1.1.3 Défis face au vieillissement de la population	21
1.1.2 Les pathologies associées à l'âge	22
1.1.3 Les marqueurs de la santé et du vieillissement.....	24
1.1.3.1 Les marqueurs de la santé	24
1.1.3.1.1 <i>La compartimentation spatiale</i>	<i>25</i>
1.1.3.1.2 <i>Le maintien de l'homéostasie</i>	<i>26</i>
1.1.3.1.3 <i>La réponse aux stress.....</i>	<i>28</i>
1.1.3.2 Les marqueurs du vieillissement.....	31
1.1.3.2.1 <i>Les marques primaires.....</i>	<i>32</i>
1.1.3.2.2 <i>Les marques antagonistes.....</i>	<i>36</i>
1.1.3.2.3 <i>Les marques intégratives.....</i>	<i>39</i>
1.1.3.2.4 <i>Marques additionnelles proposées</i>	<i>41</i>
1.2 Stratégies de lutte pour prévenir et/ou ralentir le vieillissement	43

1.2.1	Hormèse	44
1.2.2	Hormonothérapie	45
1.2.3	Activité physique	46
1.2.4	Interventions nutritionnelles	47
1.2.4.1	Régimes alimentaires	47
1.2.4.2	Jeûne intermittent ou prolongé.....	48
1.2.4.3	Restriction calorique.....	49
1.2.4.3.1	<i>Définition et bienfaits</i>	49
1.2.4.3.2	<i>Mécanismes moléculaires</i>	50
1.2.4.3.3	<i>Mimer les effets de la restriction calorique</i>	51
1.2.4.3.4	<i>Les limites de la restriction calorique</i>	52
1.2.5	Restauration des taux de métabolites clés	53
1.2.6	Stimulation de l'autophagie	54
1.2.7	Élimination des cellules sénescentes	55
1.2.8	Restauration de l'environnement systémique	56
1.2.8.1	La parabiose	56
1.2.8.2	Transfusions de dérivés sanguins	57
1.2.8.3	Identification de facteurs de jeunesse circulants	58
1.2.9	Restauration du microbiome intestinal	61
1.3	La reprogrammation comme stratégie de rajeunissement	63
1.3.1	Cellules souches et potentiel cellulaire	63
1.3.2	Méthodes de reprogrammation cellulaire	65
1.3.2.1	Reprogrammation cellulaire par transfert nucléaire	65
1.3.2.2	Transdifférenciation	66
1.3.2.3	Cellules souches pluripotentes induites iPSCs.....	66
1.3.2.4	Nouvelles méthodes de reprogrammation cellulaire	68
1.3.3	Modéliser grâce aux cellules souches pluripotentes	69
1.3.3.1	Organoïdes et tissus complexes.....	69

1.3.3.2	Modèles in vitro de pathologies associées à l'âge	70
1.3.3.3	Modèles pour le criblage pharmacologique.....	71
1.3.4	La reprogrammation cellulaire en médecine régénératrice	72
1.3.4.1	Utilisation et applications des cellules souches pluripotentes humaines	72
1.3.4.1.1	<i>Production de cellules souches pluripotentes de grade clinique</i>	<i>72</i>
1.3.4.1.2	<i>Thérapies de remplacement cellulaire et tissulaire</i>	<i>74</i>
1.3.4.1.3	<i>Production d'organes in vivo</i>	<i>75</i>
1.3.4.2	Reprogrammer des cellules âgées et/ou sénescents.....	76
1.3.4.3	Reprogrammation complète in vivo	78
1.3.5	Reprogrammation et métabolisme cellulaire	79
1.3.5.1	Transition progressive vers un métabolisme glycolytique	79
1.3.5.2	Remodelage mitochondrial	80
1.3.5.2.1	<i>Changements morphologiques et numériques des mitochondries</i>	<i>80</i>
1.3.5.2.2	<i>Changement de composition du compartiment mitochondrial.....</i>	<i>81</i>
1.3.5.2.3	<i>Régulation des fonctions mitochondriales</i>	<i>82</i>
1.3.5.3	Activation des enzymes glycolytiques	82
1.3.6	Reprogrammation partielle et rajeunissement <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	84
1.4	Conclusion de l'introduction générale	88
2	DEMARCHE EXPERIMENTALE ET HYPOTHESES DE TRAVAIL	89
2.1	Nos modèles expérimentaux	91
2.1.1	Le modèle progérique reprogrammable.....	91
2.1.1.1	La lignée reprogrammable : R26 ^{rTA} ; Col1a1 ^{4F2A}	91
2.1.1.2	La lignée progérique : Lmna ^{C609G}	93
2.1.1.2.1	<i>Le syndrome d'Hutchinson-Gilford Progéria.....</i>	<i>93</i>
2.1.1.2.2	<i>Description du phénotype chez la souris de laboratoire</i>	<i>95</i>
2.1.2	Mise au point et validation des protocoles d'induction chronique	97

2.2	Impact de la reprogrammation transitoire sur le vieillissement	99
2.3	Profilage métabolique suite à une reprogrammation transitoire unique précoce	100
3	RESULTATS	102
3.1	Une reprogrammation transitoire unique précoce améliore l'état de santé et augmente la longévité des âges tardifs.....	102
3.1.1	Introduction.....	102
3.1.2	Prépublication.....	102
3.1.3	Impact d'une reprogrammation transitoire précoce sur le vieillissement	124
3.2	Impact de la reprogrammation transitoire sur le métabolisme <i>in vivo</i>	128
3.2.1	Validation des niveaux d'expression des facteurs de reprogrammation	128
3.2.2	Étude détaillée de la composition corporelle	129
3.2.3	Étude des paramètres de l'homéostasie du glucose	135
3.2.4	Étude de la formulation sanguine et du profil inflammatoire circulant.....	142
3.2.5	Étude du métabolisme respiratoire <i>in vivo</i>	146
3.2.6	Étude du tissu adipeux brun (BAT)	151
3.2.7	Étude du tissu adipeux blanc (WAT)	152
3.2.8	Étude du tissu musculaire strié squelettique	161
4	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	169
4.1	Reprogrammation transitoire précoce et transition métabolique	169
4.4	Reprogrammation transitoire précoce et cellules souches	171
4.5	Reprogrammation transitoire précoce et senescence	173
4.6	Caractéristiques phénotypiques inexplorées	174
4.6.1	Reprogrammation et vieillissement du système nerveux central	174
4.6.2	Reprogrammation et vieillissement du système reproductif	175

4.7	Une reprogrammation transitoire unique mais tardive	175
4.8	Les limites de notre modèle murin.....	176
5	CONCLUSION GENERALE	178
6	MATERIELS ET METHODES	181
6.1	Modèles animaux.....	181
6.1.1	Conception, élevage et génotypage des modèles animaux.....	181
6.1.1.1	La lignée PROGERIA, phénotype de vieillissement accéléré.....	182
6.1.1.2	La lignée 4F rtTA, inductible pour les facteurs de reprogrammation.....	182
6.1.1.3	La lignée Progeria 4F rtTA	182
6.1.2	Induction de la reprogrammation transitoire <i>in vivo</i>	183
6.1.3	Etude du profil métabolique <i>in vivo</i>	183
6.1.3.1	Composition corporelle	183
6.1.3.2	Mesure de la prise alimentaire.....	184
6.1.3.3	Homéostasie du glucose	184
6.1.3.3.1	Glycémie post-prandiale	184
6.1.3.3.2	Test de résistance à l'insuline.....	184
6.1.3.3.3	Test de tolérance au glucose	184
6.1.3.4	Tests fonctionnels	185
6.1.3.4.1	Griptest et force d'agrippement.....	185
6.1.3.4.2	Rotarod et coordination.....	185
6.1.3.5	Analyse du métabolisme respiratoire : cages métaboliques.....	186
6.1.3.6	Suivi de la température corporelle interne.....	186
6.1.4	Etude du profil métabolique sur tissus.....	187
6.1.4.1	Euthanasies et prélèvements.....	187
6.1.4.2	Histologie.....	187
6.1.4.2.1	Histologie en paraffine.....	187

6.1.4.2.2	<i>Histologie en cryotomie</i>	188
6.1.4.2.3	<i>Analyses d'images</i>	190
6.1.4.3	Extractions tissulaires.....	191
6.1.4.4	Analyses transcriptomiques.....	191
6.1.4.4.1	<i>RT-qPCR</i>	191
6.1.4.4.2	<i>Dynamic Array IFC – Biomark™</i>	192
6.1.4.5	Quantification de l'ADN mitochondrial.....	195
6.1.4.6	Analyse du méthylome.....	195
6.1.4.7	Analyses biochimiques.....	196
6.1.4.7.1	<i>Numération de la formule sanguine</i>	196
6.1.4.7.2	<i>Dosage des lipides plasmatiques</i>	196
6.1.4.7.3	<i>Dosages protéiques des cytokines plasmatiques</i>	196
6.1.4.8	Analyses statistiques.....	197
6.1.4.9	Illustrations.....	197
7	BIBLIOGRAPHIE	198
8	ANNEXES	229

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 Données statistiques européennes d'espérance de vie en bonne santé.....	22
Figure 2 Marqueurs de la santé.....	24
Figure 3 Marqueurs du vieillissement à l'origine des pathologies liées à l'âge (Alle et al., 2021a)	31
Figure 4 Voies de signalisation associées à la sensibilité aux nutriments	37
Figure 5 Caractéristiques phénotypiques des cellules sénescentes	39
Figure 6 Principales stratégies pour prévenir ou ralentir le vieillissement.....	43
Figure 7 Restriction calorique et voie de sensibilité aux nutriments	50
Figure 8 Représentation du développement embryonnaire à travers le paysage épigénétique selon Waddington	64
Figure 9 Principe de la reprogrammation par transfert nucléaire.....	65
Figure 10 Applications de la reprogrammation et des cellules souches pluripotentes humaines (adapté de (Alle et al., 2021a)).....	72
Figure 11 Représentation des stratégies de reprogrammation quatre et six facteurs dans le paysage épigénétique.....	77
Figure 12 Schématisation de la transition métabolique au cours de la reprogrammation.....	84
Figure 13 Schéma de la construction génique rtTA – 4F2A et son mode d'induction à la doxycycline	92
Figure 14 Mutation génétique conduisant à la production de progérine dans le cadre du HGPS	94
Figure 15 Protocoles chroniques de reprogrammation transitoire in vivo et impact sur la longévité	98
Figure 16 Chronogramme de l'étude du profil métabolique in vivo après reprogrammation transitoire précoce.....	101
Figure 17 Courbe de survie associée au protocole d'induction transitoire précoce sur animaux sauvages	124
Figure 18 Hypothèses pour expliquer les effets à long terme d'une reprogrammation transitoire précoce.....	126
Figure 19 Niveaux d'expression relatifs des facteurs de reprogrammation dans différents organes	129
Figure 20 Composition corporelle détaillée.....	131
Figure 21 Suivi de la composition corporelle d'animaux progériques non reprogrammables traités à la doxycycline	132
Figure 22 Consommation alimentaire journalière	133
Figure 23 Masse relative des organes aux prélèvements à 2,5 mois, 6 mois et 9 mois	134
Figure 24 Suivi de la glycémie après reprogrammation transitoire précoce.....	136

Figure 25 Test de tolérance à l'insuline	137
Figure 26 Dosage biochimique des niveaux protéiques d'insuline plasmatique.	138
Figure 27 Test de tolérance au glucose	139
Figure 28 Histologie du pancréas à 9 mois	141
Figure 29 Évolution de la numération de la formule sanguine entre 2,5 mois et 6 mois	143
Figure 30 Numération de formule sanguine (NFS) détaillée à 2,5 mois.....	144
Figure 31 Profil inflammatoire circulant après reprogrammation transitoire précoce.....	146
Figure 32 Métabolisme respiratoire in vivo des femelles	148
Figure 33 Suivi de la température corporelle	149
Figure 34 Métabolisme respiratoire in vivo des mâles.....	150
Figure 35 Histologie du tissu adipeux brun (BAT).....	151
Figure 36 Histologie du tissu adipeux blanc (WAT)	153
Figure 37 Dosage des lipides plasmatiques	154
Figure 38 Profil transcriptomique du tissu adipeux blanc	155
Figure 39 Niveaux d'expression relatifs de gènes associés à la sénescence dans le tissu adipeux blanc (WAT)	156
Figure 40 Niveaux d'expression de gènes associés au métabolisme cellulaire dans le WAT des femelles	157
Figure 41 Quantification du contenu mitochondrial dans le tissu adipeux blanc	158
Figure 42 Niveaux d'expression de gènes associés à l'autophagie dans le WAT des femelles	159
Figure 43 Niveaux d'expression de gènes associés à la réponse au stress oxydant dans le WAT des femelles.....	160
Figure 44 Profil sécrétoire du tissu adipeux blanc des femelles	161
Figure 45 Histologie des niveaux de fibrose à 9 mois dans le tissu musculaire strié squelettique	162
Figure 46 Profil transcriptomique du tissu musculaire strié squelettique	163
Figure 47 Niveaux d'expression de gènes associés au métabolisme cellulaire dans le muscle des femelles.....	164
Figure 48 Niveaux d'expression de gènes associés au métabolisme cellulaire dans le muscle des mâles	165
Figure 49 Niveaux d'expression de gènes associés à l'autophagie dans le muscle.....	166
Figure 50 Niveaux d'expression de gènes associés à la réponse au stress oxydant dans le muscle ..	167
Figure 51 Niveaux d'expression d'un marqueur des cellules souches musculaires	168
Figure 52 Résumé graphique : impact d'une reprogrammation transitoire précoce sur le vieillissement	178

Figure 53 Résumé graphique : reprogrammation transitoire précoce et métabolisme des tissus adipeux et musculaire.....	179
Figure 54 Griptest vertical.....	185
Figure 55 Illustration des cages à métabolisme (CLAMS, Columbus Instruments).....	186
Tableau 1 Récapitulatif des diverses horloges épigénétiques proposées et de leurs paramétrages	35
Tableau 2 Récapitulatif des facteurs circulants identifiés aux propriétés rajeunissantes.....	60
Tableau 3 Séquences pour le génotypage des modèles animaux par PCR TaqMan.....	181
Tableau 4 Protocole coloration Hématoxyline Eosine.....	189
Tableau 5 Protocole coloration Rouge Sirius.....	189
Tableau 6 Protocole immunomarquage Laminine-Pax7-Hoechst.....	190
Tableau 7 Programme d'amplification de nos qPCR	192
Tableau 8 Liste des séquences des primers pour la qPCR.....	193
Tableau 9 Séquences des primers pour l'analyse du ratio ADNmt/ADNn.....	195
Tableau 10 Paramètres détaillés de la numération de la formule sanguine (NFS)	196
Tableau 11 Liste détaillée des 31 cytokines plasmatiques dosées	197

LISTE DES ABREVIATIONS

2He = animaux non progériques reprogrammables
3He = animaux progériques reprogrammables

-A-

α SMA = alpha-smooth muscle actin
AAV2 = virus adéno-associé
Acétyl-CoA = acétyl-coenzyme A
ADP = adénosine diphosphate
ADN = acide désoxyribonucléique
ADNg = ADN génomique
ADNmt = ADN mitochondrial
ADNn = ADN nucléaire
AKT = protéine kinase B
AMP = adénosine monophosphate
AMPK = AMP-activated protein kinase
AN = acide nicotinique
Antp = antennapedia
AP-1 = protéine activatrice 1
ARN = acide ribonucléique
ARNcirc = ARN circulant
ARNt = ARN de transfert
ATF4 = activating transcription factor 4
ATF5 = activating transcription factor 5
ATF6 = activating transcription factor 6
ATP = adénosine triphosphate
ATG3 = autophagy related 3
ATG5 = autophagy related 5
ATG6 = autophagy related 6
ATG7 = autophagy related 7
ATG8 = autophagy related 8
AVC = accident vasculaire cérébral

-B-

BAT = brown adipose tissue
BCA = Bicinchoninic acid assay
BCL-2 = B-cell lymphoma 2
BCL-XL = B-cell lymphoma-extra large
BHB = hydroxybutyrate β
BMAL1 = protéine 1 de type translocateur nucléaire du récepteur des hydrocarbures aryles
BRM = modificateurs de la réponse biologique
BubR1 = budding uninhibited by benzimidazole-related 1

-C-

Cas9 = CRISPR associated protein 9
cEBP- α = CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha
C/EBP β = CCAAT/enhancer-binding protein β
c-MYC = avian myelocytomatosis viral oncogene cellular homolog
CCL2 = chemokine ligand 2
CCL11 = chemokine ligand 11
CD36 = fatty acid translocase
CD47 = cluster of differentiation 47
CDK1 = cyclin dependent kinase 1
CDKN2A = cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CLOCK = circadian locomotor output cycles kaput
CpG = 5'-Cytosine-phosphate-Guanidine-3'
CPT2 = carnitine palmitoyltransferase 2
CR = restriction calorique
CRISPR = clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CXCL1 = C-X-C motif chemokine ligand 1
CXCL5 = C-X-C motif chemokine ligand 5
CytC ox = cytochrome c oxidase

-D-

daf-2 = insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor in the worm *Caenorhabditis elegans*
DALY(s) = disability-adjusted life years
DHEA = déhydroépiandrostéone
DMeM = UMR dynamique musculaire et métabolisme
DMLA = dégénérescence maculaire liée à l'âge
DNMT = méthyltransférases d'ADN
DRP1 = dynamin-related protein 1

-E-

E2F = facteur de transcription E2
EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid
EMT = transition épithélio-mésenchymateuse
EPSCs = cellules souches cutanées
ERR = récepteurs nucléaires liés aux œstrogènes
ESC = cellules souches embryonnaires
ESCRT = endosomal sorting complex required for transport

-F-

FACS = fluorescence activated cell sorting
 FADH = flavin adenine dinucleotide
 FOX = forkhead box transcription factors
 FOXO = class O of forkhead box transcription factors
 FOXO1 = class O of forkhead box transcription factors, member 1
 FOXO3 = class O of forkhead box transcription factors, member 3

-G-

γ -H2AX = gamma histone 2A, membre X
 G-CSF = granulocyte colony-stimulating factor
 GDF8 = growth differentiation factor 8
 GDF11 = growth differentiation factor 11
 GHRH = growth hormone-releasing hormone
 GM-CSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
 GMP = good manufacturing practice
 GO = Gene Ontology
 GPX2 = glutathione peroxidase 2
 GSCs = cellules souches germinales
 GSK3 = glycogen synthase kinase 3

-H-

H2AX = histone 2A family member X
 H3 = histone H3
 H3K9me3 = trimethylation of lysine 9 on histone H3 protein subunit
 H4 = histone H4
 H4K20me3 = monomethylation of lysine 20 on histone H4 protein subunit
 HDAC = déacétylases d'histones
 HDAC6 = histone deacetylase 6
 HDL = high-density lipoproteins
 HDM = histones déméthylases
 HES = Hématoxyline, Eosine, Safran
 hESCs = human embryonic stem cells
 HGPS = Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome
 HIF1 α = hypoxia-inducible factor
 HLA = antigène leucocytaire humain
 HMG = high mobility group
 HMT = histones méthyltransférases
 hPSCs = human pluripotent stem cells
 HSCs = hematopoietic stem cells
 HSP = heat shock proteins

-I-

IFCs = circuits fluidiques intégrés
 IFNA = interferon alpha
 IFN γ = interferon gamma
 IGF-1 = insulin-like growth factor 1
 IGMM = institut de génétique moléculaire de Montpellier
 IIS = insulin and IGF-1 signaling
 IL = interleukine
 IL-1 = interleukine 1
 IL-1 α = interleukine 1 alpha
 IL-1 β = interleukine 1 beta
 IL-2 = interleukine 2
 IL-3 = interleukine 3
 IL-4 = interleukine 4
 IL-5 = interleukine 5
 IL-6 = interleukine 6
 IL-7 = interleukine 7
 IL-8 = interleukine 8
 IL-9 = interleukine 9
 IL-10 = interleukine 10
 IL-12p40 = interleukine 12 sous-unité beta
 IL-12p70 = interleukine 12
 IL-13 = interleukine 13
 IL-15 = interleukine 15
 IL-17A = interleukine 17
 INK-ATTAC = INK-linked apoptosis through targeted activation of caspase
 INM = Institut des Neurosciences de Montpellier
 iNOS2 = inducible nitric oxide synthase 2
 INRAE = institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
 IP-10 = interferon gamma-induced protein 10
 iPSCs = induced pluripotent stem cells
 IRE1 = inositol-requiring enzyme 1
 IRM = imagerie par résonance magnétique
 ISCs = cellules souches intestinales
 ITT = insulin tolerance test

-J-**-K-**

KC = keratinocytes-derived chemokine
 KEAP1 = Kelch-like ECH-associated protein 1
 KLF4 = Kruppel like factor 4

-L-

LADs = lamina-associated domains
LC3 = microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LDL = low-density lipoproteins
LIF = leukemia inhibitory factor
LIN28 = Lin-28 Homolog A
LIX = CXCL5
LMNA = lamin A/C gene

-M-

M-CSF = macrophage colony-stimulating factor
MAPK = mitogen-activated protein kinase
mCAD = medium-chain acyl-CoA dehydrogenase
MCP-1 = monocyte chemoattractant protein 1
MCP3 = monocyte chemotactic protein-3
MEFs = fibroblastes embryonnaires murins
MET = transition mésenchymo-épithéliale
MIG = monokine induced by interferon-gamma
MIP-1 α = macrophage inflammatory protein 1 alpha
MIP-1 β = macrophage inflammatory protein 1 beta
MIP-2 = macrophage inflammatory protein 2
MMP-1 = matrix metallo peptidase 1
MMP-3 = matrix metallo peptidase 3
MMP-10 = matrix metallo peptidase 10
MIP1A = macrophage inflammatory protein-1 alpha
MRI = Montpellier Ressource Imagerie
mTOR = mammalian target of rapamycin
mTORC1 = mammalian target of rapamycin complex 1
MYOD1 = myogenic differentiation 1

-N-

NAD = nicotinamide adenine dinucleotide
NAD⁺ = oxidized form of NAD
NADH = reduced form of NAD
NAM = nicotinamide adenine mononucleotide
NAMPT = nicotinamide phosphoribosyltransferase
NANOG = NANOG homeobox protein
NEFA = non esterified fatty acid
NF- κ B = facteurs nucléaires kappa B
NFS = Numération de formule sanguine
NMN = nicotinamide mononucleotide
NR = N-ribosylnicotinamide
NRF1 = nuclear respiratory factor 1

NRF2 = nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2

NSCs = neural stem cells

-O-

OCT (gel) = optimal cutting temperature compound
OCT4 = octamer-binding transcription factor 4
OGTT = oral glucose tolerance test
OIS = oncogene-induced senescence
OK = OCT4, SOX2
OSKM = OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC
OSKMNL = OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG, LIN28
OSM = OCT4, SOX2, c-MYC
OSNL = OCT4, SOX2, NANOG, LIN28

-P-

p21^{Cip1} = cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p38-MAPK = p38 mitogen-activated protein kinase
p53 = tumor protein 53
PAI-1 = plasminogen activator inhibitor 1
PAI-2 = plasminogen activator inhibitor 2
PARP = poly ADP-ribose polymerase
PARP1 = poly ADP-ribose polymerase 1
PAX3 = paired box protein
PAX7 = paired box 7
PCEA = Plateau Central d'Élevage et d'Archivage
PCR = polymerase chain reaction
PDH = pyruvate déshydrogénase
PDHK1 = pyruvate déshydrogénase kinase 1
PDX1 = pancreatic and duodenal homeobox 1
PK = pyruvate kinase
PEP = phosphoénolpyruvate
PERK = protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
PGC1 α = peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K = phosphoinositide 3-kinase
PKA = protéine kinase A
PLT = potentialisation à long terme
POU = Pit, Oct, Unc
PSCs = pluripotent stem cells

-Q-

-R-

RAM = réseau des animaleries de Montpellier
RANKL = receptor activator of NF- κ B ligand
RANTES = regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RAS = rat sarcoma virus
RER = ratio d'échanges respiratoires
RHEM = Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier
RNAseq = séquençage de l'ARN
ROS = espèces réactives de l'oxygène
RT-qPCR = reverse transcriptase quantitative PCR
rtTA = reverse tetracycline-controlled transactivator

-S-

SA- β -gal = senescence associated beta galactosidase
SAHA = acide subéryloylanilide hydroxamique
SAHF = foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence
SALL1 = spalt like transcription factor 1
SASP = phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SDHA = succinate dehydrogenase
SIPS = stress-induced premature senescence
SIRT1 = silent mating type information regulator two homolog 1 ou sirtuine 1
SIRT6 = sirtuin 6
SOD1 = superoxide dismutase 1
SOD2 = superoxide dismutase 2
SOPF = Specific and Opportunistic Pathogen Free
SOX2 = SRY-box transcription factor 2
SPARC = secreted protein acidic and rich in cysteine
SPARCL1 = SPARC-like protein 1
SSEA-1 = stage-specific embryonic antigen 1
SSEA-3 = stage-specific embryonic antigen 3
SSEA-4 = stage-specific embryonic antigen 4
STAC = sirtuin-activating compounds

-T-

TCF3 = transcription factor 3
TCL1 = T-cell leukemia/lymphoma 1
TET = ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase
tet = tétracycline
Tfam = transcription factor a mitochondrial
TGF- β = transforming growth factor beta
THBS4 = thrombospondin 4
TIMP2 = tissue inhibitor of metalloproteinases 2
TNF = tumor necrosis factor
TNF α = tumor necrosis factor alpha
TOMM20 = translocase of outer mitochondrial membrane 20
TP53 = p53 = tumor protein 53
Trp = tryptophane
TSA = trichostatine A

-U-

UCP1 = uncoupling Protein 1
UVs = ultraviolets

-V-

VEGF = vascular endothelial growth factor
VEGF-A = vascular endothelial growth factor A
VO2 max = consommation maximale d'oxygène
VPA = acide valproïque

-W-

WAT = white adipose tissue
WHI = Women's Health Initiative
WHO = World Health Organization
Wnt = wingless-related integration site

-X-Y-

-Z-

Zmpste24 = Zinc Metallopeptidase STE24

1 INTRODUCTION GENERALE

1.1 LE VIEILLISSEMENT

1.1.1 Le vieillissement de la population : exemple de la population européenne

1.1.1.1 *Vieillissement démographique*

Le vieillissement des populations est un phénomène mondial installé en Europe depuis bien longtemps. La population européenne est en effet une des plus âgées de la planète avec en 2020, plus de 20% de la population ayant 65 ans ou plus, contre 13% en 1990. Cette proportion tend même à dépasser celle des enfants de moins de 5 ans. Ce phénomène est en constante évolution, et d'ici à 2050, la part des 65 ans et plus devrait atteindre 29,5% en Europe selon Eurostat. Cette population âgée va elle-même progressivement vieillir au cours des prochaines décennies avec une proportion des 80 ans et plus multipliée par 2,5 d'ici à 2100.

Deux phénomènes expliquent cette évolution de la pyramide démographique européenne : un affaiblissement des taux de fécondité associé à un allongement de l'espérance de vie. Les taux de fécondité en Europe ont atteint leur record dans les années 1960-1970 avec près de 7 millions de naissances annuelles contre environ 4,5 millions pour la décennie 2010-2020. Cette diminution du nombre de naissances entraîne un vieillissement dit « par la base » de la pyramide démographique qui se rétrécit, traduisant une plus faible proportion de jeunes dans la population totale. Ces taux de natalité record après la seconde guerre mondiale ont créé la génération des « baby-boomers » qui aujourd'hui, ayant progressé le long de la pyramide des âges, participe à l'augmentation relative de la proportion des 65 ans et plus. L'allongement de l'espérance de vie quant à elle entraîne par opposition un vieillissement dit « par le sommet ».

1.1.1.2 *Mortalité et espérance de vie*

L'allongement de l'espérance de vie durant ces dernières décennies est étroitement lié à l'évolution des causes de mortalité. En effet, le taux de mortalité infantile, c'est-à-dire la proportion d'enfants morts avant leur un an par rapport au nombre total de naissances vivantes, a fortement régressé au cours du XX^e siècle, impactant ainsi positivement l'espérance de vie à la naissance. Depuis une dizaine d'années, le taux de mortalité infantile s'est stabilisé autour de 3,5‰ dans l'Union Européenne contre 150‰ dans les années 1900. Le recul de cette mortalité infantile dans nos sociétés modernes peut être associé au

développement socioéconomique ayant permis entre autres, de réduire les famines et donc les cas de malnutrition, ainsi que l'amélioration de l'offre de soins et de son accessibilité permettant notamment le recul des infections mortelles grâce à l'accès à la vaccination. À ce jour, la majorité des décès infantiles sont des cas de mortalité néonatale, c'est-à-dire survenant dans les 27 jours suivant la naissance. Ils seraient principalement dus à la prématurité des nouveau-nés, aux malformations fœtales et/ou aux complications survenues lors de l'accouchement.

Ceci a contribué à établir des records d'espérance de vie à la naissance. Au début du XX^e siècle, l'espérance de vie à la naissance avait peu progressé depuis le siècle précédent et était estimée autour d'une quarantaine d'années. Elle entame alors une augmentation à raison d'environ cinq ans tous les dix ans, hormis les incidents démographiques dus notamment aux 1^{ère} et 2^{nde} guerres mondiales ainsi qu'à l'épidémie de grippe espagnole (Gaimard, 2015). Dans les années 1960, l'espérance de vie à la naissance dépasse le seuil des 70 ans et sa progression ralentit à raison de 1,7 an gagné tous les 10 ans. Aujourd'hui en 2020 en Europe, l'espérance de vie est estimée à 80 ans en moyenne, allant de 77 ans chez les hommes à près de 83 ans chez les femmes.

Enfin, le recul de la mortalité se traduit par une évolution des causes de cette mortalité. Les grandes avancées médicales du XX^e siècle ont permis la régression voire l'éradication de nombreuses pathologies, notamment les maladies infectieuses, alors principales causes de décès. De nos jours, ce sont les maladies de l'appareil circulatoire et les cancers qui sont responsables de la majorité des décès en Europe, avec des taux d'incidence légèrement supérieurs chez les hommes par rapport aux femmes.

1.1.1.3 Défis face au vieillissement de la population

À raison d'environ deux mois d'espérance de vie gagnés par an, le vieillissement global de la population européenne et plus largement mondiale, pose de nouveaux problèmes sociétaux principalement liés à la prise en charge des personnes âgées. Bien que l'allongement de l'espérance de vie puisse être perçu comme une opportunité de temps supplémentaire pour changer de carrière ou de s'adonner à de nouvelles passions, il ne l'est réellement qu'à une condition : vieillir en bonne santé. En effet, l'avancée en âge s'accompagne généralement d'une perte progressive d'autonomie qu'elle soit associée à une pathologie ou non. Cette dépendance croissante de nos aînés a un coût aussi bien financier qu'humain et induit une pression grandissante sur la part active de la population et sur les systèmes sociaux.

Les modifications démographiques majeures auxquelles doivent faire face nos sociétés actuelles permettent de définir une nouvelle donnée démographique importante : l'espérance de vie en bonne santé (Figure 1). Cette notion prend principalement en compte la dimension fonctionnelle de la santé et peut donc aussi se traduire par une espérance de vie sans incapacités, c'est-à-dire en l'absence de

limitations dans les activités usuelles et élémentaires. Bien qu'à la naissance l'espérance de vie soit estimée autour de 80 ans, un peu plus chez les femmes et un peu moins chez les hommes, il ressort des statistiques européennes que seulement les trois quarts représentent notre espérance de vie en bonne santé. Chez les plus de 65 ans, pour qui l'espérance de vie est estimée à une vingtaine d'années supplémentaires, seulement la moitié se déroulerait sans incapacités ni limitations majeures.

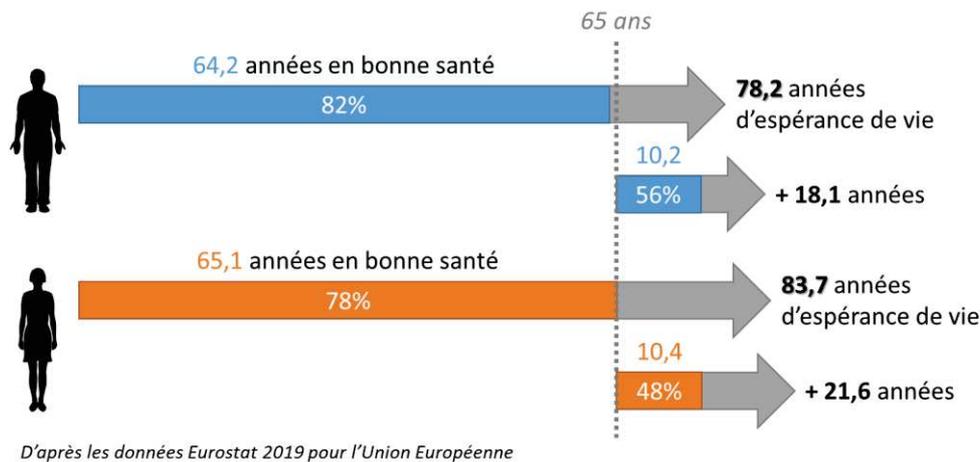


Figure 1 | Données statistiques européennes d'espérance de vie en bonne santé

Cette bascule d'un vieillissement dit physiologique vers un vieillissement dit pathologique s'accompagnant de l'apparition d'une ou plusieurs pathologies liées à l'âge et d'une perte d'autonomie, alimente actuellement un grand débat sociétal autour de la prise en charge médicale de nos anciens et l'accompagnement vers la fin de vie.

1.1.2 Les pathologies associées à l'âge

L'allongement de l'espérance de vie accroît les dysfonctionnements liés à l'âge qui peuvent affecter la totalité de nos organes. Notre organisme perd progressivement son intégrité physiologique et devient plus vulnérable, augmentant ainsi la fréquence de pathologies. Chez les plus de 65 ans, quatre personnes sur cinq présentent au moins une pathologie chronique.

Parmi ces pathologies majeures figurent le cancer, le plus souvent celui du poumon, du sein, de la prostate et le cancer colorectal, et les troubles cardiovasculaires, notamment les cardiopathies ischémiques chroniques, l'insuffisance cardiaque congestive et l'arythmie. Ces deux dernières maladies cardiaques sont aujourd'hui les deux principales causes de décès (DeSantis et al., 2019; Pison, 2019). Les maladies liées à l'âge qui affectent le système squelettique sont également fréquentes, notamment l'arthrose et l'ostéoporose (Boskey and Imbert, 2017). Une autre maladie qui augmente fortement avec

l'âge est la dégénérescence musculaire aussi appelée sarcopénie (Gustafsson and Ulfhake, 2021). Les troubles métaboliques tels que le diabète et la stéatose hépatique non alcoolique deviennent également plus fréquents avec l'âge (Hazlehurst et al., 2016). La fibrose des organes et des tissus, un processus pathologique caractérisé par des lésions inflammatoires et une production excessive de tissu conjonctif fibreux (Birbrair et al., 2014), augmente également au cours du vieillissement et constitue l'une des principales causes de la détérioration des organes humains liée à l'âge, notamment les poumons (Espindola et al., 2018), les reins (Nastase et al., 2018), le foie (Lemmer et al., 2018) et le cœur (Li et al., 2018). Les organes lymphoïdes, tels que la rate, subissent également une perte d'intégrité structurelle chez les personnes âgées. La détérioration globale du système immunitaire augmente la susceptibilité aux maladies infectieuses et réduit la réponse à la vaccination (Palacio et al., 2019). Ce phénomène a été largement illustré dernièrement par la mortalité liée à l'âge dû à la COVID-19 (Bajaj et al., 2021). Enfin, il y a les maladies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington, et les défaillances sensorielles, telles que les dégénérescences auditive et maculaire, qui augmentent toutes de manière significative chez les personnes âgées (Bowl and Dawson, 2019; Hou et al., 2019; Pelletier et al., 2016).

Le déclin fonctionnel et physiologique progressif de tout organisme vivant, conduisant inévitablement à la mort, résulte de l'accumulation progressive de dommages moléculaires et cellulaires survenant tout au long de sa vie. Ainsi, le vieillissement n'est pas une maladie en soi mais plutôt un processus biologique dont les multiples causes et conséquences s'additionnent et se superposent.

1.1.3 Les marqueurs de la santé et du vieillissement

1.1.3.1 Les marqueurs de la santé

Dans une revue récente, C. López-Otín et G. Kroemer proposent une classification de huit acteurs biologiques de la santé, définie non pas de façon classique comme l'absence de pathologies mais plutôt comme un ensemble de caractéristiques organisationnelles et dynamiques œuvrant au maintien de la physiologie (López-Otín and Kroemer, 2021). Ils définissent trois critères idéaux auxquels doivent répondre les marqueurs de la santé pour être considérés comme tels : ils doivent être associés à l'état de santé, leur perturbation expérimentale ou physiologique doit être pathogène, et enfin des interventions expérimentales ou médicales visant à les maintenir ou les restaurer doivent avoir un effet bénéfique sur la santé. La Figure 2 schématise les huit marqueurs de la santé ainsi définis.

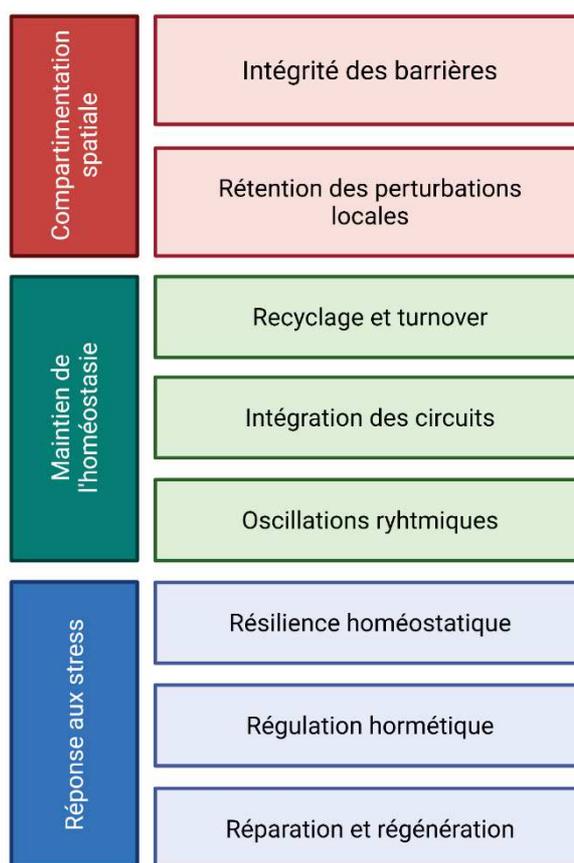


Figure 2 | Marqueurs de la santé

1.1.3.1.1 La compartimentation spatiale

❖ *Intégrité des barrières*

La notion de barrière est essentielle à toute entité vivante, c'est elle qui crée et définit l'identité, permettant de distinguer ce qui est propre de ce qui est étranger. Des barrières existent à toutes les échelles biologiques, que ce soit au niveau de l'organisme (par exemple la peau ou la barrière intestinale), au niveau cellulaire (par exemple les membranes plasmiques) ou encore au niveau intracellulaire (par exemple l'enveloppe nucléaire ou encore les organites tels que la mitochondrie ou les lysosomes). Les barrières biologiques assurent plusieurs rôles ; évidemment celui de la compartimentation spatiale permettant d'ériger une barrière physique entre l'extérieur et l'intérieur protégeant ainsi des agressions externes et créant des conditions électrophysiologiques et chimiques propres, mais également un rôle d'échanges et de régulation. D'un point de vue thermodynamique, la compartimentation spatiale permet de diminuer l'entropie des systèmes (Marín et al., 2009).

Prenons l'exemple de la peau. La peau, plus vaste organe du corps humain, constitue l'interface entre l'Homme et son milieu extérieur. Elle protège des agressions physiques, chimiques et microbiologiques, permet la régulation des échanges en eau et de la température corporelle, et c'est également un organe de synthèse (vitamine D par exemple) ainsi qu'un organe sensoriel. Le catalogue de pathologies dermatologiques existantes laisse peu de doutes quant à l'importance du maintien de l'intégrité de cette barrière biologique pour le maintien d'un statut sain. Pour n'en citer qu'une, le xeroderma pigmentosum aussi connu sous le nom de maladie des enfants de la lune, qui se traduit par une hypersensibilité aux rayons UVs due à une mutation de gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN, provoque un vieillissement accéléré de la peau et une augmentation du risque de cancer cutané, réduisant drastiquement l'espérance de vie des patients atteints (Black, 2016).

❖ *Rétention des perturbations locales*

La compartimentation spatiale permet également de cloisonner, et ce cloisonnement lorsqu'il est effectif permet de limiter la propagation d'une potentielle perturbation localisée et ainsi de limiter des effets néfastes non seulement en termes de diffusion d'une entité à une autre mais aussi en termes d'intensité de la perturbation. Si la perturbation diffuse à un niveau systémique, le risque est qu'elle surpasse les capacités de l'organisme à la contrôler et réparer les dommages causés, conduisant ainsi à une perte de fonction importante pouvant se traduire *in fine* par l'apparition d'une ou plusieurs pathologies.

Il est donc nécessaire de maintenir un système de réparation et de renouvellement des barrières efficace. La cicatrisation, par exemple, est un mécanisme de réparation indispensable, qui lorsqu'il est affaibli chez les personnes âgées notamment, augmente considérablement les risques de complications

chroniques et systémiques (Willyard, 2018). Par ailleurs, une cicatrisation excessive peut aussi conduire à des dysfonctionnements importants via les processus de fibrose et de formation des corps chéloïdes.

La neutralisation rapide d'un pathogène, quelle que soit sa nature, déclenche un processus d'inflammation qui se veut localisé et transitoire. Si cette inflammation perdure de façon chronique, à cause de la pathogénicité et/ou d'une déficience immunitaire, cela peut non seulement induire des dommages irréversibles dans le tissu infecté mais aussi se propager de façon systémique et conduire à des maladies auto-inflammatoires ou auto-immunes (Savic et al., 2020).

Enfin, lorsque la menace provient non plus d'un agent extérieur mais de dommages internes comme dans le cas des cellules cancéreuses ou sénescents par exemple, il est tout aussi important d'éviter sa dissémination via une immunosurveillance efficace (Buqué et al., 2020).

1.1.3.1.2 Le maintien de l'homéostasie

❖ *Recyclage et turnover*

Même en dehors de tout contexte pathologique, toutes les unités biologiques subissent des dommages endogènes notamment au niveau de leurs macromolécules. Des mécanismes de recyclage et de remplacement sont donc indispensables au maintien des stocks de macromolécules et de cellules elles-mêmes.

Lorsqu'elles meurent, les cellules au sein d'un tissu sont éliminées par phagocytose via un mécanisme appelé efferocytose (Morioka et al., 2019). Les cellules apoptotiques émettent un signal soluble « trouvez-moi » recrutant les phagocytes, un signal membranaire « mangez-moi » permettant leur identification et interaction avec les phagocytes ainsi qu'un signal anti-inflammatoire préventif d'une réaction excessive (Medina et al., 2020). Si elles ne sont pas correctement éliminées, les cellules apoptotiques déversent leur contenu dans le tissu, provoquant inflammation et réaction auto-immunes. Les cellules mortes sont remplacées grâce au pool de cellules souches, qui doit se maintenir en termes de taille, d'intégrité génomique et d'identité épigénétique, afin de garantir la viabilité tissulaire. Ces caractéristiques des cellules souches tendent à diminuer avec l'avancée en âge, participant ainsi à l'altération des capacités régénératives de l'organisme.

Le cytoplasme contenant une grande partie des macromolécules et organites cellulaires, doit également être régulièrement renouvelé notamment dans le cas des cellules à faible taux prolifératif. Cette problématique est résolue par un mécanisme cellulaire appelé autophagie. Des agrégats protéiques ou des organites entiers sont isolés dans des vésicules ou autophagosomes, qui fusionnent ensuite avec les lysosomes afin d'assurer la digestion de leur contenu par des hydrolases acides. L'autophagie protège

les cellules d'une mort prématurée, via l'élimination des mitochondries endommagées, d'agrégats protéiques potentiellement toxiques, et des protéines pro-nécrotiques (Levine and Kroemer, 2019). L'autophagie réduit également les niveaux d'inflammation, grâce à son action sur les mitochondries dysfonctionnelles ainsi qu'en réduisant des composants pro-inflammatoires.

❖ *Intégration des circuits*

La compartimentation spatiale est essentielle au fonctionnement des systèmes biologiques mais pour que celle-ci soit viable, il est indispensable que des circuits de communication existent entre les différents compartiments, que ce soit à l'échelle de la cellule, du tissu, entre les différents tissus ou encore entre le système et le milieu extérieur.

Au niveau intracellulaire, toutes les molécules sont reliées aux autres par des voies de signalisation et peuvent assurer des rôles multiples en fonction de ces voies. Dans le cas des métabolites par exemple, ils sont généralement impliqués à la fois dans les voies cataboliques et anaboliques. Certains, comme les adénosines phosphates par exemple (ATP/ADP/AMP) sont même des régulateurs essentiels de ces voies, indiquant à la cellule ses stocks en énergie.

Chaque tissu peut être considéré comme un micro-écosystème qui s'adapte en continu à son environnement. Les organes sont composés de deux familles de types cellulaires : les cellules parenchymateuses spécifiques du tissu assurant sa fonction propre, et les cellules connectives non spécifiques. Fibroblastes et macrophages sont retrouvés dans de nombreux tissus, ils communiquent entre eux via la sécrétion de facteurs de croissance et forment une unité fonctionnelle stable face aux perturbations (Zhou et al., 2018). Certaines cellules sont spécialisées dans la reconnaissance des signaux extérieurs, lumineux, sonores ou mécaniques, respectivement par les cellules rétiniennes, les cellules ciliées de l'oreille interne et les corpuscules de Pacini cutanés.

Ces micro-écosystèmes tissulaires ne sont bien entendu pas complètement isolés les uns des autres, ils sont reliés entre eux par la circulation sanguine dans laquelle transitent hormones, cytokines, facteurs de croissance, immunoglobulines. Ces effecteurs systémiques peuvent être synthétisés par un large nombre de types cellulaires, de mêmes qu'ils sont reconnus via des récepteurs présents sur bon nombre de ces types cellulaires.

❖ *Oscillations rythmiques*

Les fonctions physiologiques sont soumises à trois niveaux d'oscillations rythmiques selon leur périodicité. Les rythmes ultradiens dont la périodicité est inférieure à 24h s'illustrent avec les rythmes des organes vitaux (rythme cardiaque, activité électrique cérébrale, respiration) ou les rythmes

cellulaires (cycle cellulaire). Les rythmes infradiens concernent les cycles de durée supérieure à un jour avec par exemple les cycles menstruels féminins ou encore les variations hormonales saisonnières. Le plus connu et le plus étudié reste le cycle circadien, un cycle endogène d'environ 24h dont la synchronisation se fait principalement par la lumière. La photosensibilité des cellules rétiennes permet la transmission de l'information à un pool d'environ 20 000 neurones de l'hypothalamus, entraînant la régulation de signaux systémiques (signal endocrine, température corporelle, apport nutritionnel) diffusant dans tout l'organisme aux horloges périphériques.

Deux facteurs de transcription, BMAL1 et CLOCK, ont été identifiés comme des acteurs centraux dans les mécanismes moléculaires de régulation du cycle circadien (Partch et al., 2014; Trott and Menet, 2018). Un mécanisme complexe de boucles de rétrocontrôle transcriptionnelles et traductionnelles permet l'expression rythmée de certains gènes induisant ainsi une modification temporaire du protéome cellulaire. L'expression de près de la moitié des gènes codants du génome humain répond à des oscillations circadiennes dans au moins un tissu (Ruben et al., 2018).

Le cycle circadien impacte de nombreux mécanismes homéostatiques majeurs tels que la régulation des cellules souches (Solanas et al., 2017), les fonctions mitochondriales (Chaix et al., 2016), la réponse immunitaire (Man et al., 2016) ou encore le contrôle du microbiote. Par exemple, les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN causés majoritairement le jour par l'exposition aux UVs, seraient préférentiellement activés la nuit lorsque la probabilité de dommages génomiques est réduite.

1.1.3.1.3 La réponse aux stress

❖ *Résilience homéostatique*

La résilience homéostatique peut se définir comme la capacité d'un système à retrouver son état initial ou un nouvel état d'équilibre suite à une perturbation. L'homéostasie assure le maintien de nombreux paramètres biologiques : osmolarité, pression sanguine, glycémie, température corporelle, poids, concentrations hormonales, etc. Certains s'accordent à dire qu'il s'agit d'ailleurs plus d'une homéodynamie qu'une homéostasie compte-tenu du fait que le maintien de cet équilibre repose plus sur l'interaction adaptative entre les différents composants du système que sur le maintien d'un état statique unique (Lloyd et al., 2001).

La résilience homéostatique n'est pas seulement contrôlée par le cerveau via la sécrétion des hormones de stress, les catécholamines (épinéphrine et norépinéphrine) et les glucocorticoïdes, elle passe aussi par des facteurs endocriniens métaboliques sécrétés notamment par les tissus adipeux blanc et brun (Tomiya, 2019; Turkson et al., 2019). Les facteurs cellulaires et humoraux sécrétés par les systèmes

immunitaires innés et acquis, ainsi que le maintien du microbiote intestinal jouent également un rôle important dans la mise en place de cette résilience homéostatique (Cathomas et al., 2019; Teichman et al., 2020).

❖ *Régulation hormétique*

L'exposition à de faibles doses de toxine déclenche un mécanisme de réponse qui peut permettre la mise en place d'un effet protecteur envers de futures expositions à de plus fortes doses, c'est ce qu'on appelle l'hormèse. Le stress peut être de différente nature : chimique, physique, pharmacologique ou nutritionnel. Cette théorie s'applique particulièrement à la mitochondrie, avec un terme dédié, mitohormèse (Tapia, 2006). Un stress mitochondrial induit principalement la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dérivant de la chaîne respiratoire mitochondriale et des échanges d'électrons qui s'y opèrent. Ces molécules sont dotées de radicaux libres, ce qui les rend très réactives et potentiellement capables d'endommager les macromolécules essentielles. Les effets bénéfiques de faibles doses de ROS ont été démontrés chez l'animal dans le cœur (Granger and Kvietyts, 2015; Thijssen et al., 2018) et dans le cerveau (Sivandzade et al., 2019).

L'hormèse peut avoir des effets bénéfiques sur la longévité et l'espérance de vie en bonne santé. Nous y reviendrons plus en détails dans la section 1.2.1.

❖ *Réparation et régénération*

Contrairement au turnover décrit précédemment, les mécanismes de réparation et de régénération sont spécifiques du type de dommage subi.

L'ADN est soumis à de nombreux stress qu'ils soient endogènes ou exogènes, conduisant à de nombreux dommages. Ces lésions dans le génome peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies chroniques, de même qu'elles participent au vieillissement (voir paragraphe 1.1.3.2.1). Il existe divers mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, qu'il soit mitochondrial ou nucléaire, qui forment l'ensemble des réponses aux dommages à l'ADN. Ces mécanismes sont également responsables du devenir des cellules présentant des dommages irréversibles. Par exemple, le facteur de transcription p53 est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose (mort cellulaire programmée), de l'autophagie et de la sénescence cellulaire (Levine, 2020).

Le protéome, représentant l'ensemble des protéines, constitue lui aussi la cible de nombreux dommages, nécessitant le traitement des protéines mal repliées soit par leur stabilisation soit par leur dégradation (Morimoto, 2020). Le contrôle qualité des protéines passe principalement par deux mécanismes : le système ubiquitine-protéasome et le système autophagie-lysosome (Pohl and Dikic, 2019). Le système

ubiquitine-protéasome consiste à ajouter par liaison covalente des chaînes d'ubiquitine aux protéines permettant leur reconnaissance par le protéasome 26S qui viendra les hydrolyser. Les résidus de protéolyse sont ensuite dégradés en acides aminés par des carboxypeptidases et des aminopeptidases cellulaires. Le mauvais repliement des protéines entraîne aussi un stress du réticulum endoplasmique, compartiment cellulaire qui reçoit les protéines après la synthèse ribosomale. Ce stress (du réticulum endoplasmique) conduit à l'activation d'une réponse adaptative, la réponse UPR (*unfolded protein response*) qui passe par 3 mécanismes impliquant respectivement 3 capteurs de stress : PERK, ATF6 et IRE1 (Walter and Ron, 2011).

Les organites eux-mêmes sont soumis à des dommages et notamment les mitochondries et les lysosomes. Il existe une voie de réponse mitochondriale au stress permettant de transitionner vers un métabolisme glycolytique favorisant les réparations (Costa-Mattioli and Walter, 2020; Shpilka and Haynes, 2018). Comme pour le réticulum endoplasmique, cette voie fait appel à des facteurs tels qu'ATF4, ATF5, CHOP et C/EBP β 4. La perméabilisation des membranes lysosomales entraîne un stress cellulaire intense et déclenche donc un mécanisme de réponse aux dommages (Papadopoulos et al., 2020). Soit les membranes sont reconstituées grâce à l'action de la protéine chaperonne HSP70 qui recrute la machinerie endosomale et en particulier le complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Soit les lysosomes endommagés sont séquestrés dans des autophagosomes en vue de leur élimination.

Bien entendu, les mécanismes de réparation et de régénération ne s'appliquent pas qu'à l'échelle des organites et des cellules, il existe également des mécanismes à l'échelle tissulaire. Ce sont majoritairement les cellules souches et les progéniteurs qui sont responsables de la réparation des tissus endommagés (Wu and Izpisua Belmonte, 2016). Les capacités régénératrices liées au potentiel souche ont progressivement décliné avec l'évolution et continuent de diminuer au cours du développement puis du vieillissement.

1.1.3.2 Les marqueurs du vieillissement

Pour comprendre le vieillissement, il faut s'intéresser aux mécanismes cellulaires et moléculaires qui en sont responsables. López-Otín et al. ont publié en 2013 une revue regroupant et détaillant tous les dysfonctionnements cellulaires pouvant conduire au vieillissement d'un organisme (López-Otín et al., 2013).

Ils ont identifié neuf marques caractéristiques générales du vieillissement et ces éléments ont été classés selon trois critères importants. Premièrement, chacun de ces dommages doit apparaître de façon naturelle au cours du vieillissement physiologique. Enfin, leur détérioration expérimentale doit accentuer le vieillissement et inversement leur amélioration doit le ralentir. Toutes ces marques non seulement s'accumulent progressivement au cours de vieillissement mais sont interconnectées les unes avec les autres, créant ainsi un environnement complexe qui sous-tend l'origine multifactorielle des pathologies liées à l'âge (Figure 3).

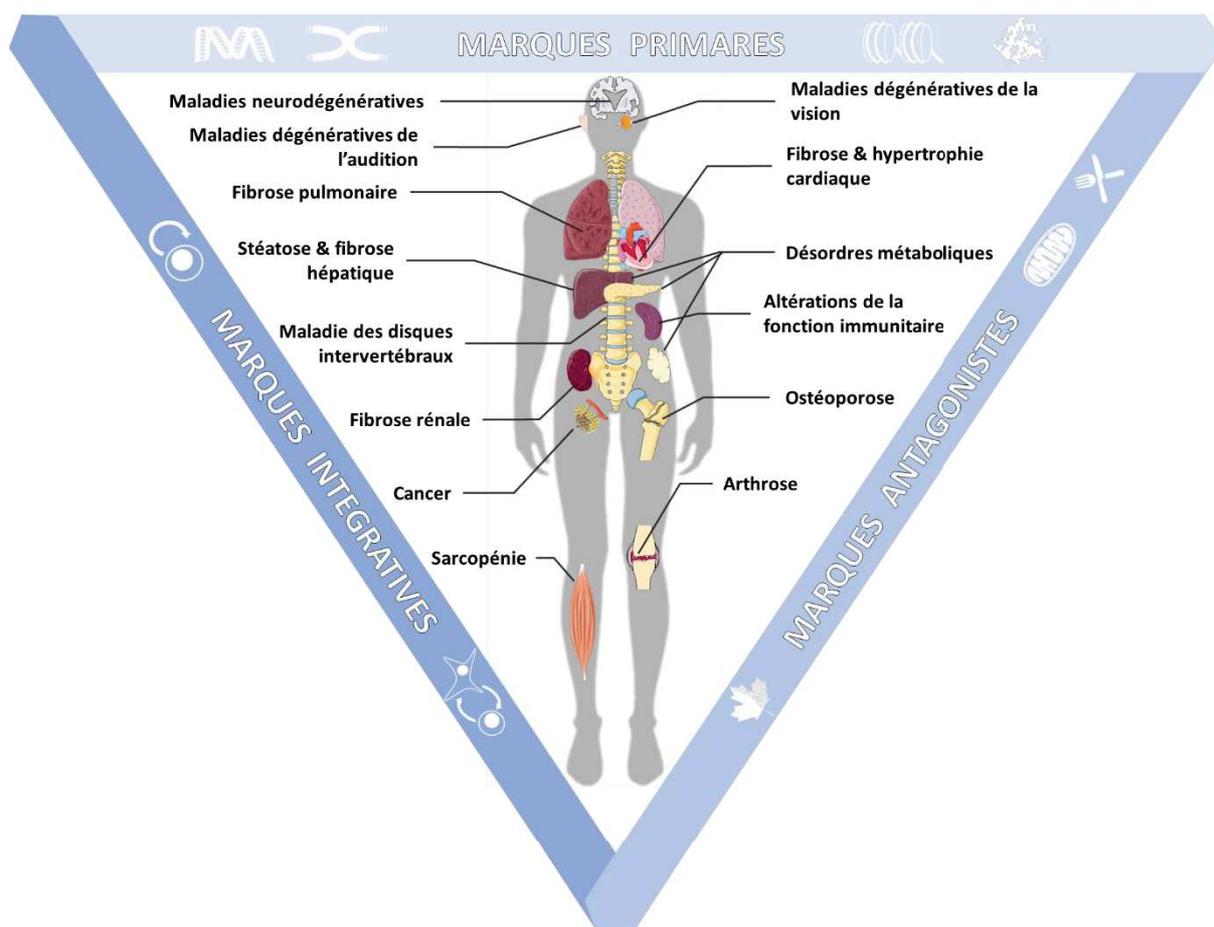


Figure 3 | Marqueurs du vieillissement à l'origine des pathologies liées à l'âge (Alle et al., 2021a)

1.1.3.2.1 Les marques primaires

Ils définissent en premier lieu les marques primaires du vieillissement qu'ils caractérisent comme des éléments déclencheurs causant des dommages s'accumulant progressivement avec le temps. Il s'agit principalement de dommages affectant la structure des biomolécules et donc de leurs fonctions. Cela se traduit au niveau cellulaire par une augmentation du désordre moléculaire.

❖ *Instabilités génomiques*

La preuve irréfutable que l'endommagement du génome contribue au vieillissement réside dans l'existence de pathologies de vieillissement accéléré résultant de dommages génomiques, telles que le syndrome d'Hutchinson-Gilford Progeria (Sandre-Giovannoli et al., 2003), le syndrome de Cockayne (Weidenheim et al., 2009), le syndrome de Louis-Bar ou ataxie téléangiectasie (Shiloh and Lederman, 2017), ou encore le syndrome de Werner (Muftuoglu et al., 2008).

Le patrimoine génétique est constitué par l'ADN nucléaire bien entendu, mais aussi par le génome mitochondrial. La stabilité et l'intégrité du génome sont continuellement mises à rude épreuve par divers stress exogènes (produits chimiques, irradiation aux ultraviolets ou infrarouges, virus) mais aussi par des stress endogènes (ROS, erreurs de réplication, réactions spontanées) (Hoeijmakers, 2009). Les dommages causés peuvent aller de la simple mutation ponctuelle silencieuse à des cassures double brin de l'ADN entraînant l'altération des programmes d'expression génique. La plupart des dommages causés peuvent être pris en charge par la machinerie cellulaire et les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. Parmi ces mécanismes, on peut citer la réparation par excision de bases ou nucléotides pour remplacer les bases ou nucléotides endommagés, les recombinaisons homologues, la jonction d'extrémités non homologues ou médiée par microhomologie contre les cassures double brin ou la réparation des mésappariements. La préservation du patrimoine génétique repose également sur sa protection et donc sur l'intégrité des membranes qui l'entourent. L'architecture de l'enveloppe nucléaire joue donc également un rôle primordial.

Or avec l'avancée en âge, ces dommages ont tendance à s'accumuler ce qui peut s'expliquer soit par l'augmentation de la fréquence de ces dommages soit par une diminution de l'efficacité à les réparer. L'accumulation de ces lésions peut avoir une incidence sur les mécanismes de réplication, de transcription de l'ADN jusqu'à la traduction en protéines. Si la cellule échoue à mettre en place les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, il lui reste encore deux mécanismes de défense pour empêcher la propagation et l'amplification des dommages : l'arrêt irréversible du cycle cellulaire correspondant à l'entrée en sénescence de la cellule, ou l'apoptose.

❖ *Raccourcissement des télomères*

La détérioration spécifique des télomères avec l'avancée en âge, met en évidence une sensibilité accrue de certaines régions du génome face aux dommages (Blackburn et al., 2006). Dans les processus de réplication de l'ADN, les polymérase répliquatives ne sont pas adaptées au traitement des extrémités des brins d'ADN. Il existe des polymérase spécialisées dans la réplication de ces séquences terminales ou télomères, ce sont les télomérase. Or ces télomérase ne sont pas exprimées dans la plupart des cellules de mammifère. De fait, au fur et à mesure des cycles de réplication, les séquences aux extrémités des chromosomes sont progressivement raccourcies. Il a été mis en évidence chez divers mammifères dont l'Homme, que le raccourcissement des télomères était observable au cours du vieillissement physiologique (Martínez and Blasco, 2017). Le raccourcissement des télomères est d'ailleurs une des causes de l'entrée en sénescence répliquative des cellules (Liu et al., 2019a).

Les télomères sont normalement protégés par un complexe protéique, le shelterin (Palm and de Lange, 2008). Ce complexe permet notamment de rendre les télomères inaccessibles aux acteurs de la réparation des dommages à l'ADN. Autrement, ces régions terminales seraient considérées comme des lésions, et seraient fusionnées par les protéines de réparation ce qui conduirait à des fusions chromosomiques.

Des liens expérimentaux ont pu être faits entre longueur des télomères et espérance de vie. Il a également été démontré que la réactivation de la télomérase permettait de retarder le phénomène de vieillissement et d'allonger l'espérance de vie (Bernardes de Jesus et al., 2012; Jaskelioff et al., 2011).

❖ *Altérations épigénétiques*

L'épigénétique se définit comme l'étude des mécanismes entraînant des modifications des niveaux d'expression des gènes, indépendamment des modifications brutes de la séquence d'ADN. Par définition, les modifications épigénétiques sont réversibles. Le terme épigénétique recouvre donc les mécanismes de méthylation de l'ADN, de modifications post-traductionnelles des histones, et d'organisation et de remodelage de la chromatine. Tous ces mécanismes sont cruciaux pour la fonctionnalité de la chromatine, puisqu'ils régulent notamment la disponibilité de l'ADN vis-à-vis des complexes transcriptionnels. Ils ont récemment été mis en cause pour leur implication dans les processus de vieillissement et de longévité (Sen et al., 2016). Cependant les changements chromatiniens au cours du vieillissement sont complexes puisqu'ils peuvent différer d'un type cellulaire à l'autre, d'un organe à l'autre ou encore d'une espèce à l'autre.

La chromatine existe sous deux états définis par leur intensité de compaction : euchromatine et hétérochromatine, qui représentent respectivement un état décondensé et condensé de l'ADN. L'hétérochromatine, plus condensée et donc moins accessible, est également moins transcrite. Elle

regroupe les éléments génomiques à séquences fortement répétées tels que les régions télomériques, les séquences satellites, les séquences ribosomales ou encore les éléments transposables (Grewal and Jia, 2007). L'hétérochromatine est également impliquée dans les interactions avec la lamina nucléaire via des domaines spécifiques appelées LADs pour *lamina-associated domains*. Le bloc structural formé par l'hétérochromatine compactée joue un rôle crucial dans la stabilisation de la totalité du génome. Au cours du vieillissement, une perte globale d'hétérochromatine s'opère (Tsurumi and Li, 2012).

La chromatine est constituée de complexes protéiques à base d'histones, les nucléosomes, autour desquels s'enroule l'ADN. Les protéines histones sont principalement soumises à deux types de modifications épigénétiques : des acétylations ou des méthylation qui s'opèrent sur leurs résidus lysines. Dans les processus de vieillissement, deux histones, H3 et H4, sont particulièrement sujettes à des modifications de type triméthylation, respectivement sur les résidus lysines 9 et 20. Ces histones sont impliquées dans la régulation de l'activité transcriptionnelle. Bien que les résultats des études divergent en fonction du type cellulaire, du tissu ou de l'espèce étudiés quant à l'enrichissement ou l'appauvrissement de ces marques, il est indéniable que les histones H3 et H4 subissent un remodelage au cours du vieillissement (Benayoun et al., 2015).

Chez les eucaryotes, la méthylation de l'ADN repose principalement sur la méthylation de la cytosine sur son carbone 5. Les cytosines ciblées sont généralement suivies d'une guanidine dans la chaîne nucléotidique de l'ADN, constituant des sites spécifiques appelés dinucléotides CpG. Ce processus est régulé par les ADN méthyltransférases DNMT et les protéines TET (Greenberg and Bourc'his, 2019; Li and Zhang, 2014). On observe une hypométhylation globale de l'ADN au cours du vieillissement, décrite chez la souris, le rat et l'Homme (Bollati et al., 2009; Sidler et al., 2017) associée à une hyperméthylation de certains sites spécifiques notamment au niveau des promoteurs des gènes régulateurs du cycle cellulaire (Booth and Brunet, 2016; Ren et al., 2017). Une forte corrélation a été établie entre les niveaux de méthylation de l'ADN et l'âge, permettant même d'en faire un outil de mesure de l'âge biologique par opposition à l'âge chronologique, c'est ce que l'on appelle les horloges épigénétiques. Il existe deux grands types d'horloges épigénétiques : les horloges dites chronologiques dont la sélection des CpGs est associée à l'âge chronologique et les horloges dites biologiques dont la sélection des CpGs est associée à des phénotypes pathologiques associés au vieillissement. Elles reflètent respectivement les changements des niveaux de méthylation associés au vieillissement communs entre les individus (vieillesse intrinsèque) ou la variabilité intra-individuelle à l'origine des dysfonctionnements et pathologies associées à l'âge. Les principales horloges proposées sont récapitulées dans le Tableau 1. Parmi les plus célèbres horloges chronologiques, celle développée par Horvath a la particularité d'être la seule à pouvoir s'appliquer à différents tissus. Elle s'appuie sur un panel de 353 CpGs différenciellement méthylés avec l'âge (hypo ou hyper-méthylation) (Horvath, 2013).

Tableau 1 | Récapitulatif des diverses horloges épigénétiques proposées et de leurs paramétrages

Référence	Nombre de CpGs	Gamme d'âges	Echantillonnage	Tissu(s)
<i>Horloges chronologiques</i>				
(Bocklandt et al., 2011)	3	18-70	68	Salive
(Koch and Wagner, 2011)	19	16-72	130	Divers types cellulaires
(Horvath, 2013)	353	0-101	8000	Divers tissus et types cellulaires
(Hannum et al., 2013)	71	19-101	656	Sang
(Weidner et al., 2014)	3	0-78	575	Sang
(Florath et al., 2014)	17	50-75	400	Sang
(Huang et al., 2015)	5	9-75	89	Sang
(Zbieć-Piekarska et al., 2015)	5	2-75	420	Sang
(Zhang et al., 2019)	514	2-104	13566	Sang et salive
<i>Horloges biologiques</i>				
(Yang et al., 2016b)	385	19-101	656	Sang
(Zhang et al., 2017)	10	31-82	1000	Sang
(Youn and Wang, 2018)	286	NA	4020	Tumeurs (TTGA)
(Levine et al., 2018)	513	>20	9926	Sang
(Lu et al., 2019a)	1030	NA	1731	Sang
(Lu et al., 2019b)	140	22-93	2256	Sang

❖ *Perte de la protéostasie*

Comme décrit précédemment dans les marqueurs de la santé, l'homéostasie et ici plus particulièrement l'homéostasie protéique ou protéostasie, est un acteur clé de la viabilité des systèmes. Le maintien de la protéostasie repose sur trois systèmes : la synthèse et le repliement des protéines, faisant appel aux ribosomes, aux chaperonnes, aux agrégases et désagrégases, leurs modifications post-traductionnelles, regroupant phosphorylation, acétylation ou encore oxydation, et enfin leur dégradation, via les systèmes autophagie-lysosome ou ubiquitine-protéasome.

De nombreuses études ont mis en évidence une altération de la protéostasie avec l'âge (Hipp et al., 2019). De plus, l'accumulation chronique de protéines mal repliées est à l'origine de pathologies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Powers et al., 2009). Au niveau cellulaire, la pathologie se caractérise par l'accumulation de fragments de la protéine bêta-amyloïde sous forme de plaques à l'extérieur des neurones ainsi que par l'enchevêtrement de brins tordus de la protéine tau s'accumulant à l'intérieur des corps cellulaires. Ces deux phénomènes contribuent à l'endommagement et à la mort des neurones.

1.1.3.2.2 Les marques antagonistes

Les marques antagonistes sont initialement des mécanismes de réparation activés en réponse aux dommages causés par les marques primaires mais dont les effets bénéfiques deviennent délétères lorsqu'ils sont suremployés.

❖ *Dérèglement de la sensibilité aux nutriments*

Les activités métaboliques sont une source de stress, une trop forte activité ou une modification de la disponibilité des nutriments sont en effet des facteurs de vieillissement prématuré. Les métabolites peuvent causer des dommages cellulaires via les mécanismes de stress oxydatif, de stress du réticulum endoplasmique, via les voies de signalisation du calcium ou encore via des dysfonctionnements mitochondriaux. Il existe donc à différentes échelles, des mécanismes de régulation de l'activité métabolique en fonction des besoins énergétiques et de la disponibilité des nutriments.

Il existe une grande similitude entre les voies de signalisation de l'insuline en réponse à la présence de glucose et celles du facteur de croissance IGF-1 en réponse à la sécrétion des hormones de croissance. Elles forment d'ailleurs une seule et même voie intitulée *insulin and IGF-1 signaling* (IIS). C'est une des voies les plus conservées de l'évolution et compte parmi ses cibles la famille des facteurs de transcription FOXO et les complexes mTOR (Figure 4). Le vieillissement s'accompagne généralement d'une diminution globale de cette voie de signalisation sensible au glucose (Vitale et al., 2019).

Parallèlement, il existe trois autres voies de sensibilité aux nutriments : la voie mTOR, en réponse aux concentrations en acides aminés, la voie AMPK, sensible à la demande énergétique via la détection des niveaux d'AMP, et enfin la voie des sirtuines, sensible également aux besoins énergétiques via les niveaux de NAD⁺ (Figure 4). La voie mTOR régule essentiellement le métabolisme anabolique, à savoir les biosynthèses (Laplante and Sabatini, 2012). La régulation à la baisse de la voie mTOR est bénéfique au cours du vieillissement, non seulement sur les paramètres de longévité mais aussi sur la résistance à certaines pathologies liées à l'âge (Selman et al., 2009). Les voies AMPK et sirtuines fonctionnent quant à elles à l'opposé, c'est-à-dire qu'elles détectent les pénuries en nutriments et favorisent le catabolisme. Leur régulation à la hausse favorise un vieillissement sain (Fontana et al., 2010a).

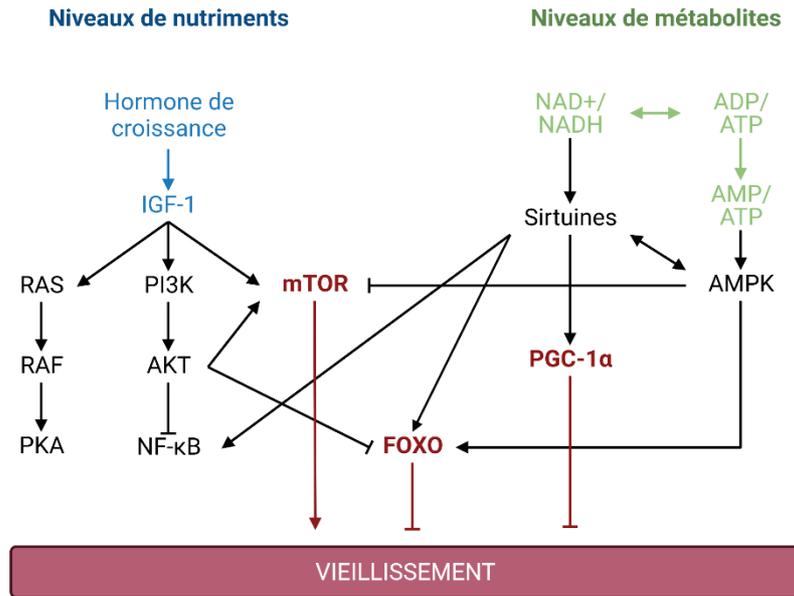


Figure 4 | Voies de signalisation associées à la sensibilité aux nutriments

❖ *Dysfonctionnements mitochondriaux*

Il existe une théorie bien ancrée, intitulée théorie radicalaire du vieillissement, développée dans la seconde moitié du XX^e siècle par Harman, qui suggère que l'accumulation progressive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) avec l'âge est responsable de dommages mitochondriaux et cellulaires importants (Harman, 1992). Ces dernières années, cette théorie a été réévaluée suite à de nombreuses études mettant en évidence des rôles contradictoires des ROS dans les processus de vieillissement (Ristow and Schmeisser, 2011). Cette nouvelle théorie se propose d'envisager les ROS comme un signal de survie en réponse à un stress. La production de ROS fait partie d'un mécanisme homéostatique de compensation. Or avec l'avancée en âge, l'exposition à des stress et les dommages induits augmentent, déclenchant une augmentation des ROS comme mécanisme de survie. Au-delà d'un certain point, l'accumulation de ROS dépasse la capacité du processus homéostatique et tendrait à aggraver les dommages plutôt que de les atténuer (Hekimi et al., 2011).

La mitochondrie peut être considérée comme une entité autonome possédant son propre génome et sa propre machinerie cellulaire, subissant donc comme décrit précédemment à l'échelle de la cellule, les marques primaires du vieillissement. L'association de l'intensification des dommages mitochondriaux avec un affaiblissement du renouvellement du pool mitochondrial (moins de biogénèse et plus d'élimination), contribue au processus de vieillissement. L'altération de la biogénèse mitochondriale semble être directement liée au raccourcissement des télomères (Sahin et al., 2011). La famille des sirtuines, notamment SIRT1, a également été décrite comme modulateurs du renouvellement

mitochondrial via une voie impliquant PGC-1 α et les processus de mitophagie (Lee et al., 2008; Rodgers et al., 2005). Les dysfonctionnements mitochondriaux peuvent également trouver leurs origines dans l'altération du génome mitochondrial, l'oxydation des protéines mitochondriales, la désorganisation des complexes protéiques de la chaîne respiratoire mitochondriale ou la perturbation de la balance dynamique des fusions/fissions mitochondriales (Wang and Klionsky, 2011).

❖ *Sénescence cellulaire*

La sénescence cellulaire a historiquement été définie comme un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Il s'agit en réalité d'un état plus complexe dans lequel la cellule, dont la prolifération est en effet inhibée irréversiblement, maintient une activité métabolique.

Elle a été décrite pour la première fois par L. Hayflick et P.S. Moorhead en 1961 (Hayflick and Moorhead, 1961). Ils ont mis en évidence les limites des capacités prolifératives des cellules en culture primaire. En effet, après une cinquantaine de passages successifs pour des fibroblastes humains, les cellules perdent leur capacité à proliférer, on parle alors de sénescence répllicative. Ce phénomène est dû principalement au raccourcissement progressif des télomères (Turner et al., 2019).

Il existe d'autres moyens d'induire la sénescence cellulaire *in vitro*. L'induction d'un stress, tel qu'un stress oxydatif ou une exposition aux UV, permet d'induire des dommages à l'ADN conduisant à une sénescence prématurée, dite SIPS pour *stress-induced premature senescence* (Toussaint et al., 2000, 2002). La sénescence peut également être induite de manière accélérée à l'aide d'agents pharmacologiques génotoxiques tels que l'étoposide (Lenain et al., 2015; Leontieva and Blagosklonny, 2010) ou la mitomycine C (Alili et al., 2014). De nombreuses molécules ont depuis été décrites comme induisant la sénescence cellulaire (Petrova et al., 2016). Enfin l'activation ou la surexpression d'oncogènes, et notamment l'oncogène RAS (Serrano et al., 1997), constitue un dernier type de sénescence induite dite OIS pour *oncogene-induced senescence*.

Quelle que soit la méthode d'induction de la sénescence, les cellules sénescents présentent généralement des caractéristiques phénotypiques et moléculaires communes (Figure 5) (Gorgoulis et al., 2019; Kuilman et al., 2010). Leurs non-capacités prolifératives se traduisent au niveau moléculaire par une inhibition des cyclines A1/A2 et E1/E2, et une activation des inhibiteurs de cycle p16^{INK4a} et p21^{Cip1}. Elles se caractérisent également par l'existence d'un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) qui se compose de facteurs pro-inflammatoires type cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, CCL2, CXCL1), métalloprotéinases (MMP-1, MMP-3, MMP-10) et facteurs de croissance (VEGF). Elles présentent une activité lysosomale spécifique de la β -galactosidase, en faisant un marqueur de choix pour leur identification (Dimri et al., 1995; Itahana et al., 2007). Leur architecture nucléaire est également

fortement impactée et elles présentent une structure de chromatine altérée avec des foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) ainsi que des foyers d'endommagement γ -H2AX.

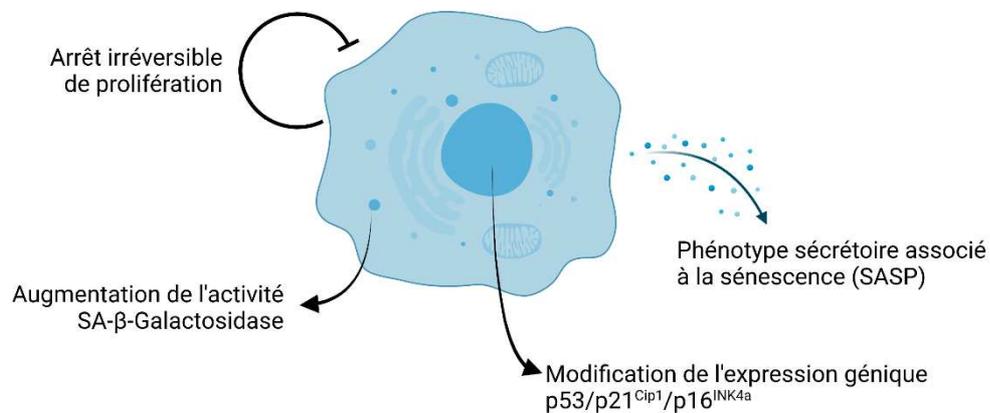


Figure 5 | Caractéristiques phénotypiques des cellules sénescences

Comme toutes les marques antagonistes, la sénescence est un mécanisme initialement bénéfique notamment à travers sa fonction suppresseur de tumeur (Prieur and Peeper, 2008) ainsi que son rôle dans l'embryogénèse et la cicatrisation. Cependant l'accumulation progressive de cellules sénescences dans les tissus au cours du vieillissement, due notamment à leur moins bonne élimination par le système immunitaire peut être liée à de nombreuses pathologies associées à l'âge (Borghesan et al., 2020).

Diverses interventions thérapeutiques peuvent être envisagées pour lutter contre le vieillissement lié à l'accumulation de cellules sénescences (Soto-Gamez and Demaria, 2017). Ces sénotherapies consistent soit à éviter la formation de cellules sénescences via la réactivation de leur prolifération, soit à interférer avec leur SASP et ses effets paracrines délétères, soit à éliminer sélectivement ces cellules par immunothérapie, soit à induire sélectivement leur apoptose. Ces thérapies seront présentées plus en détails (voire section 1.2.7).

1.1.3.2.3 Les marques intégratives

Les marques intégratives apparaissent lorsque les dommages accumulés causés par les marques primaires et antagonistes ne peuvent être compensés par des mécanismes homéostatiques au sein de l'organisme. En effet, en vieillissant, nous assistons à l'accumulation progressive de dommages moléculaires qui ne sont plus supportés par les mécanismes de contrôle cellulaire et ainsi le nombre de cellules sénescences, endommagées et/ou dysfonctionnelles augmente.

❖ *Epuisement des cellules souches*

De nombreux tissus adultes maintiennent leur capacité à évoluer et à se régénérer dans des conditions physiologiques et de blessure, grâce à la présence de cellules souches résidentes. Parmi ces cellules souches adultes, on compte les cellules souches hématopoïétiques (HSCs) résidant dans la moelle osseuse et permettant la production des cellules sanguines, les cellules souches intestinales (ISCs), les cellules satellites dans le muscle squelettique (MuSCs), les cellules souches neurales (NSCs), les cellules souches cutanées (EpiSCs) et les cellules souches germinales (GSCs) à l'origine des gamètes. Or avec l'âge, l'organisme perd progressivement cette capacité, notamment à cause d'une perte du nombre ou d'une diminution de la fonctionnalité de ces cellules souches adultes (Schultz and Sinclair, 2016).

Les cellules souches satellites sont responsables de la régénération des fibres musculaires squelettiques. La diminution de la population de ces cellules souches avec l'avancée en âge a été décrite à la fois chez la souris et chez l'Homme (Brack et al., 2005; Collins et al., 2007; Gibson and Schultz, 1983). De plus, la fonctionnalité des cellules satellites décroît également avec l'âge, notamment leur capacité proliférative *in vitro* ainsi que leur capacité régénératrice *in vivo* (Bernet et al., 2014; Bortoli et al., 2003; Cosgrove et al., 2014; Sousa-Victor et al., 2014). Il a en effet été démontré que les cellules satellites voient leur potentiel de différenciation altéré avec l'avancée en âge, ainsi au lieu de se différencier vers des lignées myogéniques permettant la régénération de la fibre musculaire, elles ont plutôt tendance à se différencier vers des lignées fibrogéniques participant à l'augmentation de la fibrose musculaire. Ce changement dans le potentiel de différenciation des cellules satellites serait induit par des signaux extrinsèques liés aux voies de signalisation Wnt et TGF- β (Brack et al., 2007; Carlson et al., 2009). La perte de la capacité d'autorenouvellement, conduisant à l'appauvrissement du pool de cellules souches musculaires serait quant à lui plutôt lié à des signaux intrinsèques indépendants de l'environnement, dont une augmentation de l'activité de la voie de réponse aux stress p38-MAPK (Bernet et al., 2014; Cosgrove et al., 2014) et une augmentation de la sénescence (Cosgrove et al., 2014; Sousa-Victor et al., 2014).

❖ *Altération de la communication cellulaire*

La principale altération de la communication cellulaire dans le contexte du vieillissement repose sur ce que l'on appelle l'« *inflammaging* » c'est-à-dire un phénotype pro-inflammatoire chronique accompagnant le vieillissement (Salminen et al., 2012). Ce contexte pro-inflammatoire peut être la résultante de l'accumulation de dommages tissulaires pro-inflammatoires, du dysfonctionnement du système immunitaire et/ou de la sécrétion accrue de facteurs pro-inflammatoires suite à l'accumulation de cellules sénescents. Une inflammation chronique peut être à l'origine de l'apparition de certaines pathologies métaboliques telles que l'obésité ou le diabète de type II, dont la corrélation avec l'âge a pu

être démontrée (Barzilai et al., 2012). L'inflammation est aussi critique dans le développement des pathologies articulaires telles que l'arthrite (Choy and Panayi, 2001).

Le déclin de la fonctionnalité du système immunitaire ou immunosénescence, accompagne et potentiellement aggrave le vieillissement au niveau systémique. L'immunosénescence participe également à l'augmentation de la fréquence des pathologies infectieuses et auto-immunes, ainsi qu'à la diminution de l'efficacité vaccinale (Ma and Fang, 2013).

1.1.3.2.4 Marques additionnelles proposées

Bien que la classification proposée par López-Otín soit largement acceptée, quelques nouveaux marqueurs de vieillissement ont été identifiés depuis 2013, notamment la rigidification de la matrice extracellulaire (Fedintsev and Moskalev, 2020), les fragments dérivés d'ARNt (Yuan et al., 2021), l'accumulation d'ARN circulaires (Knupp and Miura, 2018), et même la dysbiose du microbiote (Nagpal et al., 2018).

La matrice extracellulaire est principalement constituée de deux composants : le collagène et l'élastine. Ces macromolécules ont des demi-vies extrêmement longues et sont donc très stables. Cependant, avec le temps elles sont sujettes à des dommages de nature non enzymatique qui déstabilisent la structure de la matrice extracellulaire. Ces modifications non enzymatiques regroupant glycation, carbonatation et carbamylation, conduisent à la formation de liaisons croisées entraînant à leur tour inflammation, fibrose, altération de l'horloge circadienne et vieillissement des cellules souches.

Les fragments dérivés d'ARNt sont de petits ARN non codants produits lors du clivage des ARNt. Leur présence a pu être associée à certaines pathologies liées à l'âge chez l'Homme telles que le cancer ou des pathologies neurodégénératives (Pandey et al., 2021). Les interactions des fragments d'ARNt avec la machinerie cellulaire sont nombreuses : ils peuvent interagir avec les protéines régulant l'expression génique, ils interviennent dans la régulation de la synthèse des protéines et ils participent à la régulation du cycle cellulaire. Les fragments d'ARNt peuvent même faire l'objet de modifications épigénétiques, notamment des méthylations post-transcriptionnelles.

Les ARN circulaires (ARNcirc) sont majoritairement générés lors de l'épissage des exons codant pour les protéines. Une très forte corrélation entre l'accumulation de ces ARNcirc dans le cerveau et l'âge a été mise en évidence chez la drosophile (Westholm et al., 2014), la souris (Gruner et al., 2016) et *C. elegans* (Cortés-López et al., 2018). Bien que l'impact de l'accumulation des ARNcirc dans le système nerveux ne soit pas encore parfaitement décrit et compris, ils restent un excellent candidat comme biomarqueurs du vieillissement.

Le microbiote constitue un ensemble riche et complexe de microorganismes cohabitant avec leur hôte sur chaque surface corporelle exposée au milieu extérieur (peau, intestin, muqueuses). Il contribue de façon essentielle à la physiologie de l'organisme grâce à une relation de symbiose (Eloe-Fadrosh and Rasko, 2013; Li et al., 2008). La composition et la diversité du microbiote évoluent continuellement avec l'avancée en âge et sont soumises à de nombreux facteurs environnementaux. Des études ont mis en évidence des liens entre la composition du microbiote, notamment le microbiote intestinal qui est le plus étudié, et des prédispositions à développer certaines pathologies (Kim and Benayoun, 2020). Une étude récente en particulier, a pu démontrer qu'une transplantation du microbiote fécal d'un donneur jeune dans un receveur âgé permettait d'atténuer certains déficits cognitifs associés à l'âge (Boehme et al., 2021).

1.2 STRATEGIES DE LUTTE POUR PREVENIR ET/OU RALENTIR LE VIEILLISSEMENT

Le vieillissement est un processus complexe qui se caractérise par une accumulation progressive de dommages associée à une altération progressive des capacités de réparation et de régénération, conduisant à des pertes de fonctions d'un ou plusieurs tissus à l'origine de l'apparition de pathologies. Le vieillissement global de la population a entraîné une augmentation de la proportion de personnes âgées dans nos sociétés et a révélé un besoin croissant de traitements préventifs ou curatifs pour la prise en charge du vieillissement. Il existe au moins autant de stratégies anti-âges qu'il existe de marqueurs du vieillissement. Nous nous proposons dans ce chapitre de présenter certaines d'entre elles (récapitulées en Figure 6).

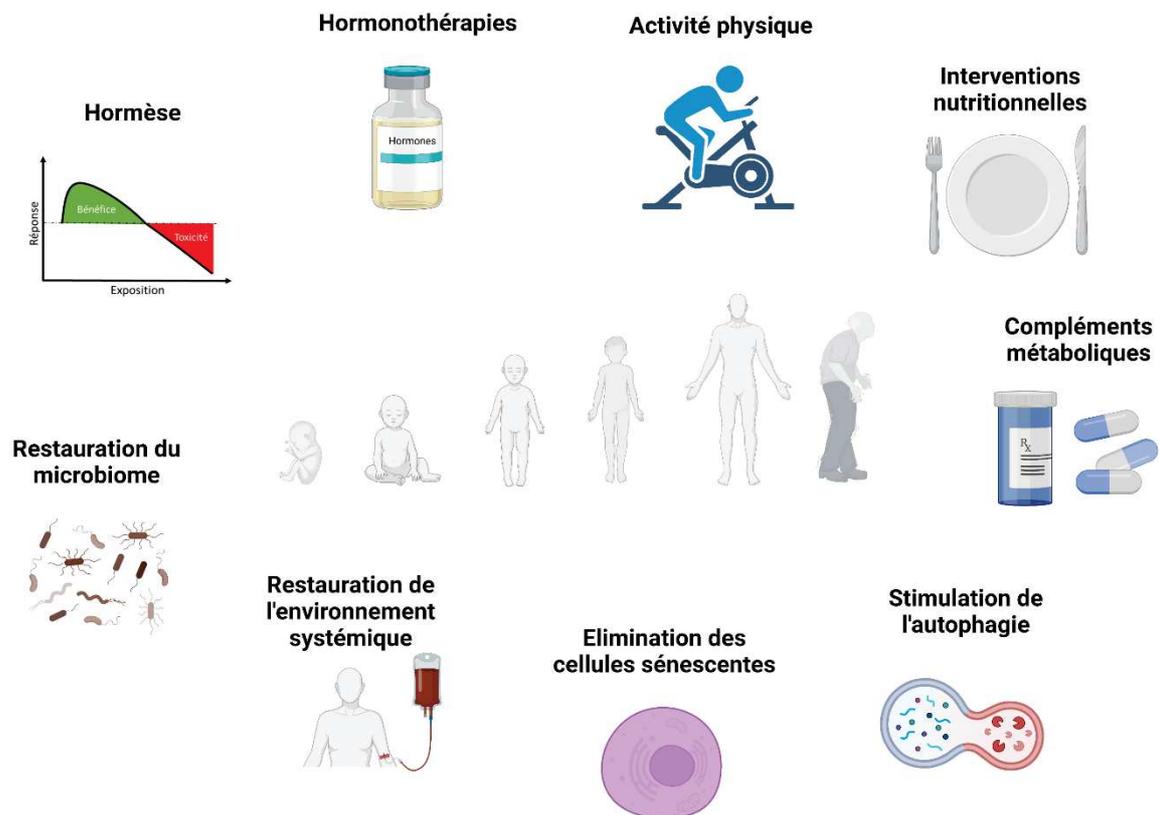


Figure 6 | Principales stratégies pour prévenir ou ralentir le vieillissement

1.2.1 Hormèse

L'hormèse se définit comme la stimulation positive des défenses physiologiques suite à l'exposition à faible dose à un agent qui serait toxique et dommageable à plus forte dose. Ce renforcement des systèmes de défense permet ensuite une meilleure protection en réponse à des expositions plus fortes. Autrement dit en citant Nietzsche « Ce qui ne me tue pas me rend plus fort ». Ces agents hormétiques peuvent être de différentes natures : chimique, biologique, ou physique. Parmi les agents hormétiques anti-âge, on compte les chocs thermiques, les irradiations (UVs, rayons γ , rayons X), les métaux lourds, les oxydants, l'acétaldéhyde, l'alcool, l'hypergravité, l'exercice, ou encore la restriction calorique (Calabrese and Baldwin, 2000; Cypser and Johnson, 2003; Hercus et al., 2003; Le Bourg et al., 2000; Masoro, 2000; Minois, 2000).

En 2008, Rattan et al. ont publié une revue de leurs travaux précédents illustrant les effets de l'hormèse induite par un choc thermique ou par des hormétines sur un modèle cellulaire humain *in vitro* (Rattan et al., 2008). Sur des cultures de cellules humaines, plus précisément des fibroblastes, des kératinocytes et une lignée immortalisée de cellules souches mésenchymateuses, les auteurs ont appliqué un stress thermique, consistant en une exposition à 41°C pendant une heure deux fois par semaine. Dans ces conditions, ils ont pu mettre en évidence des effets hormétiques. En effet, sur les cellules cutanées, ils ont observé une amélioration de l'altération de la morphologie cellulaire (Nielsen et al., 2006; Rattan, 1998), une augmentation d'environ 10% de la durée de vie répliquative des cellules (Nielsen et al., 2006), une diminution de l'accumulation des protéines endommagées par l'oxydation (Verbeke et al., 2001, 2002) et enfin une augmentation des capacités antioxydantes intracellulaires (Fonager et al., 2002). D'un point de vue mécanistique, ils attribuent ces effets à une augmentation et un meilleur maintien des niveaux de protéines de choc thermique (*heat shock proteins HSP*) et une stimulation des activités protéosomales (Fonager et al., 2002). De plus, ils ont mis en évidence une amélioration du potentiel de différenciation des kératinocytes (Berge et al., 2008) et celui des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes (Nørgaard et al., 2006).

In vivo, la méthode de stimulation hormétique la plus répandue est l'exposition à de faibles doses de radiations ionisantes. Les effets bénéfiques sur la longévité ont été démontrés chez divers organismes modèles, invertébrés et vertébrés, avec une augmentation de l'espérance de vie médiane de 10 à 30% (Calabrese and Baldwin, 2000; Cuttler et al., 2017). D'un point de vue mécanistique, les effets bénéfiques de cette stratégie hormétique reposent sur l'activation des mécanismes de réparation de l'organisme, aussi bien au niveau cellulaire que tissulaire. Alors qu'une exposition forte aux rayons ionisants induit généralement une inactivation du système immunitaire, de faibles doses semblent le stimuler (Cui et al., 2017). De même, les dommages à l'ADN causés par l'irradiation semblent stimuler les mécanismes

de défense permettant ainsi de réduire le nombre de dommages causés et de prévenir les dommages spontanés (Pollycove and Feinendegen, 2003). Un autre mécanisme pouvant supporter les effets de la réponse hormétique repose sur l'amélioration des capacités du système antioxydant endogène (Sharma et al., 2019) qui pourrait s'associer à une amélioration des capacités mitochondriales et de la mitophagie.

1.2.2 Hormonothérapie

Au cours du vieillissement, la sécrétion des hormones par les glandes pituitaires, surrénales ou les gonades diminue, entraînant une diminution globale des niveaux d'hormones circulantes (Roshan et al., 1999). Chez la femme, les effets des changements hormonaux sont particulièrement visibles lors de la ménopause. Ils peuvent conduire à des altérations physiologiques et augmentent notamment la susceptibilité à l'ostéoporose et aux risques cardiovasculaires (Kanis, 1996; Rosano et al., 2007). Les hommes sont également sujets à des changements hormonaux avec l'avancée en âge et notamment à l'andropause, une baisse des niveaux de testostérone circulante, ce qui a été associé au développement de pathologies telles que la sarcopénie, l'ostéoporose et même des troubles cardiovasculaires et cognitifs (Schwarz et al., 2011; Tan and Pu, 2001).

Des thérapies de remplacement hormonal ont donc été envisagées pour restaurer les niveaux d'hormones circulantes et ainsi prévenir et/ou retarder l'apparition de certaines pathologies associées à l'âge. L'administration d'œstrogènes, associés ou non à des progestérones, chez la femme périménopausée permet d'atténuer les symptômes climateriques de la ménopause améliorant ainsi la qualité de vie de la patiente (MacLennan et al., 2001). Une étude clinique a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre hormonothérapie et risque de fracture osseuse (Cauley et al., 2003). Cependant une étude menée par la Women's Health Initiative (WHI), une organisation américaine qui gère la collecte de données de santé à long terme spécifiquement chez les femmes, a révélé des risques accrus de maladie cardiaque coronaire sous traitement oestrogénique associé à des progestatifs (Rossouw et al., 2002). De façon similaire chez l'homme âgé, les traitements à base de testostérone ont montré des effets bénéfiques sur les fonctions cognitives, la masse musculaire et la densité minérale osseuse (Emmelot-Vonk et al., 2008; Kenny et al., 2010). Cependant, un risque aggravé de développement de cancer de la prostate est suspecté et a été confirmé dans des modèles animaux (Noble, 1977). Des thérapies à base de déhydroépiandrostérone (DHEA), le précurseur des hormones sexuelles, ont permis d'obtenir des résultats similaires sur les deux sexes (Rutkowski et al., 2014).

Outre les hormones sexuelles, les hormones de croissance sont également impactées par l'avancée en âge et tout particulièrement IGF1 pour *insulin-like growth factor 1* qui décline. Les symptômes cliniques d'une déficience en hormone de croissance peuvent s'apparenter au phénotype du vieillissement : perte

des masses grasses et maigres, altérations cutanées, cognitives et cardiaques (Merriam et al., 1997). Le traitement par supplémentation en hormones de croissance permet une amélioration de la composition corporelle avec une augmentation de la masse musculaire associée à une diminution de la masse grasse (Franco et al., 2005; Papadakis et al., 1996), sans toutefois noter d'amélioration des capacités physiques (Lange et al., 2002; Papadakis et al., 1996). Les études quant aux effets sur la densité minérale osseuse ou les métabolismes glucidique et lipidique n'ont pas été concluantes (Liu et al., 2007). *In vivo* chez des souris transgéniques mimant la maladie d'Alzheimer, le traitement par IGF1 montre des effets bénéfiques sur les marqueurs de la pathologie et une amélioration des fonctions cognitives de l'animal (Carro et al., 2006). Des observations similaires sur les fonctions cognitives ont pu être faites chez l'Homme dans un contexte non pathologique (Vitiello et al., 2006).

1.2.3 Activité physique

Le lien entre activité physique et état de santé à tout âge est largement admis. En particulier, il est largement décrit que l'inactivité physique est associée au développement de nombreuses pathologies telles que les pathologies cardiovasculaires, le diabète de type II, l'atrophie musculaire ou encore l'obésité (Booth and Lees, 2007). Au contraire, les bienfaits de l'activité physique quant aux fonctions cardiovasculaires, musculaires et neurologiques sont eux aussi bien connus (Booth et al., 2017; Gutiérrez-Martínez et al., 2018; Mandolesi et al., 2018; Ozemek et al., 2018; Wang and Holsinger, 2018).

L'activité physique entraîne une redistribution du flux sanguin des organes tels que le foie ou les reins vers les muscles squelettiques bien entendu mais aussi partiellement vers le système nerveux central (Radak et al., 2008). L'activité physique permet également de prévenir avec l'avancée en âge le déclin de la capacité d'oxygénation maximale (VO_2 max), la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), les dommages oxydatifs ainsi que la perte de fonctionnalité de divers organes (Radak et al., 2019). D'un point de vue moléculaire, l'activité physique atténuerait la détérioration liée à l'âge des systèmes de maintenance cellulaire tels que le protéasome, l'autophagie, la mitophagie ou encore les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN (Radak et al., 2019). Les fonctions mitochondriales semblent aussi être améliorées dans le cerveau, le cœur, le foie ou les reins en condition d'exercice physique (Boveris and Navarro, 2008; Marosi et al., 2012). L'activité physique a également un impact bénéfique sur les fonctions du système immunitaire au cours du vieillissement (de Araújo et al., 2013; Campbell and Turner, 2018; Sellami et al., 2018; Turner, 2016). Enfin, les bienfaits de l'exercice physique pour le maintien des fonctions cognitives avec ou sans contexte pathologique associé ont même fait l'objet d'études cliniques chez l'Homme (Gomes-Osman et al., 2018).

L'activité physique peut être considérée comme un stress hormétique, dont la pratique régulière et raisonnée a des effets bénéfiques sur la santé. A l'extrême, une activité physique trop intense augmente le risque de développement de pathologies et altère l'état de santé. En effet, en cas de surentraînement, les effets bénéfiques liés aux processus d'adaptation sont perdus, ce qui est principalement dû au fait que la récupération est incomplète.

1.2.4 Interventions nutritionnelles

Nutrition et exercice physique vont généralement de pair quand il s'agit de modifier nos habitudes pour prendre soin de notre santé. De plus, ces dernières décennies, notre façon de nous alimenter a largement évolué. Simple corrélation avec le développement des pathologies associées à l'âge ou réel lien de cause à effet, c'est ce que les études scientifiques ont essayé de déterminer.

1.2.4.1 Régimes alimentaires

Au cours d'une large étude chez l'Homme menée dans 195 pays entre 1990 et 2017, quinze facteurs de risques liés à l'alimentation pour les maladies non transmissibles ont été évalués (GBD 2017 Diet Collaborators, 2019). Parmi les facteurs de risques identifiés, on retrouve les régimes pauvres en fruits et/ou légumes, en céréales complètes, en produits laitiers, en fruits secs et graines, en acides gras oméga 3 ou polyinsaturés, en calcium ou en fibres ainsi que les régimes riches en viande rouge ou transformée, en sucre, en acides gras trans ou en sodium. Dans cette étude, ils ont étudié non seulement la mortalité liée à ces régimes alimentaires mais ont aussi calculé une espérance de vie corrigée prenant en compte le nombre d'années de vie perdues à cause d'une mortalité précoce et le nombre d'années vécues avec une incapacité, ce qu'ils appellent DALY(s) pour *disability-adjusted life years*. Une DALY correspond à la perte de l'équivalent d'une année de vie en pleine santé (World Health Organization). Ils ont dénombré 11 millions de morts soit 22% de la totalité des décès et 255 millions de DALYs soit 15% du total, attribuables aux facteurs de risques alimentaires. Le régime riche en sodium est le plus délétère suivi de près par les régimes pauvres en céréales complètes et en fruits. Les maladies cardiovasculaires sont les plus meurtrières suivies par les cancers et le diabète de type 2.

Inversement certains régimes alimentaires sont associés à une amélioration de l'état de santé et parmi eux le régime méditerranéen fait figure d'exemple (Dominguez et al., 2021). Il existe plusieurs variantes du régime méditerranéen mais globalement celui-ci se caractérise par une consommation importante de produits végétaux, une consommation modérée de produits laitiers associée à une faible consommation de viande, le tout accompagné d'un produit méditerranéen phare : l'huile d'olive

(Trichopoulou and Lagiou, 1997). Une des particularités de ce régime est son fort ratio en acides gras monoinsaturés par rapport aux acides gras saturés. Les bienfaits d'un tel régime peuvent s'expliquer, entre autres hypothèses, par le fort pouvoir antioxydant contenu dans les aliments consommés (Dominguez et al., 2021).

1.2.4.2 Jeûne intermittent ou prolongé

Le jeûne prolongé est un protocole qui consiste en un arrêt total de l'apport en nutriments par l'alimentation pour une durée moyenne allant d'une à trois semaines. Le jeûne entraîne rapidement l'indisponibilité des glucides comme source d'énergie, ce qui déclenche au niveau de l'organisme un signal d'alerte sous forme de bouleversement hormonal, impliquant notamment adrénaline, noradrénaline, glucagon et cortisol. En réponse rapide, l'organisme puise dans ses réserves protéiques pour produire son énergie via une augmentation de la protéolyse musculaire. Cette phase peut provoquer une fonte musculaire importante et s'avérer dangereuse si elle se prolonge. Puis en quelques jours, l'organisme s'adapte et met en place un nouveau système de production d'énergie plus pérenne, via la production de corps cétoniques produits par cétogenèse hépatique à partir des acides gras. Cette phase peut durer tant que les réserves en graisse sont suffisantes, on considère qu'au-delà de 80% de fonte de la masse grasse, il faut rétablir un apport alimentaire sous peine de puiser de nouveau dans les réserves protéiques. Une période de jeûne prolongé résulte en une amélioration des paramètres sanguins avec une diminution de la glycémie, des taux de cholestérol, de triglycérides et d'insuline circulants (Owen et al., 1979). On observe également une diminution globale de la dépense énergétique de l'organisme avec une respiration diminuée, une pression artérielle et un rythme cardiaque réduits, ainsi que la mise au repos du système digestif. Tous ces effets combinés permettraient de stimuler les forces curatives de l'organisme. Le jeûne intermittent repose sur l'alternance de périodes de jeûnes allant de 16 à 48 heures et de périodes de prises alimentaires, de quelques heures jusqu'à une journée entière. Comme pour le jeûne prolongé, le jeûne intermittent est suffisant pour épuiser les réserves en sucre de l'organisme et basculer vers un métabolisme reposant principalement sur les lipides (de Cabo and Mattson, 2019).

Les corps cétoniques produits à la suite d'un jeûne ne sont pas simplement des transporteurs d'énergie cellulaire du foie vers la circulation sanguine et les autres organes, ils jouent un rôle actif dans les voies de signalisation pouvant ainsi intervenir dans différents processus biologiques tels que l'expression génique, le métabolisme des lipides, ou encore les fonctions neuronales (Newman and Verdin, 2017). Ils regroupent principalement trois molécules : l'hydroxybutyrate β (BHB), l'acétoacétate et l'acétone. Le plus abondamment généré durant les jeûnes est le BHB dont les taux passent de quelques micromolaires à plusieurs centaines voire milliers selon la durée du jeûne (Cahill, 2006; Cahill et al., 1966; Robinson

and Williamson, 1980). Il a été démontré que le BHB est un inhibiteur de la famille des protéines déacétylases d'histones (HDAC), à la fois *in vitro* et *in vivo* (Shimazu et al., 2013). Or l'inhibition des protéines HDAC par le BHB entraîne une hyperacétylation globale des histones ce qui est associé à une augmentation de l'expression génique. Parmi les gènes surexprimés en présence de BHB, on retrouve Foxo3a, un régulateur de nombreux processus homéostatiques, identifié comme un des gènes clés de la longévité (Morris et al., 2015). Des protéines non histones comme par exemple NF- κ B, TP53, MYC ou encore MYOD1, sont également soumises à des processus de régulation par les HDAC (Glozak et al., 2005). Pour libérer son potentiel énergétique, le BHB est converti en acétyl-CoA dans la mitochondrie, utilisant au passage le pouvoir oxydant du NAD⁺. En comparaison, la conversion du glucose en acétyl-CoA utilise deux fois plus de NAD⁺ dont la moitié provient du stock cytoplasmique (Berg et al., 2002). Le métabolisme du BHB permet donc de préserver le stock de NAD⁺ cytoplasmique. Or au cours du vieillissement, le stock de NAD⁺ décroît ce qui pourrait être à l'origine de dysfonctionnements nucléaires et mitochondriaux conduisant à l'apparition de certaines pathologies (Imai and Guarente, 2014). Inversement, restaurer les taux de NAD⁺ par supplémentation permet d'inverser des pathologies métaboliques telles que le diabète de type II (Yoshino et al., 2011).

1.2.4.3 Restriction calorique

1.2.4.3.1 Définition et bienfaits

La restriction calorique consiste en une réduction de l'apport alimentaire, de l'ordre de 30 à 40%, tout en maintenant une nutrition correcte c'est-à-dire en garantissant un apport en nutriments, vitamines et minéraux suffisant, sans créer ni excès ni carences, afin de ne pas tomber dans la malnutrition. Les effets bénéfiques de la restriction calorique sur la longévité ont été démontrés chez de nombreuses espèces (Fontana et al., 2010b), de la levure (Jiang et al., 2000) à l'Homme, en passant par le nématode (Lakowski and Hekimi, 1998), la mouche (Mair et al., 2011), les rongeurs (Weindruch et al., 1986), ainsi que les primates (Colman et al., 2009, 2014; Mattison et al., 2017).

Les premières expériences de restriction calorique ont été réalisées chez le rat dans les années 1930 par le gérontologue C. McCay (McCay et al., 1935). Il a montré qu'une restriction calorique mise en place dès la fin du sevrage, permet d'allonger l'espérance de vie médiane et maximale des individus par rapport à un régime *ad libitum*. Aujourd'hui, on ne parle plus seulement des effets bénéfiques de la restriction calorique sur la longévité mais aussi de ses bénéfices quant à la prévention de l'apparition de nombreuses pathologies chroniques associées à l'âge. En effet, la restriction calorique chez la souris réduit le taux d'incidence des cancers, rajeunit le système immunitaire et favorise la neurogénèse et les fonctions cognitives (Brandhorst et al., 2015). Des études cliniques chez l'Homme ont également

montré, que la restriction calorique chronique induit une amélioration globale de la qualité de vie des individus (Martin et al., 2016) ainsi qu'une perte de poids principalement liée à une réduction de la masse grasse (Redman et al., 2018). A long terme, la restriction calorique induirait une « adaptation métabolique » permettant de maintenir différents paramètres physiologiques à faible niveau, tels que les taux d'insuline, la température corporelle, la dépense énergétique, ou les marqueurs d'inflammation (Redman et al., 2018).

1.2.4.3.2 Mécanismes moléculaires

Bien que les mécanismes relatifs aux effets bénéfiques de la restriction calorique ne soient pas encore parfaitement compris, trois voies de signalisation ont été identifiées comme de potentielles cibles : AMPK/SIRT6, IGF-1 et mTOR (Figure 7) (Madeo et al., 2019).

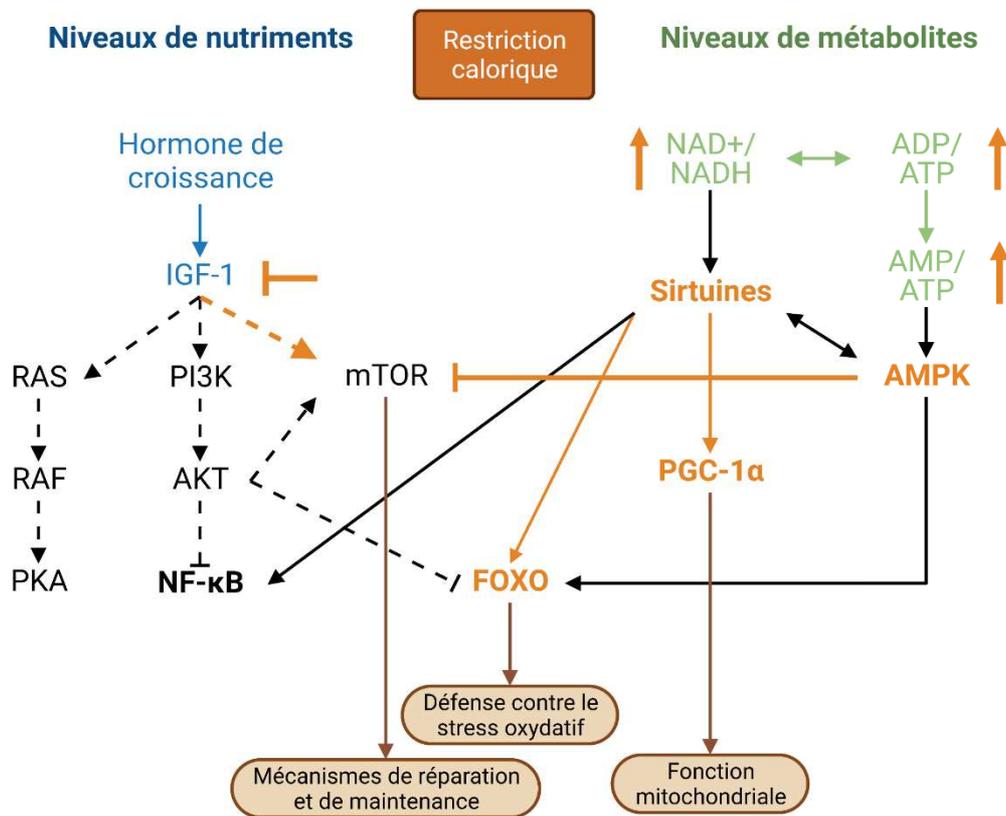


Figure 7 | Restriction calorique et voie de sensibilité aux nutriments

La réduction de l'apport énergétique induite par la restriction calorique entraîne un déséquilibre à la hausse dans les ratios AMP/ATP ce qui, en conséquence, active l'AMP protéine kinase (AMPK). L'AMPK a pour but de restaurer les niveaux en ATP, forme d'énergie cellulaire, en stimulant sa production et limitant sa consommation excessive. L'AMPK peut interagir avec trois grandes voies

métaboliques : le métabolisme du glucose, en activant la glycolyse et en inhibant la néoglucogénèse, le métabolisme des lipides, en activant la lipolyse et la β -oxydation et en inhibant la lipogénèse, et enfin le métabolisme mitochondrial en activant le métabolisme oxydatif et l'autophagie. L'activation de l'AMPK conduit donc à la formation d'acétyl-CoA et de NAD⁺, servant de cofacteurs aux sirtuines. Ces sirtuines sont impliquées dans la désacétylation des protéines des familles FOXO et PGC-1 α , respectivement impliquées dans la résistance au stress et dans la biogénèse mitochondriale. La production de corps cétoniques par la β -oxydation joue également un rôle dans l'inhibition des HDAC, impliquées dans la compaction de l'ADN.

Une des clés des interventions nutritionnelles est la façon dont les nutriments sont détectés, et c'est d'ailleurs une des neuf marques du vieillissement décrites par López-Otín (López-Otín et al., 2013). La voie de la cible de la rapamycine, mTOR chez les mammifères pour *mammalian Target Of Rapamycin*, est une voie de signalisation en cascade en réponse aux facteurs de croissance et aux nutriments. C'est principalement le complexe protéique 1 (mTORC1) qui est directement impliqué dans la réponse cellulaire aux nutriments, bien que l'implication du complexe 2 soit également décrite (Wullschleger et al., 2006). mTORC1 est un acteur de la croissance et de la prolifération cellulaires. Lorsqu'il est actif, il régule positivement diverses biosynthèses et notamment celles des nucléotides, lipides et protéines. En revanche, lorsqu'il est inhibé, les biosynthèses des macromolécules sont inhibées au profit des mécanismes de réparation et de maintenance dont l'autophagie fait partie. Dans le cadre de la restriction calorique, la déficience en nutriments entraînerait l'inhibition de la voie mTOR via l'inhibition de mTORC1 (Escobar et al., 2019).

La restriction calorique a également des effets sur la voie de signalisation IGF-1, *insulin-like growth factor 1*, dont la régulation négative entraîne la répression de l'activité mTOR. La restriction calorique aurait pour effet de diminuer les taux d'IGF1 et d'insuline circulants (Dunn et al., 1997) inhibant ainsi la voie. Cette adaptation des niveaux d'hormones circulantes suite à la restriction calorique serait bénéfique grâce à la diminution du métabolisme basal, de la prolifération cellulaire et donc du stress oxydant, et aussi grâce à ses effets anti-inflammatoires (Vitale et al., 2019).

1.2.4.3.3 Mimer les effets de la restriction calorique

Bien que la restriction calorique ait fait ses preuves quant à ses effets bénéfiques, elle reste une méthode contraignante à laquelle peu sont prêts à se soumettre, et est difficile à tenir sur le long terme. La compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents ont permis l'émergence de mimétiques de la restriction calorique. Ces composés pharmacologiques permettent d'activer les voies de signalisation similaires à celles impactées par la restriction calorique sans pour autant devoir modifier ses habitudes alimentaires.

La rapamycine et ses analogues, en tant qu'agents métaboliques influant sur la voie mTOR précédemment décrite, furent parmi les premiers composés proposés comme mimétiques de la restriction calorique. Aussi appelée sirolimus, la rapamycine aurait non seulement des propriétés prolongées mais aussi des effets bénéfiques sur les pathologies associées à l'âge, qui s'expliqueraient au niveau cellulaire par sa régulation positive de l'autophagie. Cependant, les traitements à la rapamycine peuvent conduire à des effets secondaires néfastes tels que l'insulinorésistance et du pseudo diabète (Lamming et al., 2012; Salmon, 2015). De plus, les difficultés techniques de galénique autour de la rapamycine ont accéléré l'apparition de composés analogues comme l'everolimus, le temsirolimus et le ridaforolimus.

Les polyphénols, dont les propriétés naturelles antioxydantes et anti-inflammatoires sont reconnues, constituent une seconde famille de mimétiques de la restriction calorique. Parmi eux, le resvératrol, composé présent en quantité notamment dans le raisin et ses produits dérivés, est un candidat de choix. En effet, une étude chez la souris a démontré son efficacité sur la longévité et l'état de santé global des animaux dans le cadre d'un régime high fat riche en lipides (Baur et al., 2006). L'efficacité du resvératrol reposerait sur ses capacités à induire l'autophagie et à stimuler l'activité SIRT1 (Li et al., 2017).

Enfin, la metformine, traditionnellement utilisée dans le traitement du diabète de type 2, a été envisagée comme mimétique de la restriction calorique pour son action sur le métabolisme mitochondrial et les voies de signalisation de l'insuline (Andrzejewski et al., 2014). La metformine agit directement sur la voie AMPK en induisant une augmentation des ratios AMP/ATP comme décrit dans les mécanismes de la restriction calorique. Des effets physiologiques similaires ont d'ailleurs été démontrés entre restriction calorique et metformine (Song et al., 2016).

1.2.4.3.4 Les limites de la restriction calorique

Outre les risques de malnutrition lorsque celle-ci est mal appliquée, la restriction calorique représente une contrainte alimentaire pratique et sociale. De plus, la mise en place d'une restriction calorique induit nécessairement une diminution des réserves énergétiques disponibles, plus ou moins sévère et à plus ou moins long terme. Bien qu'elle présente des bienfaits quant au vieillissement, son innocuité sur la santé humaine à long terme n'a pas été démontrée. Des effets néfastes ont d'ailleurs été décrits (Dirks and Leeuwenburgh, 2006). La restriction calorique peut en effet altérer les réponses immunitaires, la cicatrisation (Hunt et al., 2012), fragiliser les os (Villareal et al., 2006, 2016) et affecter les capacités reproductives (Sun et al., 2021).

1.2.5 Restauration des taux de métabolites clés

Comme nous l'avons vu précédemment dans la section dédiée aux interventions nutritionnelles, les métabolites jouent un rôle fondamental dans la signalisation participant aux effets anti-âge (Figure 7). Les sirtuines notamment interagissent avec un grand nombre de voies de signalisation associées à la longévité, comme la voie AMPK (Wang et al., 2011) ou la voie de signalisation insuline-IGF-1 incluant des cibles telles que la protéine kinase A (PKA) (Gerhart-Hines et al., 2011), mTOR (Armour et al., 2009; Ghosh et al., 2010; Liu et al., 2010), la famille FOXO (Mouchiroud et al., 2013) ou encore IGF1 (Longo, 2009).

Les molécules ayant un impact positif sur la production de NAD⁺, altérée au cours du vieillissement, constituent une nouvelle classe de STAC (*Sirtuin-activating compounds*) avec pour objectif la stimulation de l'ensemble des sirtuines par un composé unique. Le NAD⁺ est un métabolite essentiel intervenant dans de multiples voies métaboliques, dont la glycolyse, la β -oxydation des acides gras ou le cycle de Krebs. Chez les mammifères, il existe trois voies de synthèse du NAD⁺ selon la biodisponibilité de ses précurseurs : (i) à partir du tryptophane (Trp) via la voie de synthèse *de novo*, (ii) à partir de l'acide nicotinique (AN) via la voie de Preiss-Handler, et (iii) par la voie de sauvetage à partir du nicotiamide (NAM), du N-ribosylnicotinamide (NR) ou du nicotinamide mononucleotide (NMN). Pour restimuler la synthèse de NAD⁺, différentes stratégies thérapeutiques sont envisageables (Aman et al., 2018). Une complémentation par voie orale ou par injections intraveineuses (IV) ou intrapéritonéales (IP) des précurseurs du NAD⁺ chez les rongeurs, a montré des effets bénéfiques sur les taux de NAD⁺ dans différents organes (Aman et al., 2018) et protège contre certains déclin fonctionnels liés à l'âge (Mills et al., 2016). Dans une autre étude, Mitchell, Bernier et al. ont montré qu'une complémentation chronique en NAM chez les rongeurs a un impact positif sur l'état de santé des animaux soumis à un régime riche en gras (*high fat diet*) avec notamment une amélioration de l'homéostasie du glucose associée à une réduction de la stéatose hépatique et de l'inflammation. Ce traitement n'a pour autant pas eu d'effet sur la longévité des animaux (Mitchell et al., 2018). Pour préserver les taux de NAD⁺, il est également possible de cibler les enzymes responsables de sa dégradation comme la famille PARP (poly ADP-ribose polymérase). *In vivo*, dans des modèles murins transgéniques déplétés pour PARP1, non seulement les taux de NAD⁺ semblent régénérés mais on observe également une activité accrue des sirtuines et notamment SIRT1 et 6 (Bai et al., 2011).

1.2.6 Stimulation de l'autophagie

Le lien entre autophagie et vieillissement a été largement étudié chez des organismes modèles tels que les levures, le nématode ou encore la drosophile. L'inhibition des mécanismes d'autophagie dans ces organismes contrecarre les effets bénéfiques, notamment sur la longévité, de traitements anti-âge tels que la restriction calorique ou certains de ses mimétiques (Rubinsztein et al., 2011). Par exemple, l'amélioration de la longévité observée chez les mutants *C. elegans* *daf-2*, dont la voie de signalisation à l'insuline est altérée (Dorman et al., 1995), est inversée lorsque la bécline 1 ou Atg6 est inhibée (Meléndez et al., 2003). La démonstration de l'implication de l'autophagie dans les mécanismes de longévité est plus compliquée chez les mammifères, étant donné que dans les modèles murins, l'inhibition constitutive des gènes de l'autophagie entraîne des anomalies fœtales et néonatales létales (Mizushima and Levine, 2010).

Inversement, la surexpression des gènes de l'autophagie entraîne une amélioration de la longévité. Fernández et al. ont démontré que le complexe protéique bécline 1 – BCL2 régulateur de l'autophagie pouvait réguler la longévité chez la souris (Fernández et al., 2018). Les auteurs ont développé un modèle murin portant une mutation dans le gène *Becn1* codant pour la bécline 1, réduisant son interaction avec l'inhibiteur BCL2. Chez les animaux homozygotes mutants, le flux autophagique basal est augmenté dans les tissus musculaire, cardiaque, rénal et hépatique. En comparant les animaux homozygotes mutants à leurs congénères sauvages, ils ont mis en évidence une amélioration significative de la longévité chez les individus des deux sexes avec une survie médiane augmentée de l'ordre de 12%. L'état de santé global des animaux est également amélioré avec une diminution des phénotypes associés à l'âge tels que les changements morphologiques et les niveaux de fibrose dans les reins et le cœur ainsi que la prévalence de l'apparition spontanée de cancers. L'augmentation du flux autophagique est même efficace dans le contexte d'un vieillissement prématuré, permettant de prévenir la mortalité précoce et le retard de croissance de souris mutantes pour la protéine anti-âge *klotho* (Kuro-o et al., 1997). Dans un autre modèle murin, une mutation similaire dans le gène *Becn1* dans un contexte de modélisation de la maladie d'Alzheimer, a montré des effets bénéfiques sur l'accumulation des plaques amyloïdes, le déclin des fonctions cognitives et la survie des animaux (Rocchi et al., 2017).

Les interventions ou les traitements pharmacologiques permettant d'induire l'activation de l'autophagie sont nombreux, comme la restriction calorique et ses mimétiques ou les inhibiteurs des voies de signalisation de l'insuline, du TGF β , de l'AMPK (Hansen et al., 2018). Parmi eux, la spermidine, un polyamine naturel, permet l'extension de la longévité chez les levures, la drosophile et le nématode ainsi que chez des cellules immunitaires humaines *in vitro* (Eisenberg et al., 2009). Chez la levure âgée, le traitement à la spermidine induirait un remodelage épigénétique de l'histone H3 via une inhibition

des histones acétyltransférases, permettant ainsi la diminution du stress oxydant et des processus nécrotiques. L'uro lithine A est également un candidat intéressant. En effet, ce composé est un inducteur de mitophagie à la fois *in vitro* et *in vivo* (Ryu et al., 2016). Son administration permet l'allongement de l'espérance de vie du nématode *C. elegans* et permet également l'amélioration des fonctions musculaires dans des modèles murins.

1.2.7 Élimination des cellules sénescentes

L'accumulation de cellules sénescentes au sein des tissus au cours du vieillissement est à l'origine de divers dysfonctionnements tissulaires et peut être impliquée dans l'apparition de certaines pathologies. Les cellules sénescentes sont caractérisées par l'arrêt irréversible de leur prolifération associé à la surexpression du facteur p16INK4A. Baker et al. furent les premiers à cibler les cellules sénescentes en utilisant cette dernière propriété et à montrer que leur élimination permet de retarder l'apparition de dommages liés à l'âge (Baker et al., 2011). Ils ont développé un modèle murin transgénique, INK-ATTAC, permettant la suppression sélective des cellules p16INK4A positives par activation des caspases sous induction pharmacologique. Ce modèle murin sur fond génétique BubR1 récapitule également un syndrome progéroïde de vieillissement accéléré. Lorsque les cellules exprimant p16 sont continuellement éliminées au cours de la vie de la souris, les auteurs observent un retard d'apparition des dommages associés à l'âge dans le tissu adipeux, le muscle squelettique ainsi que les yeux. Une suppression tardive des cellules sénescentes dans un contexte tissulaire déjà endommagé permet également un ralentissement de la progression du phénotype pathologique (Baker et al., 2011). Dans un second papier, Baker et al. ont élargi leurs conclusions à d'autres tissus et observé des effets bénéfiques sur la tumorigenèse et la longévité des animaux dans un modèle de vieillissement physiologique (Baker et al., 2016).

La découverte des effets anti-âge de l'élimination sélective des cellules sénescentes dans des modèles transgéniques, a ouvert la voie au développement de molécules pharmacologiques ayant les mêmes propriétés. Ces molécules sont qualifiées de sénolytiques. Une étude bio-informatique basée sur l'analyse du transcriptome des cellules sénescentes par rapport à des cellules prolifératives a permis de mettre en évidence des voies de signalisation spécifiques aux cellules sénescentes (Zhu et al., 2015). Il est ressorti de ces analyses un réseau de voies anti-apoptotiques, incluant la tyrosine kinase, l'éphrine, la famille BCL-2/BCL-XL, P13 K/AKT, p53/p21/PAI-1&2, et HIF-1 α . Cibler pharmacologiquement l'une de ces voies permettrait l'élimination sélective des cellules sénescentes sans affecter les cellules prolifératives. C'est ainsi que sont nés les premiers sénolytiques, Dasatinib et Quercetin, respectivement un inhibiteur des tyrosines kinases et une molécule de la famille des flavonoïdes, ciblant plusieurs voies

dont BCL-2, PI3K/AKT, insuline/IGF-1 et HIF-1 α . En combinaison, Dasatinib et Quercetin (D + Q) sont plus efficaces pour induire l'apoptose de cellules sénescents adipeuses et épithéliales que pris individuellement (Zhu et al., 2015). Depuis, les effets de la Dasatinib et de la Quercetin ont été étudiés dans de nombreux modèles *in vivo*, et ont montré une amélioration dans divers contextes pathologiques associés à l'âge, tels que les symptômes progéroïdes, l'ostéoporose, la stéatose hépatique, la résistance à l'insuline, la neurodégénérescence, le dysfonctionnement vasomoteur, la fibrose pulmonaire, les maladies rénales chroniques, les altérations métaboliques ou encore le dysfonctionnement des muscles squelettiques (Chang et al., 2016; Lewis-McDougall et al., 2019; Moncsek et al., 2018; Novais et al., 2021; Ogrodnik et al., 2017; Palmer et al., 2019; Roos et al., 2016; Schafer et al., 2017; Sierra-Ramirez et al., 2020; Xu et al., 2018). L'association D + Q est passée à l'étape des essais cliniques chez l'homme pour la fibrose pulmonaire idiopathique (NCT02874989) (Wake Forest University Health Sciences, 2020), la maladie rénale chronique (NCT02848131) (Hickson, 2021a), l'intégrité du squelette (NCT04313634) (M.D., 2021), à la suite de greffes de cellules souches hématopoïétiques (NCT02652052) (Hickson, 2021b), la maladie d'Alzheimer (NCT04063124) (The University of Texas Health Science Center at San Antonio, 2021) et à la suite du cancer chez l'adulte (NCT04733534) (St. Jude Children's Research Hospital, 2021). Dasatinib et Quercetin sont loin d'être les seuls sénolytiques prometteurs, de nombreux autres candidats ont pu être identifiés (Wissler Gerdes et al., 2020).

1.2.8 Restauration de l'environnement systémique

Depuis des siècles, les croyances populaires ont toujours prêté au sang des propriétés et des pouvoirs hors normes. Que ce soit par immersion dans des bains, par ingestion, ou encore par transfusion, les traitements utilisant des produits sanguins étaient courants bien avant le XXe siècle (Learoyd, 2012).

1.2.8.1 La parabiose

C'est en 2005 que la démonstration scientifique que le sang peut rajeunir les organes a été publiée (Conboy et al., 2005). Conboy et al. ont remis au goût du jour une technique développée dans la seconde moitié du XIXe siècle par le physiologiste Paul Bert. Cette technique appelée parabiose, qui signifie littéralement « vivre à côté de », consiste en la greffe chirurgicale de deux individus permettant d'établir un système circulatoire commun qui autorise les échanges physiologiques entre les deux organismes par voie sanguine. On distingue la parabiose hétérochronique associant deux individus d'âges différents (jeune-vieux) de la parabiose isochronique associant deux individus de même âge (jeune-jeune ou vieux-vieux), cette dernière servant généralement de contrôle. Les premières expériences de parabiose dans le contexte de l'étude du vieillissement ont été réalisées par McCay et al. (McCay et al.,

1935). Ils ont greffé un rat âgé avec un rat jeune afin de déterminer si l'échange constant de sang entre deux animaux pouvait influencer sur les pathologies chroniques associées à l'âge. Dans leur étude de 2005, Conboy et al. ont examiné l'influence des facteurs systémiques sur les populations de cellules souches musculaires et hépatiques dont le déclin avec l'avancée en âge est associé à une perte des capacités régénératrices de ces deux tissus. Pour ce faire, ils ont mis en place un modèle de parabiose hétérochronique associant une souris jeune et une souris âgée permettant ainsi l'exposition de la souris âgée aux facteurs présents dans le sérum de la souris jeune. Ils ont ainsi pu démontrer que l'exposition au sérum jeune active chez la souris âgée la prolifération des cellules satellites musculaires initiée par la réactivation de la voie de signalisation Notch et l'expression accrue du ligand Delta. Au niveau hépatique, la parabiose hétérochronique induit également l'activation de la prolifération des hépatocytes, soutenue par une inhibition de la formation du complexe protéique Brm-cEBP- α . Ce complexe avait été précédemment décrit comme impliqué dans l'inhibition de la transcription de E2F conduisant à l'arrêt de prolifération des hépatocytes (Iakova et al., 2003). Ces résultats confirment l'existence de facteurs systémiques capables de moduler l'activité cellulaire de certains progéniteurs dans un contexte de vieillissement, et qui sont eux-mêmes soumis au processus de vieillissement.

Depuis, de nombreuses études ont permis d'étendre les bienfaits anti-âge de la parabiose à d'autres organes tels que le système nerveux (Castellano et al., 2016; Katsimpardi et al., 2014; Lee et al., 2021; Villeda et al., 2014), le système immunitaire (Yang et al., 2016a), le système squelettique (Alman and Baht, 2021; Li et al., 2021), le système cardiovasculaire (Kiss et al., 2020; Loffredo et al., 2013) ou le système musculaire (Lu et al., 2020a; Sinha et al., 2014a). Elle aurait même des effets au niveau cellulaire sur les cellules sénescentes (Yousefzadeh et al., 2020) ou encore sur la structure et les fonctions mitochondriales (Gonzalez-Armenta et al., 2021).

1.2.8.2 Transfusions de dérivés sanguins

La technique chirurgicale de la parabiose pose de nombreux questionnements d'un point de vue éthique concernant la chirurgie elle-même et les conditions de vie des animaux greffés. De plus, bien que la parabiose hétérochronique soit bénéfique pour l'individu âgé, des effets délétères se répercutent sur l'individu jeune qui ne partage pas seulement ses facteurs juvéniles mais qui reçoit aussi les facteurs circulants séniles (Rebo et al., 2016). Enfin, il est évident que cette stratégie thérapeutique n'est pas applicable en l'état à l'Homme. C'est pourquoi, de nombreuses équipes se sont intéressées aux transfusions de dérivés sanguins juvéniles pour mimer les effets d'une circulation sanguine commune propre à la parabiose hétérochronique.

Le potentiel de rajeunissement du plasma d'individus jeunes sur des individus âgés a été exploré dans des modèles murins *in vivo* et il s'est avéré que ces expériences permettaient d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus en condition de parabiose hétérochronique. Par exemple, des injections intraveineuses de plasma de souris jeunes dans des souris receveuses âgées améliorent l'expression des marqueurs de la plasticité synaptique et augmentent de façon persistante la force synaptique (PLT), et permettent également une amélioration des fonctions cognitives liées à la mémoire et au comportement anxieux (Villeda et al., 2014). Chez le rat, l'injection de plasma jeune permet d'améliorer plusieurs paramètres hépatiques affectés par l'âge et notamment le potentiel de régénération (Liu et al., 2018a). Les essais sont même allés jusqu'à tester les effets du plasma humain dans des modèles de souris immunodéficientes âgées. A partir de plasma de cordon ombilical, administré par injection intraveineuse à des souris âgées, les auteurs ont pu mettre en évidence une revitalisation de l'hippocampe associée à une amélioration des fonctions cognitives des animaux (Castellano et al., 2017), démontrant ainsi les propriétés rajeunissantes des facteurs circulants, indépendamment de l'espèce. Enfin, dans un modèle murin récapitulant le phénotype de la maladie d'Alzheimer, c'est-à-dire présentant des lésions amyloïdes, l'exposition à du plasma juvénile, par parabiose ou par injections répétées, permet l'amélioration de l'intégrité des synapses (Middeldorp et al., 2016). Une autre étude utilisant du sérum de cordon ombilical a également montré son efficacité quant au développement de la pathologie dans des modèles murins récapitulant la maladie d'Alzheimer (Habib et al., 2018). Une étude clinique chez l'Homme, visant à évaluer les effets d'un traitement par transfusion de plasma jeune à des individus souffrants de la maladie d'Alzheimer, est d'ores et déjà en cours (NCT03765762) (Alkahest, Inc., 2021), de même que dans le cadre de la prise en charge de la maladie de Parkinson (NCT03713957) (Alkahest, Inc., 2020).

Bien que les injections de plasmas juvéniles dans des hôtes âgés permettent l'amélioration d'un certain nombre de fonctions tissulaires, ces protocoles n'ont pas démontré d'effet sur la longévité (Shytikov et al., 2014).

1.2.8.3 Identification de facteurs de jouvence circulants

L'utilisation des produits sanguins et de leurs dérivés en thérapie reste complexe, tant sur le plan éthique que sur le plan pratique, quant à l'accessibilité et la disponibilité des ressources biologiques, leur qualité ainsi que leur variabilité biologique et leur potentielle immunogénicité.

Des études se sont donc concentrées sur l'identification de ces facteurs circulants aux propriétés rajeunissantes afin de pouvoir les utiliser indépendamment. À l'aide de techniques de métabolomique et de protéomique, il a été possible de quantifier les contenus moléculaires de plasma à différents âges

et ainsi d'identifier les changements s'opérant au cours du vieillissement (Chaleckis et al., 2016; Darst et al., 2019; Lehallier et al., 2019; Menni et al., 2013; Tanaka et al., 2018). Les différentes molécules identifiées, leur nature biologique ainsi que leurs propriétés anti-âges sont récapitulées dans le Tableau 2. Pour n'en citer qu'une, GDF11 ou facteur de différenciation de croissance 11, est le médiateur de nombreux processus physiologiques incluant le développement embryonnaire et l'homéostasie. En effet, GDF11 régule la régionalisation antéro-postérieure squelettique (McPherron et al., 1999; Oh et al., 2002), l'organogenèse rénale (Esquela and Lee, 2003), la neurogenèse de la moelle épinière (Shi and Liu, 2011), la différenciation pancréatique des cellules β (Harmon et al., 2004) ou encore la formation de la rétine (Kim et al., 2005). De plus, GDF11 est également impliqué dans les processus d'ostéogenèse (Liu et al., 2016), de myogenèse (Egerman et al., 2015; Sinha et al., 2014b), de neurogenèse (Katsimpardi et al., 2014; Wu et al., 2003) et d'érythropoïèse (Dussiot et al., 2014). Ses effets anti-âges furent contestés notamment à cause de la difficulté à le doser précisément de par sa grande similarité avec la myostatine (GDF8). Néanmoins, ses propriétés rajeunissantes cardiaques (Loffredo et al., 2013), musculaires (Sinha et al., 2014b) et neurologiques (Katsimpardi et al., 2014) font de lui un excellent candidat comme facteur de jouvence.

Tableau 2 | Récapitulatif des facteurs circulants identifiés aux propriétés rajeunissantes

Facteur circulant	Nature	Evolution avec l' âge	Propriétés		Référence(s) associée(s)
<i>Apeline</i>	Hormone	↙	Anti-âge	<ul style="list-style-type: none"> • Amélioration de la longévité • Réversion de la sarcopénie 	(Rai et al., 2017) (Vinel et al., 2018)
<i>Cadhérine 13</i>	Protéine d' adhésion cellulaire	↙	Anti-âge	<ul style="list-style-type: none"> • Prévention de la perte osseuse 	(Yang et al., 2020)
<i>CCL11</i>	Cytokine	↘	Pro-âge	<ul style="list-style-type: none"> • Réduction de la plasticité des synapses • Altération des fonctions cognitives 	(Villeda et al., 2011)
<i>GDF11</i>	Cytokine	↙	Anti-âge	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de l' hypertrophie cardiaque • Amélioration de la régénération musculaire <ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de la neurogénèse • Amélioration de la régénération cutanée 	(Katsimpardi et al., 2014) (Loffredo et al., 2013) (Sinha et al., 2014b) (Rochette et al., 2020)
<i>GHRH</i>	Hormone	↙	Anti-âge	<ul style="list-style-type: none"> • Amélioration des fonctions cognitives 	(Baker et al., 2012) (Thornton et al., 2000)
<i>Microglobuline β2</i>	Protéine du complexe d' histocompatibilité	↘	Pro-âge	<ul style="list-style-type: none"> • Détérioration des fonctions cognitives <ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de la neurogénèse 	(Smith et al., 2015) (Villeda et al., 2011)
<i>NAMPT</i>	Enzyme métabolique	↙	Anti-âge	<ul style="list-style-type: none"> • Amélioration de la longévité • Amélioration des fonctions motrices 	(Yoshida et al., 2019)
<i>Ocytocine</i>	Hormone	↙	Anti-âge	<ul style="list-style-type: none"> • Amélioration de la régénération musculaire 	(Elabd et al., 2014)
<i>Ostéocalcine</i>	Hormone	↙	Anti-âge	<ul style="list-style-type: none"> • Amélioration de la mémoire • Diminution de l' anxiété 	(Khrimian et al., 2017)
<i>SPARCL1 & THBS4</i>	Protéine de la matrice extracellulaire	↙	Anti-âge	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation de l' activité synaptique 	(Gan and Südhof, 2019)
<i>TIMP2</i>	Inhibiteur de protéase	↙	Anti-âge	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation de la plasticité des synapses 	(Castellano et al., 2017)

1.2.9 Restauration du microbiome intestinal

Le microbiome intestinal joue un rôle important dans les fonctions métaboliques et immunologiques de son hôte. Ces interactions microbiome-hôte ont été conservées à travers l'évolution et se retrouvent aujourd'hui aussi bien chez le nématode (Cabreiro and Gems, 2013) que chez l'Homme (Leulier et al., 2017; Thaiss et al., 2016). Chez les mammifères, le microbiome intestinal est impliqué dans la digestion, la satiété, l'immunité, et la production de métabolites tels que les vitamines, les acides gras à chaîne courte ou encore les acides biliaires secondaires (Breton et al., 2016; Ríos-Covián et al., 2016; Wahlström et al., 2016). Le microbiome joue également un rôle à l'échelle de l'organisme puisqu'il est capable de communiquer avec d'autres organes et participe ainsi au maintien de la physiologie de l'hôte (Schroeder and Bäckhed, 2016). Ainsi, son altération est associée à de nombreux contextes pathologiques comme par exemple l'obésité, le diabète de type II, les maladies cardiovasculaires, la stéatose hépatique non alcoolique ou encore les cancers (Koeth et al., 2013; Loomba et al., 2017; Qin et al., 2012; Zitvogel et al., 2017).

Des études se sont intéressées à l'analyse métagénomique de la flore intestinale dans les phénomènes de longévité extrême et en particulier chez les Hommes centenaires (Biagi et al., 2016; Rampelli et al., 2013). L'abondance du microbiote a tendance à s'appauvrir avec l'avancée en âge et est associée à une augmentation d'espèces sous-dominantes. Rampelli et al. ont démontré qu'au cours du vieillissement, le microbiome humain s'appauvrit en gènes microbiens impliqués dans la production des acides gras à chaîne courte, avec une diminution globale du potentiel saccharolytique, alors que les fonctions protéolytiques s'enrichissent (Rampelli et al., 2013). Ces résultats suggèrent une modification fonctionnelle du microbiote qui s'associe à un enrichissement spécifique en bactéries pathogènes, en particulier des bactéries opportunistes aux propriétés pro-inflammatoires. Ce phénomène semble contrecarrée chez les centenaires (Rampelli et al., 2013). Chez les centenaires, on peut également observer un réarrangement du microbiote avec une enrichissement en bactéries associées à la santé telles que *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, et *Christensenellaceae* (Biagi et al., 2016). L'étude ne permet pas de dire si chez les individus centenaires, cette population bactérienne est déjà présente à des âges précoces ou si elle résulte d'une adaptation progressive au cours de la vie. Quoiqu'il en soit, ces études ont permis de mettre en évidence l'existence d'un remodelage du microbiote intestinal au cours du vieillissement corrélant, si ce n'est participant activement, aux phénomènes de longévité extrême chez l'Homme.

Il existe différents moyens thérapeutiques pour influencer la composition du microbiote intestinal, qui comprennent la prise de probiotiques ou de façon plus extrême les transplantations fécales. La prise de probiotiques par les personnes âgées, en particulier ceux contenant *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* aurait

des propriétés anti-inflammatoires (Eloe-Fadrosh et al., 2015; Pérez Martínez et al., 2014; Rondanelli et al., 2015). La transplantation fécale, quant à elle, permet de restaurer l'écosystème intestinal d'un receveur par transfert direct dans le tractus gastrointestinal d'un filtrat fécal issu d'un donneur sain (Young and Hayden, 2016). En 2019, Bárcena et al. ont appliqué cette procédure dans des modèles murins progéroïdes afin d'investiguer les effets d'une transplantation fécale d'un donneur jeune dans un receveur âgé sur la longévité et l'état de santé des animaux (Bárcena et al., 2019). Ils ont utilisé des souris de génotypes *Lmna*^{G609G/G609G} et *Zmpste24*^{-/-} récapitulant le syndrome humain de la Progéria, qui mime un vieillissement accéléré. Ils ont mis en évidence chez ces animaux une dysbiose du microbiote intestinal, dont une augmentation de l'abondance des protéobactéries et des cyanobactéries ainsi qu'une diminution de l'abondance des bactéries *Verrucomicrobia*. Ces résultats corroborent ceux obtenus à partir de prélèvements de patients humains atteints de Progéria et dont le phénotype semble inversé chez les patients centenaires. La transplantation de matière fécale d'une souris donneuse sauvage dans ces deux lignées progéroïdes montre des effets bénéfiques sur la longévité des animaux avec un allongement de 10 à 15% pour les animaux transplantés, associés à des effets sur l'état de santé global des animaux qui se traduisent par le maintien de la masse corporelle, l'amélioration de la température corporelle, une amélioration de la fibrose rénale et des paramètres de l'homéostasie du glucose, ainsi qu'une diminution des marqueurs pro-inflammatoires intestinaux. Ils ont également montré que la seule administration par gavage oral de *A. muciniphila*, une bactérie *Verrucomicrobia* permettait d'obtenir un phénotype similaire à celui obtenu après transplantation fécale complète. Les auteurs suggèrent grâce à des analyses métabolomiques que le phénotype rajeuni observé pourrait résulter d'une restauration d'un microbiome sain juvénile, passant par une réactivation de la synthèse des acides biliaires secondaires.

Ces travaux ont ouvert la voie à la reconnaissance d'un lien entre microbiome intestinal et vieillissement, sur lequel des interventions sont possibles et efficaces dans un contexte de stratégie anti-âge. Récemment, cette stratégie a fait les preuves de son efficacité dans le contexte des altérations liées au vieillissement du système nerveux (Boehme et al., 2021)

1.3 LA REPROGRAMMATION COMME STRATEGIE DE RAJEUNISSEMENT

Ce chapitre reprend principalement les idées développées dans la revue que j'ai co-signée avec le Dr. Quentin Alle, publiée en 2021 dans *l'International Journal of Molecular Sciences* à l'occasion d'un numéro spécial sur le vieillissement des cellules souches (Alle et al., 2021a). La version originale est jointe en Annexe 1.

1.3.1 Cellules souches et potentiel cellulaire

Les cellules souches se caractérisent par leur capacité d'autorenouvellement associée à leur potentiel de différenciation. C'est d'ailleurs ce dernier paramètre qui distingue les différents types de cellules souches.

Au cours de l'embryogénèse, la cellule œuf issue de la rencontre des gamètes est à l'origine d'un organisme pluricellulaire constitué de différents types cellulaires spécialisés. Pour passer de l'un à l'autre, le zygote évolue progressivement au cours des divisions cellulaires et perd progressivement son potentiel de différenciation « infini », autrement dit sa totipotence, afin de se différencier et se spécialiser. Les cellules souches embryonnaires (ESCs) que l'on retrouve au niveau de la masse interne du blastocyste sont dites pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se différencier dans n'importe quel type cellulaire parmi les trois feuillets embryonnaires à savoir ectoderme, mésoderme et endoderme, hors annexes embryonnaires contrairement aux cellules totipotentes. Ce potentiel cellulaire n'est pas complètement perdu à l'âge adulte puisqu'on retrouve de nombreuses cellules souches dans certains tissus. Cependant, les cellules souches adultes ont un potentiel cellulaire moindre et se définissent plutôt comme des cellules multipotentes voire unipotentes, c'est-à-dire capable de se différencier respectivement dans un nombre limité de types cellulaires d'un même feuillet embryonnaire voire un seul type.

Conrad Waddington fût un des premiers dans les années 1950 à tenter d'expliquer les mécanismes génétiques du développement et en particulier comment des cellules somatiques d'origines tissulaires différentes peuvent présenter des phénotypes différents alors même que leur patrimoine génétique est identique (Waddington, 1942). Waddington est à l'origine du terme « épigénétique » dont la signification originelle était la contraction des termes épigénèse et génétique, ce qui n'est plus exactement le sens donné à la discipline épigénétique actuelle. Dans un second ouvrage, il définit ce qu'il appelle le paysage épigénétique (Waddington, 1958). Il visualise le développement comme un paysage vallonné dessiné par les gènes, dans lequel évoluent les cellules embryonnaires. Chaque vallée

représente un destin cellulaire spécifique dans laquelle s'engagent les cellules en différenciation (Figure 8). Au fur et à mesure de leur descente dans une vallée donnée, elles acquièrent un phénotype spécifique, et un état définitif stabilisé que l'on pensait alors irréversible (Weismann, 1915).

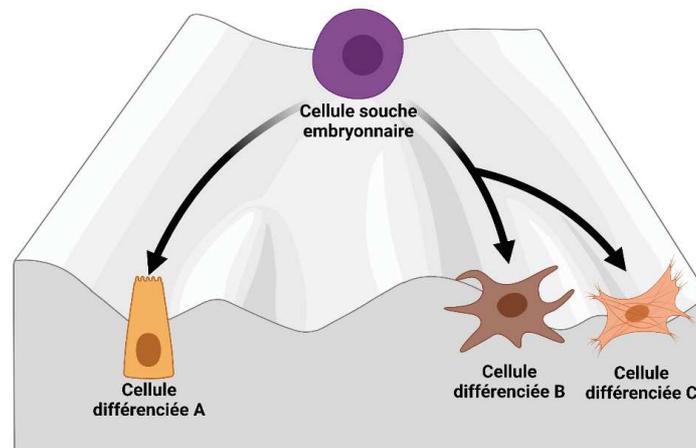


Figure 8 | Représentation du développement embryonnaire à travers le paysage épigénétique selon Waddington

Les avancées quant à l'étude et la compréhension du génome, qui se sont déroulées au cours des décennies suivantes, ont permis de réviser cette théorie du développement. En effet, au cours des processus de différenciation, les cellules ne perdent pas en information génétique pour acquérir leur spécialisation. En revanche, des mécanismes de régulation de l'expression du génome sont mis en place progressivement permettant d'acquérir un phénotype spécifique dans un environnement donné. Ce rôle est assumé principalement par les facteurs de transcription (Lambert et al., 2018), les ARNs non codants, les modifications épigénétiques de l'ADN et des histones (Bernstein et al., 2007; Jenuwein and Allis, 2001), et la conformation tridimensionnelle du génome (Stadhouders et al., 2019). La réversibilité du destin cellulaire a également pu être mise en évidence grâce aux travaux sur la reprogrammation cellulaire.

1.3.2 Méthodes de reprogrammation cellulaire

1.3.2.1 Reprogrammation cellulaire par transfert nucléaire

Les premières expériences de transfert nucléaire eurent lieu dans les années 1950 par Briggs et King (Briggs and King, 1952). Dans un modèle amphibien, ils ont réimplanté des noyaux de cellules embryonnaires issues d'un blastocyste dans un œuf énucléé. Ils ont montré qu'il était ainsi possible de générer des individus sains mais leurs rendements étaient très variables.

Quelques années plus tard, Sir John Gurdon retenta l'expérience mais en réimplantant cette fois-ci des noyaux de cellules somatiques dans un œuf énucléé. Il réussit ainsi à cloner et obtenir des individus viables et sexuellement matures (Gurdon, 1962; Gurdon et al., 1958). Ces résultats permirent de démontrer pour la première fois qu'une cellule différenciée contenait bien toute l'information génétique nécessaire au développement au même titre qu'une cellule souche embryonnaire, et qu'une fois dans un environnement propice elle était capable d'exprimer ce patrimoine génétique. Ces découvertes ont ouvert la voie au clonage reproductif d'une vingtaine d'autres espèces de mammifères, à commencer par la fameuse brebis « Dolly » (Wilmut et al., 1997) et jusqu'à plus récemment chez des primates non-humains (Liu et al., 2018b).

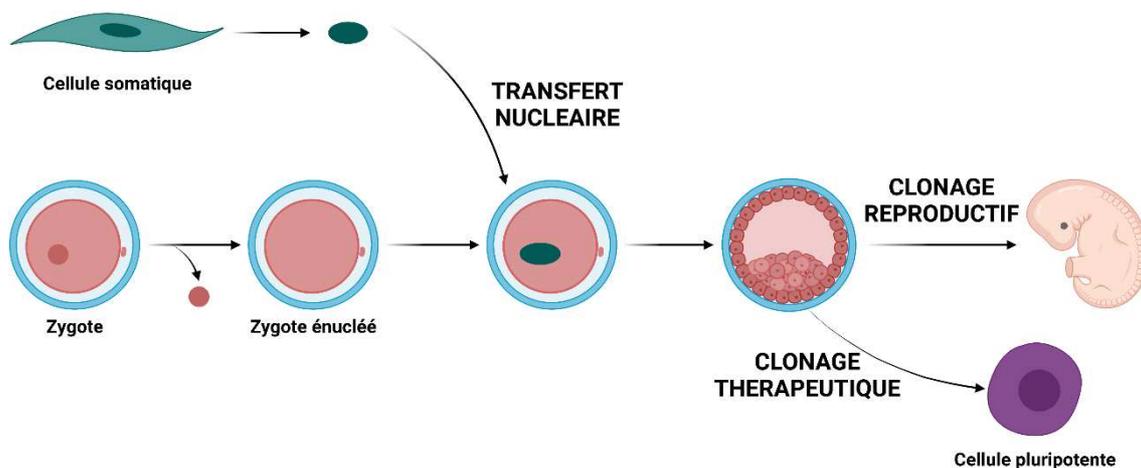


Figure 9 | Principe de la reprogrammation par transfert nucléaire

La pratique du clonage reproductif est interdite pour des raisons éthiques évidentes chez l'Homme. En revanche, la reprogrammation par transfert nucléaire peut être pratiquée dans un cadre thérapeutique puisqu'elle permet de générer des cellules souches pluripotentes, qui peuvent être prélevées dans la masse interne du blastocyste, issu du transfert (Figure 9). Cette technologie ouvre la voie de la thérapie cellulaire. La pratique a été un succès pour la première fois en 2013 (Tachibana et al., 2013) puis réitérée

dans les années suivantes (Chung et al., 2014, 2015; Yamada et al., 2014). L'inconvénient majeur de cette technique de reprogrammation est la nécessité d'un œuf fécondé énucléé, qui soulève de nombreux questionnements éthiques relatifs à l'utilisation des embryons humains.

1.3.2.2 *Transdifférenciation*

La transdifférenciation consiste en le passage d'une cellule d'un état différencié vers un autre état différencié sans pour autant passer par un état de pluripotence. Les premières preuves de cette nouvelle forme de plasticité cellulaire ont été apportées à la fin des années 1980 (Graf and Enver, 2009). L'expression forcée de facteurs de transcription permet ce changement d'identité. Chez la drosophile, l'expression ectopique du gène *Antp* modifie la morphologie avec le développement de pattes à la place des antennes (Schneuwly et al., 1987). *In vitro*, dans un modèle murin, l'expression ectopique du facteur de transcription MYOD permet la conversion de fibroblastes vers des lignées myogéniques (Davis et al., 1987).

Depuis ces premiers travaux de nombreuses études ont permis d'illustrer la plasticité des cellules somatiques à se transdifférencier. La possibilité de conversion directe de fibroblastes en cardiomyocytes (Ieda et al., 2010; Inagawa and Ieda, 2013; Qian et al., 2012), en astrocytes (Caiazzo et al., 2015), en neurones (Vierbuchen et al., 2010), en progéniteurs neuraux (Ring et al., 2012) ou encore en muscles squelettiques (Boullaraoui et al., 2018), ouvre la porte à de nouvelles approches pour les biothérapies.

1.3.2.3 *Cellules souches pluripotentes induites iPSCs*

La découverte de l'impact des facteurs de transcription sur la plasticité cellulaire a suggéré l'idée qu'il serait possible de reprogrammer directement et totalement des cellules somatiques en utilisant un cocktail de facteurs adaptés. C'est en 2006 que cette hypothèse a été validée chez la souris (Takahashi and Yamanaka, 2006) puis confirmée chez l'Homme en 2007 par la même équipe (Takahashi et al., 2007). Ils ont testé un cocktail de vingt-quatre facteurs de transcription parmi ceux jouant un rôle clé dans le maintien de l'identité des cellules souches embryonnaires. Pris individuellement et en combinaison, sur des fibroblastes *in vitro*, ils ont observé leur capacité à générer des colonies semblables à celles des cultures de cellules souches embryonnaires. Pris collectivement, les vingt-quatre facteurs de transcription étudiés étaient capables de générer des cellules au phénotype similaire aux ESCs. En testant des combinaisons avec un nombre réduit de facteurs, ils ont pu identifier quatre facteurs de transcription suffisant pour obtenir des effets identiques. Ces quatre facteurs ont aujourd'hui été rebaptisés facteurs de Yamanaka ou facteurs de reprogrammation ou encore OSKM pour OCT4, SOX2, KLF4 et C-MYC.

- OCT4 ou *Octamer-binding transcription factor 4* aussi connu sous le nom de POU5F1, est un facteur de transcription de la famille POU (Pit, Oct, Unc). C'est un facteur essentiel du développement embryonnaire précoce chez les mammifères (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000).
- SOX2 ou *Sex determining region Y-box 2* est un facteur de transcription de la famille des SOX appartenant à la superfamille des gènes caractérisés par une séquence homologue appelée HMG-box (*High Mobility Group*). Il est également impliqué lors de l'embryogenèse, notamment dans la neurogenèse et la formation des trois feuilletts embryonnaires (Avilion et al., 2003).
- KLF4 ou *Kruppel-like factor 4* est une protéine en doigt de zinc jouant le rôle de facteur de transcription. Elle intervient dans le processus de développement de la fonction barrière de la peau. Elle serait également impliquée dans le contrôle de la transition G1-S en réponse à des dommages à l'ADN via une médiation du gène tumeur suppresseur p53 (Li et al., 2005).
- C-MYC ou *avian myelocytomatosis viral oncogene cellular homolog* est un proto-oncogène codant pour une phosphoprotéine nucléaire impliquée dans les processus de progression du cycle cellulaire, d'apoptose et de transformation cellulaire (Cartwright et al., 2005)

Les cellules obtenues après expression forcée des quatre facteurs de reprogrammation ont été caractérisées. Non seulement, elles montrent les caractéristiques morphologiques des cellules souches embryonnaires mais elles possèdent leurs propriétés prolifératives et expriment également les marqueurs cellulaires de pluripotence tels que NANOG, le marqueur de surface murin SSEA-1 ou humain SSEA-3/4 et présente une activité phosphatase. Chez la souris, lorsque ces cellules sont réinjectées dans un blastocyste tétraploïde, il s'agit alors d'une complémentation tétraploïde, elles permettent un développement embryonnaire normal, uniquement à partir des cellules injectées, et conduisent à la formation d'un organisme entier viable, preuve indiscutable de leur pluripotence. Lorsqu'elles sont injectées en sous-cutané chez des souris nudes immunodéficientes, elles conduisent à la formation de tératomes. Puisqu'elles présentent toutes les caractéristiques des cellules souches embryonnaires, les cellules obtenues après induction des quatre facteurs de reprogrammation dans des cellules somatiques sont dites cellules souches pluripotentes induites (iPSCs).

En 2007, une autre équipe menée par James A. Thomson a obtenu des résultats similaires avec un autre cocktail de quatre facteurs comprenant OCT4, SOX2, NANOG et LIN28 (Yu et al., 2007). NANOG est un facteur de transcription impliqué dans le maintien de l'état pluripotent (Pan and Thomson, 2007). LIN28 code pour une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans le maintien de la pluripotence et la transition vers la différenciation via la régulation de la biosynthèse de microARN (Tzialikas and Romer-Seibert, 2015).

Dès la découverte de la technologie des iPSCs, les questions autour de leurs applications cliniques ont été abordées. L'un des désavantages majeurs de la génération d'iPSCs selon la méthode utilisée par Yamanaka est l'utilisation de rétrovirus comme vecteurs des facteurs de reprogrammation. Or ces rétrovirus sont intégratifs, c'est-à-dire qu'ils s'intègrent au génome de l'hôte, ce qui soulève le risque d'une perturbation de l'activité des gènes avoisinants le site d'insertion et celui d'une potentielle réactivation non contrôlée des facteurs de reprogrammation. De nombreuses méthodes alternatives non intégratives ont été développées depuis, utilisant des adénovirus (Stadtfeld et al., 2008), des plasmides (Jia et al., 2010; Okita et al., 2008, 2011; Yu et al., 2009), des transposons (Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009; Yusa et al., 2009), des virus Sendai (Fusaki et al., 2009; Nishimura et al., 2011), des ARNm synthétiques (Warren et al., 2010; Yakubov et al., 2010), des micros ARN (Anokye-Danso et al., 2011; Miyoshi et al., 2011) ou encore des protéines recombinantes (Kim et al., 2009; Zhou et al., 2009).

1.3.2.4 Nouvelles méthodes de reprogrammation cellulaire

Bien que la découverte de la technologie des iPSCs fût une avancée importante, les problématiques liées à l'innocuité des manipulations génétiques et les faibles rendements de reprogrammation, ont ouvert la voie au développement et à l'utilisation de petites molécules en complément ou en remplacement d'un ou plusieurs facteurs de reprogrammation. Ces molécules de moins de 900Da présentent les particularités d'être perméables aux membranes cellulaires et donc de ne pas nécessiter de vecteur, de ne pas être immunogènes, ainsi que les avantages techniques d'être facilement synthétisées, stockées et standardisées. Les mécanismes d'action des petites molécules sur la reprogrammation sont multiples, certaines modulent des voies de signalisation telles que les voies TGF- β ou Wnt, d'autres vont impacter le remodelage de la chromatine, ou encore certaines sont des activateurs des facteurs de transcription endogènes (Jin and Jie, 2019).

La voie de signalisation TGF- β joue un rôle primordial dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) observée au cours du développement embryonnaire (Thiery et al., 2009). Inversement, lors de la reprogrammation une transition mésenchymo-épithéliale (MET) s'opère. Les inhibiteurs de la voie TGF- β facilitent donc la transition MET vers la pluripotence. Par exemple, les inhibiteurs des récepteurs TGF- β ont montré leur efficacité à optimiser la reprogrammation et même à remplacer SOX2 dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) (Ichida et al., 2009; Maherali and Hochedlinger, 2009). La voie de signalisation Wnt quant à elle, est impliquée dans la maintenance de la pluripotence par son action inhibitrice sur le facteur TCF3 (Niwa, 2011). Les composés activateurs de cette voie tels que les inhibiteurs de GSK3, ont montré leurs effets bénéfiques dans un contexte de reprogrammation OK et OSM sur des MEFs (Li et al., 2009b; Lyssiotis et al., 2009).

Moduler les processus épigénétiques qui accompagnent la reprogrammation permet d'en augmenter l'efficacité. Les composés interagissant avec les enzymes régulant les processus épigénétiques tels que les histones déacétylases (HDAC), les histones méthyltransférases (HMT), les histones déméthylases (HDM) ou encore les méthyltransférases d'ADN (DNMT) sont donc d'excellents candidats à la catégorie des petites molécules. Par exemple, le composé BIX-01294, un inhibiteur de l'histone méthyltransférase G9a, permet d'assurer une reprogrammation OCT4-KLF4 de MEFs ou de progéniteurs neuraux en iPSCs aussi efficacement qu'une reprogrammation OSKM (Shi et al., 2008a, 2008b). Bien qu'avec une efficacité moindre, BIX-01294 permet également une reprogrammation trois facteurs sans OCT4 (Shi et al., 2008a). Les inhibiteurs d'HDAC tels que l'acide subérylanilide hydroxamique (SAHA), la trichostatine A (TSA) ou encore l'acide valproïque (VPA) ont montré leur efficacité à améliorer la reprogrammation (Huangfu et al., 2008a; Mikkelsen et al., 2008). Particulièrement le VPA qui permet la reprogrammation de fibroblastes humains primaires en iPSCs avec seulement OCT4 et SOX2 (Huangfu et al., 2008b).

En utilisant un cocktail de petites molécules, et bien que les rendements soient assez faibles, Hou et al. ont réussi à obtenir des cellules pluripotentes murines chimiquement induites, c'est-à-dire sans utiliser de facteurs de transcription exogènes, aux caractéristiques similaires aux ESCs et iPSCs « OSKM » (Hou et al., 2013).

1.3.3 Modéliser grâce aux cellules souches pluripotentes

Après reprogrammation, les cellules souches pluripotentes (PSCs) présentent la capacité de se différencier de nouveau dans la quasi-totalité des types cellulaires. Cette différenciation vers un type cellulaire donné est possible *in vitro*, permettant ainsi d'utiliser les PSCs comme source illimitée pour créer une grande diversité de modèles expérimentaux plus ou moins complexes.

1.3.3.1 Organoïdes et tissus complexes

Lorsque les conditions de cultures ne permettent plus de stabiliser leur état pluripotent, les PSCs se différencient spontanément. Mais, il est possible de contrôler les processus de différenciation et d'orienter les cellules vers un devenir spécifique en s'inspirant des signaux présents lors de la différenciation embryonnaire et en induisant expérimentalement un stimulus adapté. La différenciation d'iPSCs en podocytes rénaux (Rauch et al., 2018; Song et al., 2012), progéniteurs hématopoïétiques (Gao et al., 2017), neurones (Fernandopulle et al., 2018), cellules endothéliales (Yoder, 2015), cardiomyocytes (Acimovic et al., 2014), progéniteurs rétiniens (Deng et al., 2016), cellules β des îlots pancréatiques (Qin

et al., 2015), ou encore cellules épithéliales ciliées (Mianné et al., 2018), illustre l'éventail de possibilités qu'offre l'accès aux cellules pluripotentes.

Des modèles tridimensionnels plus complexes ont également pu voir le jour. En effet, la culture en suspension de cellules pluripotentes leur permet de s'organiser et de se différencier en structures sphéroïdes, aussi appelées organoïdes. Au sein de ces structures 3D, différents types cellulaires cohabitent et peuvent interagir comme ils le feraient au sein d'un tissu. A ce jour, il existe des modèles organoïdes d'une large variété d'organes humains et pour n'en citer que quelques-uns, de cerveau (Di Lullo and Kriegstein, 2017; Heide et al., 2018; Seto and Eiraku, 2019), d'hypothalamus (Huang et al., 2021; Kasai et al., 2020; Matsumoto et al., 2020; Ozone et al., 2016), de poumon (Dye et al., 2015; Gotoh et al., 2014; Miller et al., 2019), d'intestin (Serra et al., 2019; Yin et al., 2019), de rein (Nishinakamura, 2019), de cœur (Hulot, 2019; Nugraha et al., 2019; Pesl et al., 2014) ou encore de rétine (Brooks et al., 2019).

L'utilisation d'iPSCs comme source d'encre pour les technologies de bio-impression s'est également développée, permettant ainsi la reconstitution tridimensionnelle de tissus complexes, et notamment l'impression de support pour la régénération du cartilage auriculaire (Lee et al., 2017; Liu et al., 2019b; Zhang et al., 2014).

Bien que les avancées technologiques permettent de mettre en place des modèles de plus en plus complexes se rapprochant au mieux du vivant, ils n'en restent pas moins des modèles imparfaits qui ne peuvent récapituler entièrement la complexité des interactions d'un organisme entier et restent donc complémentaires à l'expérimentation animale.

1.3.3.2 Modèles *in vitro* de pathologies associées à l'âge

La découverte de la technologie de reprogrammation des cellules somatiques et son extension à une grande variété de cellules facilement accessibles, ont permis d'envisager rapidement la création de lignées iPSC directement dérivées de patients. Il peut s'agir de patients sains mais aussi de patients atteints de diverses pathologies, permettant ainsi de récapituler *in vitro* des syndromes affectant des organes difficilement accessibles aux prélèvements de façon non-invasive. C'est notamment le cas pour tout un ensemble de maladies génétiques, comme par exemple les dystrophies musculaires de Duchenne ou de Becker, la maladie de Parkinson, la maladie d'Huntington, la trisomie 21 ou encore la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (Acimovic et al., 2018; Jelinkova et al., 2020; Park et al., 2008). La modélisation de ces pathologies *in vitro* permet de faciliter la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents.

Les pathologies de vieillissement accéléré peuvent elles aussi être modélisées *in vitro* grâce à la reprogrammation. Notre équipe a modélisé certains de ces syndromes. En effet, Gatinois et al. ont démontré que la reprogrammation de cellules de patients atteints du syndrome de Werner était possible, tout en maintenant le phénotype de raccourcissement des télomères (Gatinois et al., 2019). De même, la reprogrammation de cellules de patients atteints du syndrome de Bloom conserve le phénotype caractéristique d'échange de chromatides sœurs (Gatinois et al., 2020). D'autres équipes ont pu obtenir des résultats similaires pour le syndrome de Werner (Cheung et al., 2014; Zhang et al., 2015) et pour d'autres syndromes de vieillissement prématuré tels que le syndrome progéria de Hutchinson-Gilford (Liu et al., 2011; Zhang et al., 2011) ou la dyskératose congénitale (Agarwal et al., 2010; Batista et al., 2011).

1.3.3.3 Modèles pour le criblage pharmacologique

La récapitulation *in vitro* de syndromes humains et le développement de modèles plus complexes grâce aux iPSCs, permettent non seulement la dissection des mécanismes cellulaires et moléculaires mais peuvent aussi servir de support au criblage de molécules pharmacologiques pour tester leur efficacité et leur potentielle toxicité. Couplé aux technologies de criblage à haut débit, cela permet d'identifier un large panel de molécules pharmacologiques en recherche préclinique. A titre d'exemple, les organoïdes cardiaques ont été le support pour tester la toxicité de candidats médicaments (Del Álamo et al., 2016; Grimm et al., 2015; Sharma et al., 2017, 2018).

Le développement de modèles directement dérivés des patients, par opposition aux lignées cellulaires immortalisées, permet une médecine personnalisée dans le sens où les questions expérimentales sont résolues dans le contexte génétique propre au patient (Paik et al., 2020; Perkhofer et al., 2018; Takahashi, 2019). De plus, combiné aux avancées récentes dans le domaine de l'édition du génome, notamment grâce au CRISPR-Cas9 dont l'invention a d'ailleurs valu le prix Nobel de Chimie 2020 à Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna, cela ouvre la voie à la correction de mutations génétiques associées à des phénotypes pathologiques (Gois Beghini et al., 2020; Li et al., 2015; Long et al., 2018; Yokouchi et al., 2020). Appliqué au contexte de la médecine régénératrice, on pourrait imaginer des stratégies de remplacement cellulaire ou tissulaire de dérivés d'iPSCs patient spécifique et génétiquement corrigés *in vitro*.

1.3.4 La reprogrammation cellulaire en médecine régénératrice

Plusieurs stratégies basées sur la reprogrammation cellulaire peuvent être envisagées pour rajeunir les cellules et les tissus. Une approche thérapeutique classique est la résultante directe d'applications cliniques basées sur la production de cellules différenciées à partir d'iPSCs pour régénérer ou remplacer des cellules à l'intérieur d'un tissu endommagé, voire remplacer l'organe entier (Figure 10). Une autre approche plus innovante consisterait à agir directement au sein du tissu endommagé, pour rajeunir les cellules sans modifier leur identité. On pourrait aussi imaginer des thérapies préventives, permettant d'intervenir avant l'apparition des dommages induits par le vieillissement.

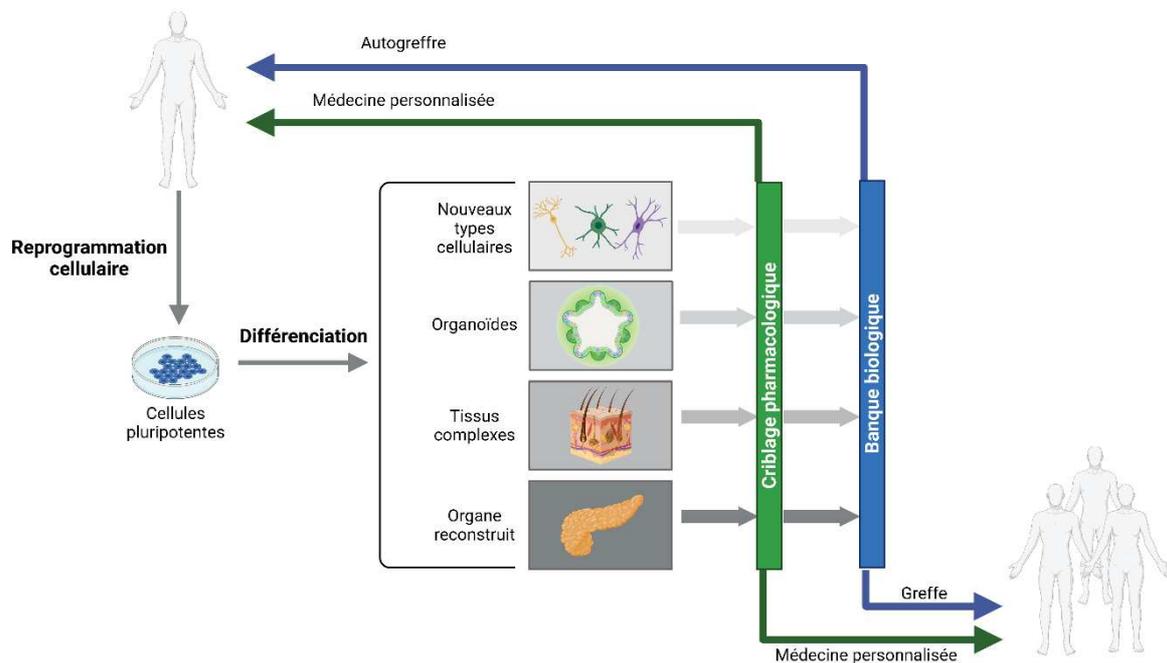


Figure 10 | Applications de la reprogrammation et des cellules souches pluripotentes humaines (adapté de (Alle et al., 2021a))

1.3.4.1 Utilisation et applications des cellules souches pluripotentes humaines

1.3.4.1.1 Production de cellules souches pluripotentes de grade clinique

L'utilisation thérapeutique des cellules pluripotentes requiert que ces cellules répondent à certaines exigences, notamment en termes de sécurité d'utilisation. De nombreuses équipes ont donc travaillé au développement de protocoles de reprogrammation réduisant les risques d'altération. Par exemple, il a été démontré que le transgène associé à c-MYC pouvait être réactivé et causer des tumeurs chez des animaux chimériques issus d'iPSCs reprogrammées par vecteur rétroviral (Okita et al., 2007). De plus, il a été démontré que maintenir les cellules pluripotentes en culture pouvait avoir des impacts à long terme sur l'intégrité génétique et épigénétique des cellules et que les conditions de culture elles-mêmes

peuvent avoir un impact (Rebuzzini et al., 2016; Tosca et al., 2015). La validation de l'intégrité génétique et épigénétique des iPSCs est donc indispensable, même si celles-ci ont été obtenues par des méthodes de reprogrammation non intégratives (Wang et al., 2015). L'absence d'éléments xénogéniques dans les milieux et les matrices utilisés pour la culture des iPSCs est nécessaire pour des usages cliniques (Mallon et al., 2006; Wang et al., 2015).

Bien que la reprogrammation de cellules issues de patients soit relativement complexe et coûteuse, elle présente des avantages indiscutables pour les thérapies autologues. La collecte des cellules par une prise de sang est une méthode simple, rapide, peu risquée et non invasive. C'est l'étape de reprogrammation qui pose le plus de défis notamment quant à son efficacité et son coût. Récemment, les techniques de culture en systèmes microfluidiques ont permis l'amélioration de l'efficacité de reprogrammation lorsque celle-ci recourt à l'utilisation de facteurs de type ARNm. De plus, cette technique permet de réduire drastiquement les quantités de composés nécessaires à la reprogrammation et donc d'en réduire les coûts (Gagliano et al., 2019; Luni et al., 2016).

Outre les thérapies autologues, les cellules pluripotentes peuvent aussi être envisagées pour des transplantations allogéniques. Une approche consiste en la création de banques biologiques constituées de cellules caractérisées et sélectionnées pour leur compatibilité avec le receveur, notamment pour l'antigène leucocytaire humain HLA, complexe majeur d'histocompatibilité (Barry et al., 2015; Gourraud et al., 2012; Lee et al., 2018). Une approche alternative propose de réduire l'immunogénicité des cellules, comme démontré par Deuse et al. dans un modèle murin (Deuse et al., 2019). Ils ont mis en évidence que la surexpression de CD47 et l'ablation par CRISPR-Cas9 des complexes d'histocompatibilité de classe I et II, permettaient de générer des iPSCs non immunogéniques. Cette découverte laisse à penser qu'il serait possible de générer des iPSCs dites universelles car caractérisées et compatibles avec l'ensemble de la population. Cependant, il faut rester très vigilant quant à la création de cellules ayant les capacités d'échapper à la reconnaissance par le système immunitaire car cela augmente dangereusement le risque d'échapper aux systèmes de contrôle et de développer des tératomes. Une stratégie pour contrecarrer ces effets délétères des iPSCs universelles serait d'y associer un système de contrôle par des gènes suicides, permettant d'éliminer au sein des greffons les cellules non différenciées (Jones et al., 2014; Liang et al., 2018).

1.3.4.1.2 Thérapies de remplacement cellulaire et tissulaire

Les cellules pluripotentes humaines peuvent également être envisagées comme une source pour la différenciation de cellules et ou de tissus visant à être transplantés pour remplacer ou réparer un tissu non fonctionnel, endommagé ou vieillissant (Yamanaka, 2020).

Dernièrement, de nombreux essais cliniques pour les thérapies de remplacement cellulaire/tissulaire se sont concentrés sur le système nerveux et les traumatismes associés, comme les lésions de la moelle épinière, fréquentes lors d'accidents. Ces lésions conduisent généralement à une altération des fonctions motrices, voire de la paralysie, et des fonctions sensorielles. Il n'existe à ce jour pas de solution thérapeutique « classique ». Dans ce contexte, il a été démontré en 2005 que la transplantation de cellules souches embryonnaires neurales dans la moelle épinière d'un primate favorisait la récupération partielle des fonctions après lésion. Les cellules transplantées se sont notamment différenciées en neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Iwanami et al., 2005). La même équipe a par la suite démontré des résultats similaires après transplantation de cellules souches neurales dérivées d'iPSCs avec une amélioration des fonctions motrices et la formation de connexions synaptiques avec les neurones de l'hôte (Kobayashi et al., 2012; Nori et al., 2011). Cette stratégie de remplacement cellulaire a également été appliquée dans le cadre du traitement de la surdité, en utilisant des progéniteurs otiques dérivés d'hESCs ensuite différenciés en cellules ciliées et neurones auditifs. Après transplantation dans un modèle de neuropathie auditive induite par lésion, la réponse auditive est améliorée (Chen et al., 2012).

Les pathologies dégénératives sont également d'excellents candidats pour ces thérapies de remplacement cellulaire et/ou tissulaire. Compte tenu de leur prévalence dans la population, les pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, sont parmi les plus étudiées (Duncan and Valenzuela, 2017; González et al., 2016; Sonntag et al., 2018). Chez le singe, la transplantation autologue de neurones dopaminergiques dérivés d'iPSCs prévient l'immunosuppression et réinnerve significativement le putamen, améliorant ainsi fonctions motrices et survie à plus de deux ans (Hallett et al., 2015). Les rétinopathies, telles que la dégénération maculaire liée à l'âge (DMLA) ou la rétinite pigmentaire, ont aussi fait l'objet d'essais cliniques utilisant des dérivés de cellules souches pluripotentes humaines d'origine embryonnaire ou induites (Ben M'Barek and Monville, 2019; Morizur et al., 2020). En 2017, Mandai et al. ont réalisé une transplantation autologue de cellules rétinienne dérivées d'iPSCs chez un patient atteint de DMLA (Mandai et al., 2017). Un an post-chirurgie, le greffon était intact et l'acuité visuelle maintenue stable. Dans le traitement de la rétinite pigmentaire, Ben M'Barek et al. ont également développé un greffon GMP sous forme d'épithélium rétinien pigmentaire dérivé d'hESCs testé dans des modèles murins et primates et actuellement en tests cliniques chez l'Homme (Ben M'Barek et al., 2020).

1.3.4.1.3 Production d'organes *in vivo*

Les stratégies thérapeutiques précédemment décrites reposent toutes sur des cultures cellulaires ou tissulaires *ex vivo* avant réimplantation. Une approche complémentaire consisterait en la production d'organes humains matures directement dans des organismes hôtes. Cela permettrait de développer des organes entiers fonctionnels, produits dans des conditions physiologiques proches de l'Homme, directement transplantables et pouvant ainsi pallier au manque d'organes humains disponibles à la transplantation (Suchy and Nakauchi, 2018; Suchy et al., 2018).

Lorsqu'on injecte des iPSCs d'une espèce donnée dans le blastocyste d'une seconde espèce, il est possible de générer une chimère, c'est-à-dire un organisme inter-espèce présentant des cellules des deux espèces concernées. Pour produire un organe entièrement constitué de cellules d'une espèce donnée dans un hôte d'une autre espèce, la stratégie consiste à réaliser les injections d'iPSCs dans un hôte présente un défaut de production de l'organe ciblé. Cette expérience a été réalisée pour la première fois en 2010 par Kobayashi et al. (Kobayashi et al., 2010). Ils ont injecté des iPSCs de rat dans un blastocyste de souris chez qui l'organogénèse pancréatique était altérée par la délétion du gène PDX1. L'expérience a montré que la souris complémentée avait développé un pancréas de rat fonctionnel à l'échelle de la souris. Le chimérisme inverse a été testé quelques années plus tard avec une injection d'iPSCs de souris dans un blastocyste de rat dans le même contexte génétique de déplétion de PDX1. Là encore, l'organisme hôte, le rat cette fois, a développé un pancréas de souris à sa propre échelle (Yamaguchi et al., 2017). La technique a été étendue à d'autres organes et notamment aux reins par Usui et al. en 2012 (Usui et al., 2012). Ils ont cette fois-ci réalisé une complémentation de blastocyste intraspécifique en injectant des iPSCs de souris sauvage dans un blastocyste de souris muté pour le gène SALL1 inactivant la genèse rénale. La chimère s'est avérée dotée de reins fonctionnels issus des iPSCs du donneur. Ces résultats dans des modèles murins permettent d'envisager la production d'organes humains par injection de cellules pluripotentes humaines dans des hôtes tels que le cochon ou le mouton, dont l'anatomie et la physiologie sont proches de celles des organes humains. Cependant, des études ont pu mettre en évidence que les taux de chimérisme de cellules humaines dans des embryons porcins sont extrêmement faibles (Wu et al., 2017).

L'approfondissement de la compréhension des mécanismes et régulations sous-jacents au chimérisme est nécessaire pour rendre fonctionnelles ces stratégies thérapeutiques pour des espèces phylogénétiquement plus éloignées que des rongeurs. Récemment, Nishimura et al. ont démontré que l'existence d'une niche, représentant un manque à combler par les cellules injectées, permettait d'augmenter l'efficacité du chimérisme (Nishimura et al., 2021). Quoiqu'il en soit, le plus grand défi à relever pour l'accomplissement du chimérisme est lié à l'état de pluripotence des hPSCs. En effet, on peut distinguer deux états de pluripotences qui ont été bien caractérisés ; l'état naïf correspondant aux

ESCs murines et l'état engagé ou « *primed* » correspondant aux hPSCs ou aux cellules souches murines épiblastiques (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Ces deux états diffèrent par d'importantes modifications du métabolisme cellulaires, des niveaux de méthylation de la chromatine et des profils d'expression génique, conduisant à des différences fonctionnelles importantes notamment quant à leur habilité à s'intégrer dans des embryons d'autres espèces (De Los Angeles et al., 2015). Pour tenter d'y remédier, des études se concentrent sur l'optimisation de procédés de culture permettant de favoriser la naïveté des hPSCs pour se rapprocher de celle des cellules murines naïves et ainsi améliorer leur capacité d'intégration aux blastocystes (Hu et al., 2020; Kilens et al., 2018; Theunissen et al., 2016). Par exemple, l'inhibition de la voie mTOR par l'utilisation de torine 1 permet de convertir des hPSCs vers un état pluripotent naïf (Hu et al., 2020).

1.3.4.2 Reprogrammer des cellules âgées et/ou sénescentes

La technologie de la reprogrammation cellulaire a ouvert la voie à de nombreuses potentielles thérapies dans le domaine de la médecine régénératrice en vue de remplacer des cellules ou des tissus endommagés au cours du vieillissement. Or au cours du vieillissement, nos cellules subissent de nombreux stress conduisant à l'accumulation progressive de dommages. Utiliser des cellules âgées, et donc potentiellement endommagées, dans le cas de transplantations autologues pour reconstituer des cellules ou des tissus, reviendrait à créer des organes déjà endommagés et potentiellement instables. De plus, un obstacle majeur s'est dressé lors de la mise en application de ces stratégies thérapeutiques : la sénescence cellulaire constitue une barrière au processus de reprogrammation des cellules âgées. Le remodelage épigénétique du locus CDKN2A ainsi que la surexpression des protéines p53, p16INK4A et p21CIP1 se sont révélés constituer des barrières à la reprogrammation des cellules sénescents (Banito et al., 2009; Li et al., 2009a; Marión et al., 2009). Ainsi l'inhibition de la voie p16INK4A (Hayashi et al., 2016) ou l'inactivation du gène p53 (Hong et al., 2009; Utikal et al., 2009) peuvent améliorer l'efficacité de la reprogrammation et ont même rendu possible la reprogrammation de cellules dont la reprogrammation était impossible en conditions normales. L'inactivation de p53 permet également une reprogrammation à seulement deux facteurs OCT4 et SOX2 (Kawamura et al., 2009). Récemment, Mahmoudi et al. ont démontré qu'il existe une grande variabilité dans l'efficacité de reprogrammation au sein d'une population de fibroblastes issus de patients âgés (Mahmoudi et al., 2019). Cette variabilité serait due principalement au profil sécrétoire pro-inflammatoire de certains fibroblastes. Ces fibroblastes dits « activés » se caractérisent par une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires et notamment du facteur TNF, et seraient également impliqués dans la variabilité du taux de cicatrisation chez des souris âgées.

La reprogrammation, en rétablissant un état embryonnaire pouvant s'apparenter à un état juvénile en comparaison d'une cellule somatique, a montré une certaine capacité à effacer certaines marques du vieillissement. Marion et al. se sont intéressés à l'une d'entre elles : le raccourcissement des télomères au cours du vieillissement (Marion et al., 2009). Ils ont démontré que la reprogrammation permettait de rallonger les télomères, que ceux-ci soient initialement raccourcis ou non. Un rajeunissement métabolique a aussi pu être mis en évidence au cours de la reprogrammation et reste maintenu lors de la redifférenciation (Suhr et al., 2010). Cet aspect sera plus largement détaillé dans le paragraphe dédié, voir 1.3.5 *Reprogrammation et métabolisme cellulaire*.

En 2011, notre équipe a démontré que non seulement la reprogrammation de cellules de centaines était possible grâce à un cocktail six facteurs, mais que cette reprogrammation s'accompagne d'un rajeunissement cellulaire (Lapasset et al., 2011). En effet, comme précédemment expliqué, la sénescence constitue une barrière à la reprogrammation classique quatre facteurs. Un protocole de reprogrammation six facteurs (6F) alliant les facteurs OSKM de Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007) et les facteurs OSNL de Thomson (Yu et al., 2007), soit OSKMNL pour OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC, NANOG, LIN28, permet de surpasser cette barrière (Figure 11). Selon ce protocole, Lapasset et al. ont mis en évidence que les iPSCs obtenues à partir de fibroblastes en sénescence répliquative ou de patients centenaires, présentaient des télomères de longueur restaurée, des fonctions mitochondriales rétablies, avec un profil d'expression génique proche de celui des hESCs. De plus, les fibroblastes obtenus après redifférenciation avaient réacquis leurs capacités prolifératives et présentaient un profil transcriptomique similaire à celui de fibroblastes dérivés de cellules souches embryonnaires. Ainsi la reprogrammation 6F permet d'obtenir, après redifférenciation, des cellules avec un phénotype rajeuni comparé aux cellules de départ. Ces résultats ont permis de démontrer que le vieillissement cellulaire était réversible par la reprogrammation.

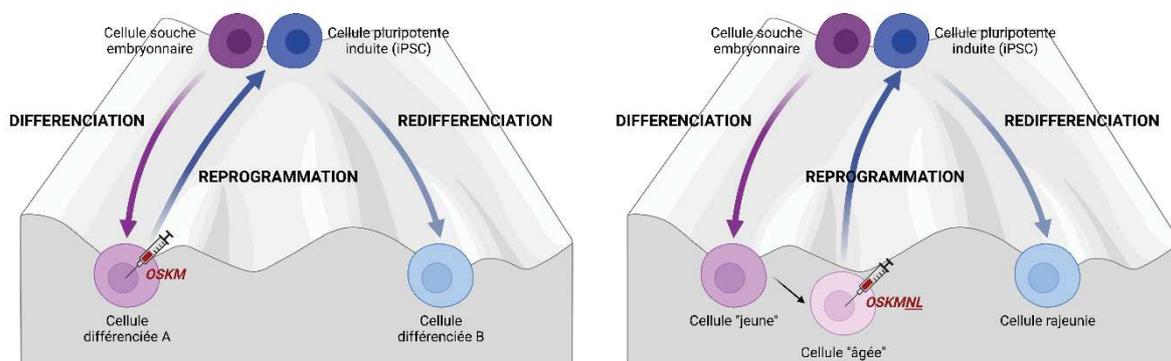


Figure 11 | Représentation des stratégies de reprogrammation quatre et six facteurs dans le paysage épigénétique

1.3.4.3 Reprogrammation complète *in vivo*

Les preuves de la réversibilité du vieillissement cellulaire par la reprogrammation ont incité plusieurs équipes, dont la nôtre, à se pencher sur la question de l'application de cette stratégie *in vivo*, directement au sein des tissus pour prévenir les dommages liés à l'âge.

La question a été abordée pour la première fois par Abad et al (Abad et al., 2013). Ils ont développé deux lignées murines transgéniques, i4F-A et i4F-B, permettant l'expression des quatre facteurs de reprogrammation sous induction par la doxycycline. Ils ont aléatoirement inséré dans le génome par vecteur lentiviral une cassette d'expression polycistronique codant pour OSKM à deux loci différents : dans un intron du gène *Neto2* pour la lignée i4F-A et dans un intro du gène *PPAR γ* pour la lignée i4F-B. Le transactivateur rtTA inducible par la doxycycline, est inséré dans le locus *Rosa26* et contrôle l'expression de la cassette OSKM. Dans un premier temps, les animaux de ces deux lignées ont été traités avec une forte dose de doxycycline à 1mg/mL dans l'eau de boisson pour induire l'expression des facteurs de reprogrammation. Dans ces conditions, l'état de santé global des animaux se détériore rapidement après une semaine d'induction, ce qui se traduit par une perte de poids importante et des dommages intestinaux et pancréatiques. Afin de minimiser ces dommages et maximiser la survie des animaux, des protocoles alternatifs ont ensuite été mis en place. Ces protocoles ont permis de générer des cellules pluripotentes *in vivo* dans la circulation sanguine, validant ainsi la faisabilité de la reprogrammation *in vivo*. Cependant, ces protocoles conduisent également à la formation de tératomes dans de nombreux organes, notamment le pancréas, les reins, l'intestin et le tissu adipeux, avec une incidence supérieure à 40%. Bien que les conséquences soient délétères pour la santé et la survie des animaux, cela prouve la pluripotence des cellules générées et confirme qu'une reprogrammation totale réalisée directement *in vivo* est possible. Ces observations ont été confirmées par une autre équipe dans un autre modèle murin (Ohnishi et al., 2014). La prolifération de cellules dysplasiques présentes au sein des tissus conduit à une dégradation rapide de l'état de santé, associée à une prévalence de tératomes dans les reins, le pancréas et le foie, même une semaine après l'arrêt de l'induction.

En utilisant le modèle établi et décrit par Abad et al. (Abad et al., 2013), des études ont montré une forte corrélation positive entre reprogrammation et sénescence tissulaire. *In vivo*, la reprogrammation complète requiert des facteurs du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) et notamment l'interleukine 6 (IL-6) (Mosteiro et al., 2016). Mosteiro et al. ont démontré que dans des tissus déplétés pour p16INK4a/ARF, qui ne sont donc pas soumis aux processus de sénescence, la reprogrammation est fortement compromise. Inversement, dans des tissus où la sénescence et le phénotype pro-inflammatoire associé sont prédominants suite à l'inactivation de p53, l'efficacité de reprogrammation est améliorée. Des manipulations pharmacologiques des niveaux de sénescence conduisent à des

résultats similaires. Ils ont pu mettre en évidence que cette corrélation reposait sur l'action des cytokines pro-inflammatoires du SASP, notamment en démontrant que l'inhibition pharmacologique de NFκB, acteur de la production de ces cytokines, réduit l'efficacité de la reprogrammation *in vivo*. Des résultats similaires ont été obtenus par Chiche et al. en utilisant le même modèle. L'étude de tissu musculaire, dans un contexte de blessure, a permis de mettre en évidence le rôle central des cellules souches musculaires Pax7+ dans la reprogrammation de ce tissu (Chiche et al., 2017).

Ces exemples illustrent l'importance, pour toute stratégie de reprogrammation visant à rajeunir les organismes, de surmonter d'abord les conditions conduisant à une dédifférenciation totale des cellules, pour s'affranchir des effets délétères qui en découlent.

1.3.5 Reprogrammation et métabolisme cellulaire

Le métabolisme cellulaire a longtemps été considéré comme une conséquence du destin cellulaire plutôt que comme un acteur clé. Pourtant les liens intrinsèques entre le métabolisme et les modifications épigénétiques de la chromatine durant le développement embryonnaire, la progression de pathologies et la reprogrammation cellulaire, ont récemment été mis en évidence (Shyh-Chang et al., 2013). Les cellules pluripotentes, comparativement aux cellules somatiques, sont caractérisées par un métabolisme majoritairement glycolytique, non pas seulement en conséquence de leur préférence pour les environnements pauvres en oxygène, mais bel et bien comme un acteur du maintien de l'autorenouvellement et du potentiel de différenciation, qui présupposent une réponse rapide à de fortes demandes énergétiques (Mohyeldin et al., 2010). Lors de la reprogrammation vers la pluripotence, les cellules subissent un remodelage métabolique accompagnant la reprogrammation épigénétique et transcriptionnelle (Figure 12) (Stadtfeld and Hochedlinger, 2010).

1.3.5.1 Transition progressive vers un métabolisme glycolytique

Les cellules souches pluripotentes se caractérisent par un important flux métabolique reposant sur la glycolyse, même en condition aérobie (Kondoh et al., 2007). Bien que la phosphorylation oxydative ait un meilleur rendement en termes d'ATP produit par molécule de glucose, la glycolyse permet une production plus rapide. De plus, la voie glycolytique est connectée à d'autres voies métaboliques fournissant les précurseurs pour la synthèse des acides nucléiques, acides aminés et lipides, dont la demande est accrue dans les cellules fortement prolifératives (DeBerardinis et al., 2008; Vander Heiden et al., 2009). Ce métabolisme glycolytique aérobie des cellules pluripotentes est comparable à celui des cellules cancéreuses et à l'effet Warburg (Vander Heiden et al., 2009).

La reprogrammation d'une cellule somatique en cellule pluripotente s'accompagne d'un changement métabolique progressif consistant en une diminution de l'activité de phosphorylation oxydative en faveur d'une augmentation de l'activité glycolytique (Mathieu and Ruohola-Baker, 2017), supportée par les modifications des quantités de métabolites correspondants (Park et al., 2017). Lors de l'initiation de cette transition, un état transitoire de métabolisme hyper-énergétique s'opère, à savoir que glycolyse et phosphorylation oxydative sont toutes deux suractivées. Cet état hyper-énergétique précoce se traduit au niveau transcriptomique par une surexpression des gènes liés au métabolisme (Cacchiarelli et al., 2015) ainsi qu'au niveau protéomique par une induction transitoire des protéines mitochondriales (Hansson et al., 2012). Le pic de phosphorylation oxydative conduit à une production accrue de ROS via une activité mitochondriale intensifiée. Hawkins et al. ont mis en évidence une activation du facteur nucléaire NFR2 lors de l'initiation de la reprogrammation (Hawkins et al., 2016). Or NFR2 est connu pour être un acteur clé de la réponse antioxydante, son activation pourrait permettre de protéger les cellules du stress oxydatif lors de la reprogrammation. Bien que les tenants et les aboutissants de cet état métabolique hyper-énergétique associant phosphorylation oxydative et glycolyse, ne sont pas encore parfaitement compris, cet état transitoire accompagne l'initiation de la reprogrammation.

1.3.5.2 Remodelage mitochondrial

1.3.5.2.1 Changements morphologiques et numériques des mitochondries

La transition d'un métabolisme basé sur la phosphorylation oxydative, supportée par le compartiment mitochondrial, vers un métabolisme glycolytique, s'affranchissant de ce compartiment, implique nécessairement un remodelage mitochondrial. Durant le processus de reprogrammation, la quantité d'ADN mitochondrial diminue progressivement (Folmes et al., 2011). Dans les iPSCs, les mitochondries présentent une morphologie dite immature, c'est-à-dire de petites mitochondries avec peu de crêtes, qui se localisent autour du noyau (Prigione et al., 2011).

Bien que les mécanismes supportant ce remodelage mitochondrial au cours du processus de reprogrammation ne soient pas encore clairement élucidés, deux pistes semblent se dégager. Tout d'abord, le processus de mitophagie, ou autophagie sélective des mitochondries, semble impliqué. En effet, l'ajout d'inhibiteurs de la voie mTOR tels que la rapamycine, qui se trouvent également être des activateurs d'autophagie, améliore l'efficacité de la reprogrammation (Chen et al., 2011; Menendez et al., 2011). Des cellules issues de mutants pour la protéine ATG5, *autophagie-related protein 5*, ne montrent aucun signe de diminution du nombre de mitochondries au cours du processus de reprogrammation, qui se solde par un échec (Wang et al., 2013). D'un point de vue mécanistique, il semblerait que l'expression de SOX2, un des facteurs de reprogrammation, inhibe transitoirement l'expression de

mTOR, permettant l'activation de l'autophagie via ATG5. Paradoxalement, une autre étude plus récente a pu mettre en évidence une activation de l'autophagie indépendamment d'ATG5 (Ma et al., 2015). Quoiqu'il en soit, le processus de mitophagie semble inhérent au processus de reprogrammation pour le retrait des mitochondries matures. Outre la réduction du nombre de mitochondries, le remodelage mitochondrial au cours de la reprogrammation semble aussi passer par une réduction de la taille des mitochondries. En effet, une fragmentation des mitochondries peut être observée dès les premiers jours d'induction des facteurs OSKM (Nishimura et al., 2019). Ce processus ne serait pas dû à la mitophagie mais à une activation de la fission mitochondriale, mise en évidence par l'activation par phosphorylation d'un facteur essentiel à ce processus, DRP1 *dynamamin-related protein 1* (Cook et al., 2017). Une étude récente a mis en évidence que l'expression de c-MYC induit la phosphorylation de DRP1 par CDK1, ce qui stimule la fission mitochondriale (Prieto et al., 2018). *In fine*, la fission mitochondriale conduit à la formation de mitochondries de petite taille présentant un fort potentiel de phosphorylation oxydative, ce qui correspondrait à l'état hyper-énergétique décrit au début du processus de reprogrammation (Hawkins et al., 2016; Kida et al., 2015; Prieto et al., 2016).

Des techniques de microscopie avancées, par contraste interférentiel, permettent de quantifier les changements morphologiques mitochondriaux entre des cellules partiellement et totalement reprogrammées. Ces différences permettent même d'évaluer quantitativement la pluripotence des clones obtenus (Nishimura et al., 2019), ce qui laisse à penser qu'il existe un lien fort entre remodelage mitochondrial et acquisition de la pluripotence.

1.3.5.2.2 Changement de composition du compartiment mitochondrial

Des analyses protéomiques ont révélé d'importants changements dans la composition protéique des mitochondries et notamment au niveau des complexes de la chaîne de transport des électrons, localisés dans la membrane interne de la mitochondrie. Dès l'initiation de la reprogrammation, les cellules montrent une modification de la stœchiométrie de ces complexes protéiques avec une diminution des complexes I et IV et une augmentation des complexes II, III et V (Folmes et al., 2011). Ces modifications protéiques de la chaîne respiratoire sont inévitablement liées à des modifications des fonctions mitochondriales et principalement à ses capacités de phosphorylation oxydative. Une faible activité du complexe I associée à une forte activité du complexe II suggèrent une utilisation préférentielle du cofacteur FADH₂ au lieu du NADH pour le transport des électrons. Une faible activité du complexe IV, permettant de convertir l'oxygène en eau, est corrélée avec une diminution de l'activité respiratoire (Zhou et al., 2012). Enfin, une forte activité du complexe V qui n'est autre que l'ATP synthase, outre une production accrue d'ATP paradoxale en régime majoritairement glycolytique, pourrait suggérer une fonction d'hydrolase pour le maintien du potentiel de membrane mitochondrial (Zhang et al., 2016).

1.3.5.2.3 Régulation des fonctions mitochondriales

Le remodelage mitochondrial est intimement lié à une cascade de régulation induite par des facteurs de transcription. Les récepteurs nucléaires liés aux œstrogènes (ERR) font partie de la cascade d'expression induite précocement. En particulier, $ERR\alpha$ et $ERR\gamma$, de même que le coactivateur $PGC-1\alpha$, sont surexprimés de façon transitoire vers le troisième jour d'induction de la reprogrammation correspondant au pic de phosphorylation oxydative. Ces facteurs participent de façon active à l'induction de l'état hyper-énergétique (Kida et al., 2015). Le pic de ROS associé à cet état hyper-énergétique jouerait également un rôle dans la régulation de cette transition métabolique en activant les facteurs nucléaires kappa B ($NF-\kappa B$) et NRF2, ainsi que la protéine activatrice 1 (AP-1). La surexpression de ces facteurs précède le pic d'induction du facteur inductible par l'hypoxie $HIF1\alpha$. Hawkins et al. ont montré que NRF2 est requis pour l'induction de $HIF1\alpha$ via la surexpression de la protéine KEAP1, permettant de maintenir NRF2 dans le cytoplasme en empêchant sa translocation vers le noyau (Hawkins et al., 2016).

Le rôle de c-MYC lui-même, un des quatre facteurs de reprogrammation, dans le processus de transition métabolique semble crucial. A lui seul, il est capable de mimer le pic de phosphorylation oxydative induit par l'expression des quatre facteurs OSKM (Prieto et al., 2018). De plus, c-MYC et $HIF1\alpha$ sont décrits pour coopérer lors de la reprogrammation du métabolisme des cellules cancéreuses (Gordan et al., 2007; Huang, 2008), on peut donc facilement envisager que ces deux facteurs coopèrent de façon similaire lors de l'induction de la reprogrammation vers la pluripotence.

1.3.5.3 Activation des enzymes glycolytiques

La transition d'un métabolisme principalement basé sur la phosphorylation oxydative à un métabolisme majoritairement glycolytique repose sur une régulation positive des gènes glycolytiques qui s'opère dès l'initiation de la reprogrammation (Folmes et al., 2011; Mathieu et al., 2014; Prigione et al., 2014) et se maintient tout au long du processus (Folmes et al., 2011). La transition s'opère également au niveau protéique avec une surexpression des enzymes glycolytiques dans les iPSCs en comparaison à des cellules somatiques (Folmes et al., 2011), ainsi qu'une consommation de glucose associée à une production de lactate qui s'accroissent au cours de la reprogrammation (Folmes et al., 2011; Nishimura et al., 2017; Panopoulos et al., 2012; Prieto et al., 2018; Prigione et al., 2010; Varum et al., 2011).

Le facteur $HIF1\alpha$ semble là encore avoir son importance. En effet, tout comme dans les cellules cancéreuses, $HIF1\alpha$ favorise la voie glycolytique en induisant la surexpression des gènes associés (Mathieu et al., 2014; Prigione et al., 2014). Son inhibition dans des fibroblastes humains conduit à l'échec de la reprogrammation. L'action du facteur $HIF1\alpha$ est transitoire et précoce, puisqu'il a été démontré

que sa stabilisation pendant les phases tardives réduit l'efficacité de la reprogrammation via l'induction du facteur de nécrose tumorale (TNF) (Mathieu et al., 2014).

L'augmentation du flux glycolytique n'est pas seulement due à l'activation des enzymes mais aussi à des régulations post-transcriptionnelles des enzymes clés de la glycolyse (Prigione et al., 2014). Une des charnières entre glycolyse et cycle de Krebs repose sur la phosphorylation du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH), qui catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-CoA après son entrée dans la matrice mitochondriale. L'activité de la PDH est régulée négativement par sa phosphorylation par la pyruvate déshydrogénase kinase (PDHK1). Les niveaux protéiques de PDHK1 sont significativement augmentés lors de la reprogrammation, non pas par sa régulation transcriptomique mais probablement par sa stabilisation protéique (Varum et al., 2011). Ceci entraîne une augmentation de la phosphorylation de la PDH régulant négativement son activité, qui induit donc une baisse d'activité du cycle de Krebs au profit d'une fermentation lactique. Un autre point clé de la régulation de la glycolyse est sa dernière étape, consistant en la conversion du phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate par action de la pyruvate kinase (PK). Le gène PKM produit deux isoformes PKM1 et PKM2 par épissage alternatif. Pendant la reprogrammation, l'isoforme PKM2 est prépondérant par rapport à PKM1, et du fait de sa plus faible activité catalytique, cela favorise l'activité glycolytique (Mah et al., 2011).

Enfin, la voie de signalisation AKT semble impliquée dans cette transition métabolique. En effet, il existe une corrélation positive entre l'activité AKT et l'efficacité de la reprogrammation (Yu et al., 2014), passant par une augmentation de l'expression des gènes glycolytiques et une production de lactate accrue (Zhu et al., 2010). En fin de processus de reprogrammation, l'induction de TCL1 par KLF4 promeut l'activité AKT qui maintient élevés les taux des enzymes glycolytiques clés (Nishimura et al., 2017). TCL1 interagit directement avec AKT formant un polymère favorisant ainsi la phosphorylation et l'activation d'AKT (Laine et al., 2000).

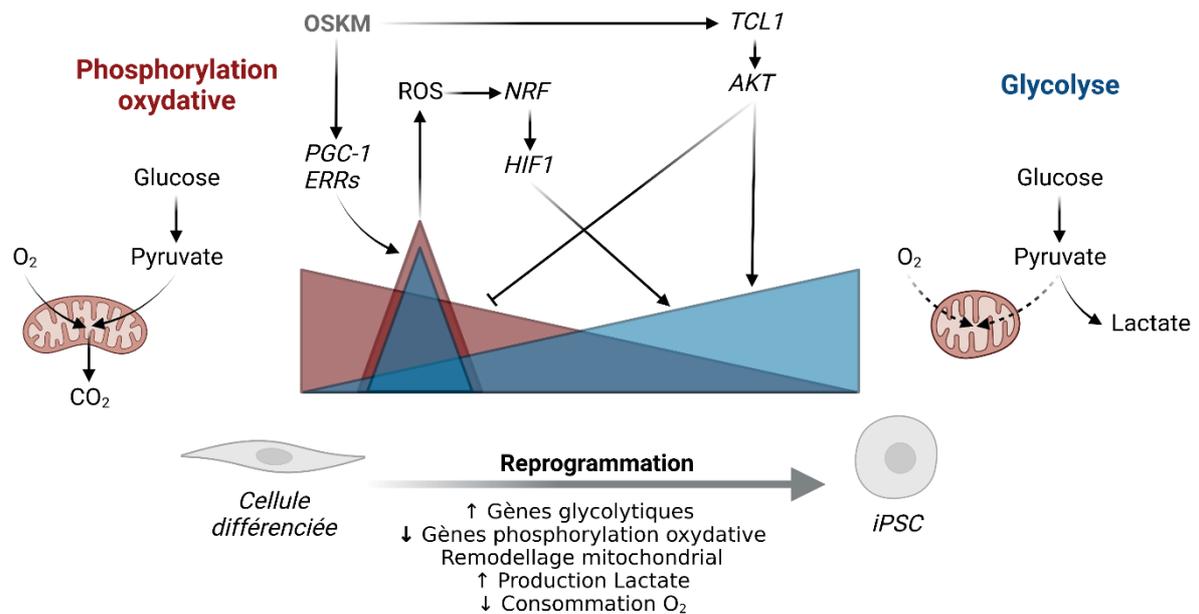


Figure 12 | Schématisation de la transition métabolique au cours de la reprogrammation

Moduler le métabolisme impacte l'efficacité de la reprogrammation et inversement, ce qui suggère que la transition métabolique observée pendant le processus de reprogrammation n'est pas seulement une conséquence mais joue bien un rôle actif. La compréhension des mécanismes métaboliques pourrait permettre d'améliorer les protocoles de reprogrammation et avec les bons effecteurs, d'en intensifier les effets bénéfiques.

1.3.6 Reprogrammation partielle et rajeunissement *in vitro* et *in vivo*

La reprogrammation complète a pu prouver ses propriétés rajeunissantes mais a aussi montré ses limites avec les problèmes d'« ultra-dédifférenciation » conduisant à la formation de tératomes lorsqu'elle est appliquée directement *in vivo*. Pour y remédier, Ocampo et al. ont développé un protocole de reprogrammation dite partielle (Ocampo et al., 2016). Ils ont été les premiers à démontrer que la reprogrammation pouvait déjouer le processus de vieillissement. Dans un modèle murin récapitulant le syndrome humain d'Hutchinson-Gilford Progeria, mimant un vieillissement accéléré, un protocole cyclique chronique d'expression des facteurs OSKM *in vivo* permet l'augmentation de la longévité des animaux, tout en améliorant le phénotype de vieillissement. Pour ce faire, ils ont utilisé des animaux issus du croisement de deux génotypes bien décrits : une lignée reprogrammable développée par Carey et al. (Carey et al., 2010) et une lignée récapitulant le syndrome de vieillissement accéléré développée par Osorio et al. (Osorio et al., 2011a). Ils ont ainsi obtenu des animaux reprogrammables homozygotes

pour la Progéria, à savoir $Lmna^{G609G/G609G} R26^{rtTA/+} Col1A1^{4F2A/+}$. Ces animaux ont été reprogrammés selon un protocole d'induction cyclique chronique des facteurs de reprogrammation, consistant en une induction à la doxycycline dans l'eau de boisson des animaux à 1mg/mL pendant 2 jours suivis de 5 jours d'arrêt, ce même schéma étant ensuite répété toutes les semaines tout au long de la vie de l'animal. Ce protocole permet une amélioration de la longévité de presque 30%, partant d'une espérance de vie médiane des animaux progériques homozygotes à 18 semaines, étendue à 24 semaines pour les animaux traités. Cela s'accompagne d'une amélioration globale de l'état de santé des animaux qui s'illustre par le maintien de l'intégrité tissulaire dans divers organes tels que les reins, la rate, l'estomac ou le cœur. Cependant, il faut garder en tête que ces résultats ont été obtenus sur des animaux homozygotes progéria, portant une double copie de la mutation G609G dans le gène *Lmna*, qui conduit à un phénotype de vieillissement pathologique assez critique, peu comparable à un vieillissement physiologique (Osorio et al., 2011a).

Dans la même étude, ils ont également pu mettre en évidence que l'induction de l'expression des facteurs de reprogrammation permettait d'améliorer les capacités régénératives d'animaux reprogrammables non progériques $Lmna^{+/+} R26^{rtTA/+} Col1A1^{4F2A/+}$, la résistance métabolique dans un modèle de diabète induit par la streptozotocine, et la régénération musculaire dans un modèle de dégénération induite par injection intramusculaire de cardiotoxine (Ocampo et al., 2016). Pour la régénération musculaire, ils ont pu mettre en évidence une augmentation du nombre de cellules satellites *Pax7+*, qui sont les cellules souches musculaires impliquées dans la régénération des fibres. Récemment, Wang et al. ont pu expliciter le lien entre reprogrammation et régénération musculaire (Wang et al., 2021). Ils ont mis en évidence que l'induction des facteurs de reprogrammation OSKM spécifiquement dans les fibres musculaires permettait une activation des cellules satellites via un remodelage de leur microenvironnement, notamment via l'activation de p21 entraînant l'inhibition de *Wnt4*. Or la sécrétion de *Wnt4* par les myofibrilles est impliquée dans le maintien de l'état quiescent des cellules souches satellites (Eliazer et al., 2019), son inactivation signale donc l'activation et la prolifération des cellules souches musculaires initiant ainsi le processus de régénération. Parallèlement, Doeser et al. ont montré que l'induction locale des facteurs de reprogrammation dans la peau ralentissait le processus de cicatrisation en inhibant l'activité des fibroblastes et leur transdifférenciation en myoblastes, illustré par l'inhibition des marqueurs *TGFβ1*, *COL1a1* et *αSMA* (Doeser et al., 2018). Ce ralentissement du processus de cicatrisation se fait au profit des processus de régénération plus lents. Enfin, récemment, en utilisant le modèle i4F-B décrit par Abad et al. (Abad et al., 2013), Rodríguez-Matellán et al. ont pu mettre en évidence qu'une induction cyclique avec 3 jours par semaine à 2mg/mL de doxycycline, améliore les fonctions cognitives, avec une corrélation positive entre les niveaux d'expression d'OSKM et le score au test de reconnaissance des objets (Rodríguez-Matellán et al., 2020).

Dans leur étude Ocampo et al. ont également modélisé la reprogrammation partielle *in vitro* (Ocampo et al., 2016). Ils ont extrait des fibroblastes dermiques de leur modèle murin progérique reprogrammable et ont induit l'expression des facteurs de reprogrammation *in vitro* en traitant les cellules à la doxycycline à 1µg/mL dans le milieu de culture. Ils ont mis en évidence un réarrangement des marques histones H3K9me3 et H4K20me3, qui sont connues pour être impactées par le vieillissement. Cependant, ces effets se sont avérés réversibles, suggérant que l'induction chronique est nécessaire pour les maintenir et les lier aux bénéfices observés *in vivo* sur la longévité. De plus, une étude récente, la première à utiliser le séquençage d'ARN de cellules individualisées (*single cell RNAseq*) a montré que l'induction transitoire par les facteurs de reprogrammation OSKM *in vitro* restaure une signature transcriptomique rajeunie dans les cellules adipogènes et les cellules souches embryonnaires mésenchymateuses murines (Roux et al., 2021).

Les effets de la reprogrammation partielle ont également été explorés chez l'Homme. Sarkar et al. ont récemment mis en place une stratégie de reprogrammation partielle *in vitro* en utilisant des ARNm pour induire l'expression des 6 facteurs OSKMNL de reprogrammation sur des cellules humaines jeunes et âgées (Sarkar et al., 2020). Ils ont démontré que la reprogrammation partielle de fibroblastes et cellules endothéliales, pouvait restaurer certaines marques cellulaires associées à l'âge, y compris selon deux horloges épigénétiques basées sur plus de 300 CpGs, l'une multi-organes (Horvath, 2013) et la seconde focalisée sur la peau et le sang (Horvath et al., 2018). De plus, ils ont montré que la reprogrammation affecte les niveaux de méthylation de l'histone H3K9me3, améliore l'activité du protéasome et l'autophagie, et décroît la proportion de ROS. Afin de déterminer si une expression transitoire des 6 facteurs OSKMNL permet d'inverser la tendance de phénotypes associés à l'âge tels que l'augmentation des niveaux d'inflammation ou la perte des capacités régénératives des cellules souches adultes, les auteurs ont d'abord analysé les conséquences transcriptomiques de la reprogrammation appliquée à des chondrocytes de patients âgés atteints d'arthrose. Ils ont observé une diminution significative des niveaux d'expression des médiateurs du remodelage osseux, le ligand RANKL (*receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*) et iNOS2 (*Inducible Nitric Oxide Synthase 2*), ainsi qu'une diminution de facteurs sécrétés pro-inflammatoires tels que MIP1A, IL-6, IFNA et MCP3. Ensuite, ils ont évalué les capacités régénératives de cellules souches musculaires humaines reprogrammées partiellement. Pour ce faire, ils les ont transplantées dans un modèle murin de blessure musculaire induite. Il s'est avéré que les cellules satellites âgées reprogrammées démontraient un meilleur potentiel de régénération des fibres musculaires (Sarkar et al., 2020). Ces expériences ont permis de valider les approches non-intégratives pour l'expression des facteurs de reprogrammation.

Une autre approche de reprogrammation *in vivo* a été illustrée dernièrement. Senís et al. ont démontré que la reprogrammation *in vivo* était possible en délivrant les facteurs OSK grâce à des vecteurs viraux

(Senís et al., 2018). Ce type d'approche a été envisagée comme stratégie pour la régénération du système nerveux central chez la souris, et plus particulièrement pour restaurer la vision (Lu et al., 2020b). Lu et al. ont injecté dans le corps vitré oculaire de souris des vecteurs AAV2 pour contrôler l'expression d'une cassette polycistronique codant pour les facteurs OSK. Pour s'assurer de l'innocuité de la méthode, les auteurs ont maintenu une induction sur plus de quinze mois et ont ainsi pu valider l'absence de développement de tumeurs ou de malformations de la rétine. Ils ont ensuite démontré que l'induction des facteurs OSK dans les cellules ganglionnaires rétiniennes améliore la survie, stimule la régénération de l'extension des axones ainsi que la formation du nerf optique sous différentes conditions de stress. Ils ont mis en place un modèle de blessure au nerf optique par compression nerveuse, un modèle de glaucome induit par surpression oculaire, et ont aussi testé leurs hypothèses dans le contexte de la perte d'acuité visuelle liée au vieillissement. L'analyse des niveaux de méthylation de l'ADN ainsi que du profil transcriptomique des cellules ganglionnaire rétiniennes, ont permis de mettre en évidence une restauration de paramètres rajeunis. L'épigénétique semble jouer un rôle prépondérant dans ces phénomènes de régénération. En effet, les effets bénéfiques de la reprogrammation OSK requièrent l'action des déméthylases d'ADN TET1 et TET2, dont l'inhibition agit comme une barrière à la régénération.

Dans une étude récente, prépubliée dans BioRxiv, Gill et al., ont proposé un nouveau protocole de reprogrammation partielle *in vitro* qu'ils appellent « *maturation phase transient reprogramming* » (Gill et al., 2021). Ce protocole consiste en l'induction des facteurs de reprogrammation OSKM jusqu'à la phase de maturation des iPSCs, soit entre 10 et 17 jours d'induction, suivi de l'arrêt de l'induction permettant ainsi aux cellules de retrouver leur identité d'origine. Ils ont souligné l'existence d'une mémoire épigénétique permettant aux fibroblastes reprogrammés de retrouver leur identité cellulaire spontanément alors que les programmes d'expression des gènes fibroblastiques avaient été éteints par la reprogrammation. Ils ont également mesuré l'âge cellulaire par des analyses transcriptomiques et des niveaux de méthylation, mettant en évidence un rajeunissement. Enfin, ce rajeunissement moléculaire semble se traduire au niveau fonctionnel, suggéré par une réacquisition de niveaux protéiques juvéniles de collagène.

Les modifications épigénétiques impliquées lors de la reprogrammation partielle sont largement considérées comme moteur du phénomène de rajeunissement global observé à la fois *in vitro* et *in vivo* (Doeser et al., 2018; Gill et al., 2021; Lu et al., 2020b; Olova et al., 2019; Rodríguez-Matellán et al., 2020; Sarkar et al., 2020).

1.4 CONCLUSION DE L'INTRODUCTION GENERALE

L'allongement de l'espérance de vie au cours du siècle dernier a permis de révéler l'importance, non pas de pouvoir vivre de plus en plus longtemps, mais surtout celle de pouvoir vivre le plus longtemps possible en bonne santé afin de profiter pleinement de ses capacités. En effet, le vieillissement, bien que n'étant pas une maladie en soi, se caractérise par l'accumulation progressive de dommages moléculaires, cellulaires et tissulaires, altérant coup après coup l'efficacité de nos systèmes biologiques. Ainsi avec l'avancée en âge, la susceptibilité de souffrir d'une pathologie chronique augmente, diminuant nos capacités et augmentant notre dépendance aux autres.

Aujourd'hui, la compréhension des mécanismes du vieillissement a permis de développer des stratégies afin de prévenir et/ou ralentir le processus. Il existe autant de stratégies différentes qu'il existe de marqueurs du vieillissement ou de la santé. Certaines visent à diminuer l'endommagement cellulaire, d'autres à rétablir la communication cellulaire, la sensibilité aux nutriments, et d'autres encore à réduire l'inflammation chronique.

Les avancées technologiques ont permis de mettre en évidence la réversibilité du destin cellulaire avec la découverte de la reprogrammation cellulaire. La reprogrammation du potentiel cellulaire s'accompagne également d'une reprogrammation des marques du vieillissement qui se traduit donc par un rajeunissement global. Appliquée à un organisme entier, la reprogrammation cellulaire constitue donc une stratégie anti-âge globale prometteuse. Compte tenu, du potentiel tératogène de la reprogrammation totale *in vivo*, des protocoles de reprogrammation partielle ou transitoire *in vitro* et *in vivo* se sont développés et ont montré des effets bénéfiques dans le contexte du vieillissement et de l'étude de ses marques. La compréhension des mécanismes tissulaires, cellulaires et moléculaires sous-jacents demeure incomplète et ces mécanismes demandent encore à être explorée.

2 DEMARCHE EXPERIMENTALE ET HYPOTHESES DE TRAVAIL

La reprogrammation d'une cellule somatique en cellule pluripotente induite est « contraire » au devenir cellulaire et n'a été rendue possible qu'avec la découverte de son induction par l'expression des quatre facteurs de transcription OSKM. Comme nous l'avons décrit à la fin de l'introduction dans la section 1.3.6, plusieurs études ont démontré *in vitro* que la reprogrammation cellulaire permet d'effacer certaines marques du vieillissement. On observe ainsi une réinitialisation de l'épigénome, une diminution de l'altération du génome, avec un rallongement des télomères par exemple, ainsi qu'une restauration des capacités métaboliques et des fonctions mitochondriales. Au laboratoire, il a même été démontré que la reprogrammation était possible même à partir de cellules centenaires ou sénescences (Lapasset et al., 2011). L'ensemble de ces observations *in vitro* ont permis d'envisager la reprogrammation comme une stratégie anti-âge, mais qu'en est-il si ce même processus de reprogrammation est appliqué *in vivo* sur un organisme entier ? Permet-il un rajeunissement de l'organisme et permet-il d'effacer des marques cellulaires et/ou tissulaires du vieillissement ?

Abad et al., ont été les premiers à démontrer qu'une reprogrammation totale était possible *in vivo* (Abad et al., 2013). Compte tenu que ces approches conduisent à la formation de tératomes, elles ne sont pas applicables en l'état dans le cadre de stratégies anti-âge. Les hypothèses de reprogrammation transitoire ont alors fait leur apparition. L'idée est que ces traitements permettent d'induire l'expression des facteurs de reprogrammation dans des conditions ne permettant pas l'obtention de cellules pluripotentes induites. La démarche est d'initier le processus de reprogrammation dans les cellules, en supposant que cela suffise pour obtenir les effets rajeunissants tout en s'affranchissant des problèmes liés à la dédifférenciation totale des cellules reprogrammées. Ocampo et al. furent les premiers à démontrer qu'une reprogrammation transitoire chronique *in vivo*, dans un organisme transgénique pouvant exprimer les facteurs OSKM dans l'ensemble de ses cellules, a des effets bénéfiques sur la longévité des animaux et permet d'améliorer un certain nombre de marques associées au vieillissement améliorant ainsi également l'état de santé des animaux (Ocampo et al., 2016). Il est important de souligner que ces résultats ont été obtenus dans un modèle pathologique de vieillissement accéléré extrêmement sévère comparé à un vieillissement physiologique.

Au laboratoire, nous avons décidé de travailler sur un phénotype de vieillissement accéléré « intermédiaire » plus proche de la réalité physiologique, c'est-à-dire sur des animaux progériques à l'état hétérozygote. Ainsi, nous avons développé différents protocoles de reprogrammation transitoire *in vivo* ; des protocoles chroniques appliqués tout au long de la vie des animaux soit sur un mode cyclique soit sur un mode continu, ainsi que des protocoles d'induction transitoire unique. Dans un

premier temps, nous avons cherché à évaluer l'impact de ces différents protocoles sur la longévité des animaux. Nous nous sommes concentrés en particulier sur des protocoles d'induction transitoire unique en raison de leur originalité et de leur simplicité de mise en œuvre, qui représente un avantage technique majeur par opposition à un protocole chronique en vue d'une translation clinique chez l'Homme. Outre l'impact brut sur l'espérance de vie des animaux, nous avons cherché à mettre en évidence si une reprogrammation transitoire *in vivo* pouvait aussi être bénéfique sur l'état de santé général des animaux, et donc sur leur espérance de vie en bonne santé, aussi bien dans un contexte physiologique que dans le contexte du développement de certaines pathologies liées à l'âge. Une reprogrammation transitoire *in vivo* permet-elle de prévenir et/ou de ralentir l'apparition et la progression des marques liées à l'âge ? Peut-on ainsi prolonger l'espérance de vie en bonne santé et retarder l'apparition de pathologies liées à l'âge ? La compréhension des mécanismes sous-jacents reste une étape clé avant de pouvoir envisager une translation clinique chez l'Homme. En effet, en l'état, il est difficile d'imaginer effectuer une reprogrammation globale même transitoire directement *in vivo* chez l'Homme avec tous les risques que cela présente. L'objectif est plutôt d'utiliser les modèles animaux pour tenter de comprendre ce qu'induit en cascade l'expression des facteurs de reprogrammation *in vivo*. L'identification de facteurs clés, de voies de signalisation ou de mécanismes impliqués dans l'amélioration du phénotype *in vivo* après reprogrammation, permettra alors d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques visant ces mêmes cibles afin d'en reproduire les effets bénéfiques. Parmi les hypothèses permettant d'expliquer les effets de la reprogrammation transitoire, nous avons fait le choix d'explorer principalement les mécanismes épigénétiques ainsi que le métabolisme au sens le plus large du terme.

2.1 NOS MODELES EXPERIMENTAUX

2.1.1 Le modèle progérique reprogrammable

Au laboratoire, nous travaillons sur un modèle murin au phénotype complexe issu du croisement de deux lignées préexistantes. La lignée reprogrammable $R26^{rtTA}$; $Col1a1^{4F2A}$ permettant l'induction contrôlée des facteurs de reprogrammation OSKM, est croisée avec une lignée au phénotype de vieillissement accéléré $Lmna^{G609G}$ récapitulant le syndrome humain d'Hutchison-Gilford Progéria. Les animaux ainsi obtenus permettent l'étude des effets de la reprogrammation *in vivo* au cours du vieillissement, qui est condensé sur une période de temps réduite chez ces animaux progériques.

2.1.1.1 La lignée reprogrammable : $R26^{rtTA}$; $Col1a1^{4F2A}$

Pour l'induction des facteurs de reprogrammation *in vivo*, nous utilisons le modèle développé par Carey et al. en 2010 (Carey et al., 2010). Ce modèle murin porte une unique cassette polycistronique insérée dans le locus du collagène de type I ($Col1a1$). Cette cassette d'expression comprend les quatre facteurs de reprogrammation OSKM murins, OCT4, SOX2, KLF4, and c-MYC, qui s'expriment ainsi simultanément. Le choix du locus $Col1a1$ permet l'induction du transgène dans un grand nombre de types cellulaires somatiques dont les fibroblastes, les kératinocytes, les glandes surrénales, ou encore les précurseurs neuraux. L'expression de la cassette de reprogrammation n'est pas constitutive, celle-ci est placée sous le contrôle de l'opéron tet. Ce modèle murin dispose d'un second transgène inséré dans le locus $Rosa26$. Il s'agit du transactivateur $rtTA$, qui s'exprime de façon constitutive et ne s'active qu'en présence d'un analogue de la tétracycline, en l'occurrence la doxycycline. En présence de doxycycline le transactivateur $rtTA$ va venir se fixer sur l'opérateur tet et ainsi induire l'expression de la cassette des facteurs de reprogrammation (construction génique schématisée en Figure 13).

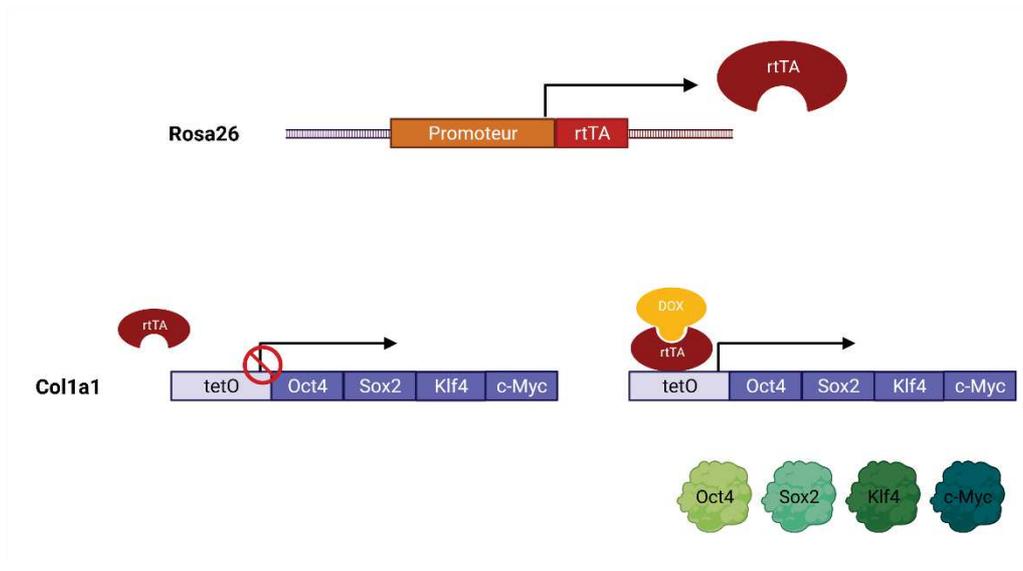


Figure 13 | Schéma de la construction génique *rtTA-4F2A* et son mode d'induction à la doxycycline

Les niveaux d'expression des facteurs de reprogrammation et la capacité à générer des cellules pluripotentes induites dépendent à la fois de la dose de doxycycline utilisée ainsi que du nombre de copies des transgènes. Lorsque les animaux ne portent qu'une seule copie de chacun des transgènes, il n'est pas possible d'obtenir des colonies d'iPSCs *in vitro* à partir des cellules d'aucun tissu adulte. La reprogrammation pour ce génotype n'a été possible qu'à partir de fibroblastes embryonnaires (MEF), pour lesquels des colonies exprimant des marqueurs de pluripotence apparaissent en 2 à 4 semaines de traitement à la doxycycline à 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans le milieu de culture *in vitro* (Carey et al., 2010). Les analyses par RT-qPCR et immunofluorescence ont démontré une expression robuste des facteurs de reprogrammation comparable à celle des ESC pour OCT4 et SOX2, et jusqu'à cinq fois supérieure pour KLF4 et c-MYC. La reprogrammation *in vitro* est possible dans de nombreux autres types cellulaires en présence de deux copies des transgènes.

2.1.1.2 La lignée progérique : *Lmna*^{G609G}

2.1.1.2.1 Le syndrome d'Hutchinson-Gilford Progéria

Cette lignée récapitule le syndrome humain d'Hutchinson-Gilford Progéria. La Progéria, ou syndrome d'Hutchinson-Gilford (HGPS), est une pathologie de vieillissement accéléré causée par une mutation génétique *de novo* au niveau du gène LMNA conduisant à la formation d'une forme tronquée de la protéine nucléaire lamine A, aussi appelée progérine. L'accumulation de progérine mène à de nombreux défauts morphologiques du noyau perturbant ainsi la fonctionnalité de cet organe, notamment vis-à-vis des processus de mitose, réplication, transcription et réparation de l'ADN, et d'organisation tridimensionnelle du génome.

Cette pathologie, touchant une naissance sur 4 à 8 millions, altère drastiquement l'espérance de vie des enfants qui survivent en moyenne jusqu'à leurs 13 ans. Ils développent dès leur première année des symptômes évoquant un vieillissement prématuré : alopecie, dermatoporose, associées à une croissance ralentie, des troubles osseux et musculaires, sans pour autant présenter d'altération de leurs capacités cognitives (Gordon et al., 1993). Ce sont généralement leurs troubles cardiovasculaires, se manifestant sous la forme d'athérosclérose, d'un infarctus du myocarde ou d'un AVC, qui sont à l'origine de leur décès prématuré.

C'est en 2003 que fut découverte la mutation à l'origine de cette pathologie par l'équipe du Dr Nicolas Lévy en France (Sandre-Giovannoli et al., 2003). Ils ont identifié une unique mutation ponctuelle située en position 1824 de l'exon 11 du gène LMNA, situé sur le chromosome 1, conduisant à une substitution du nucléotide C en T. Il s'agit d'une mutation silencieuse qui ne change donc pas l'acide aminé codé, G608G, mais qui active un site d'épissage cryptique conduisant à la formation d'une pré-protéine, appelée progérine, comptant cinquante acides aminés de moins que la pré-lamine A. La pré-lamine A subit quatre modifications post-traductionnelles afin de produire la lamine A mature : une farnésylation, un premier clivage, une carboxyméthylation et enfin un second clivage. Dans le cas de la progérine, les étapes de maturation post-traductionnelle ne peuvent se dérouler normalement car parmi les cinquante acides aminés manquants se trouve le site du second clivage (Cadiñanos et al., 2006). La progérine s'accumule donc sous forme farnésylée et en participant à la constitution de la lamina nucléaire sous cette forme inappropriée, déstabilise ainsi sa structure et altère ses fonctions et interactions.

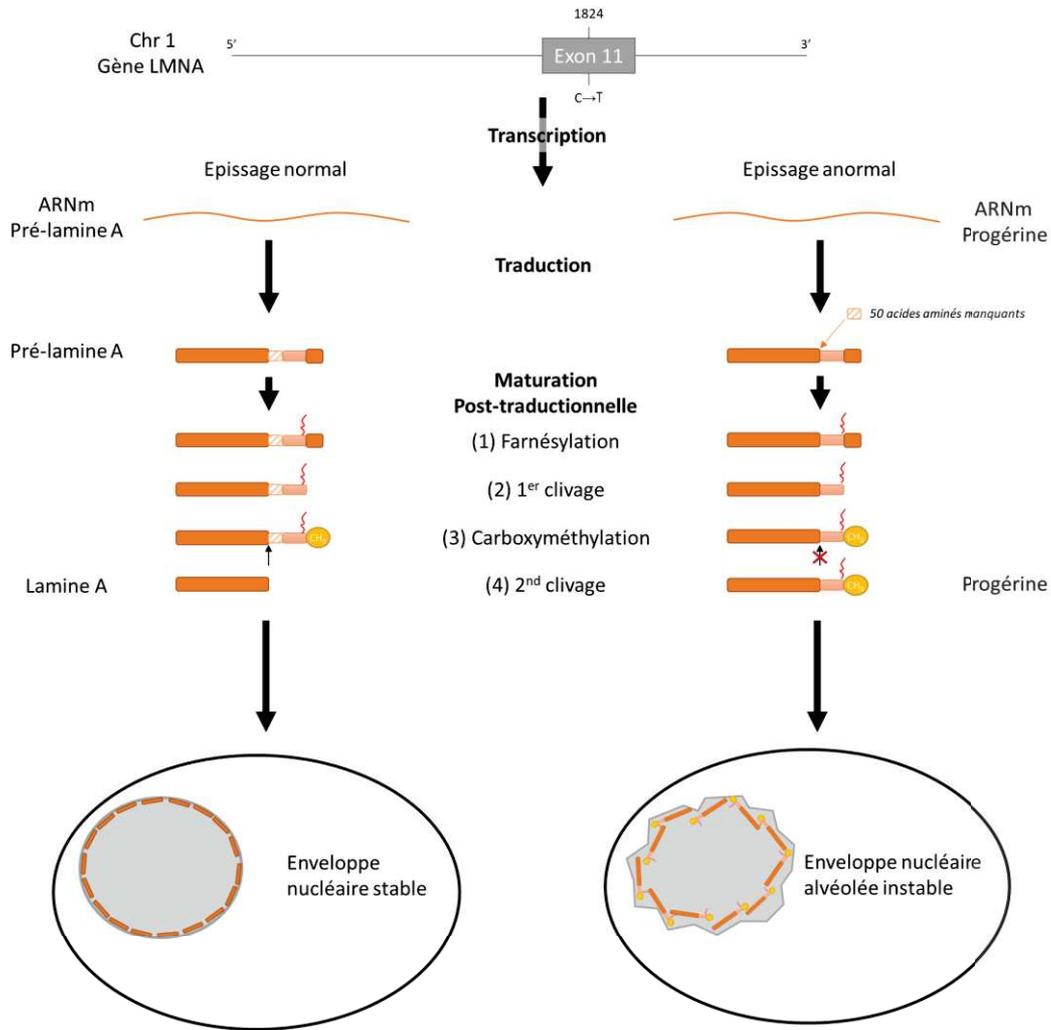


Figure 14 | Mutation génétique conduisant à la production de progérine dans le cadre du HGPS

Des études ont cherché à identifier des mécanismes communs entre syndrome progérique et vieillissement physiologique « naturel » afin de jauger la pertinence d'utiliser cette pathologie comme modèle prédictif de vieillissement (Ashapkin et al., 2019). Au niveau phénotypique, le syndrome d'Hutchinson-Gilford partage de nombreuses caractéristiques communes avec un vieillissement physiologique, hormis les atteintes cognitives et les cancers (Kreienkamp and Gonzalo, 2020). Au niveau cellulaire, l'accumulation de progérine est détectable *in vitro* dans des cellules saines par passages successifs. Chez l'Homme, des faibles niveaux de progérine peuvent être détectés dans les tissus même si la corrélation avec l'âge est faible (McClintock et al., 2007).

2.1.1.2.2 Description du phénotype chez la souris de laboratoire

La récapitulation du syndrome humain de la Progéria *in vivo* chez la souris a été décrite pour la première fois par Osorio et al. (Osorio et al., 2011b). L'introduction de la mutation ponctuelle dans le gène *Lmna* du génome murin conduit à la production de progérine, induisant des altérations tissulaires visibles en histologie ainsi que des altérations transcriptionnelles caractéristiques de la Progéria. Le phénotype du modèle murin *Lmna* mutant recoupe ainsi de nombreux aspects du phénotype pathologique humain. Les animaux doubles mutants (*Lmna*^{G609G/G609G}) présentent un retard de croissance important, visible dès les premières semaines de vie de l'animal. À l'âge de 8-10 semaines, lorsque les animaux sauvages atteignent leur taille adulte avec une masse avoisinant 25 g, les animaux homozygotes mutants atteignent difficilement les 15 g et commencent déjà à reperdre du poids. À cet âge, les animaux hétérozygotes mutants (*Lmna*^{G609G/+}) présentent un poids équivalent aux animaux sauvages, la perte de poids n'apparaît que plus tardivement autour de 25 semaines alors que les animaux sauvages maintiennent un poids de 25 g au moins jusqu'à 50 semaines. La longévité des mutants est également fortement impactée avec une longévité médiane de 103 jours, soit à peine plus de 3 mois, pour les homozygotes et 242 jours, soit environ 8 mois, pour les hétérozygotes contre plus de deux ans pour un génotype sauvage. Les animaux mutants présentent de nombreuses altérations ostéoarticulaires dont une lordose avec une courbure de la colonne très prononcée, une diminution de la densité osseuse et une augmentation de la porosité au niveau des tibias. Des anomalies cardiaques sont également notables chez les individus mutants, telles qu'une réduction du nombre de cellules musculaires lisses des vaisseaux avec un ralentissement du rythme cardiaque et une augmentation de la durée de l'onde QRS correspondant à la dépolarisation et à la contraction des ventricules. Une atrophie des organes lymphoïdes tels que la rate ou le thymus est également visible chez les individus homozygotes. Au niveau cellulaire, on observe des anomalies nucléaires, conséquence de l'accumulation de progérine, ainsi qu'une augmentation des dommages à l'ADN illustrée par l'augmentation des foyers γ H2AX. Cette instabilité cellulaire se traduit au niveau tissulaire par une augmentation des cellules positives à la SA- β -galactosidase, révélatrice de la présence accrue de cellules sénescents au sein des tissus. Au niveau circulant, les mutants présentent des anomalies de la concentration glucidique plasmatique, traduisant une hypoglycémie visible dès deux mois et sévère à trois mois chez les homozygotes et visible à huit mois chez les hétérozygotes.

Une autre étude menée par Lopez-Mejia et al. a permis de décrire plus largement les altérations métaboliques associées au phénotype progérique dans le même modèle murin à l'état hétérozygote (Lopez-Mejia et al., 2014). Dans leurs conditions d'hébergement des animaux, ils ont obtenu des résultats similaires sur la longévité bien qu'avec une espérance de vie médiane accrue pour les individus hétérozygotes, portée à 60 semaines soit 13 mois environ, mais toujours largement réduite en

comparaison de celle des sauvages, qui s'étend à 100 semaines soit 23 mois environ. L'évolution de la masse corporelle des animaux est également comparable avec un poids maximal porté à 30 g qui se maintient chez les sauvages et qui commence à décroître à partir de 25 semaines environ chez les hétérozygotes. Ils ont pu démontrer que ces variations de poids ne sont pas corrélées avec une modification de la prise alimentaire. De plus, la taille relative des organes ne varie pas entre les individus sauvages et hétérozygotes mutants. L'analyse des tissus adipeux a révélé une diminution significative de la surface graisseuse intraabdominale et une tendance non significative pour la graisse sous-cutanée. La taille des adipocytes est réduite chez les hétérozygotes mutants à la fois dans le tissu adipeux blanc et brun. La glycémie et le taux d'insuline à jeun sont réduits chez les hétérozygotes mutants en comparaison des sauvages, et sont associés à une plus grande tolérance à l'insuline et au glucose. Le contenu mitochondrial des tissus adipeux blanc et brun est augmenté chez les individus hétérozygotes mutants. La dépense énergétique globale est également modifiée à la hausse, avec une augmentation des volumes gazeux respiratoires. Le ratio d'échanges respiratoires (RER) est lui aussi augmenté chez les hétérozygotes mutants, traduisant une utilisation préférentielle des substrats glucidiques plutôt que lipidiques pour la production énergétique. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* sur des fibroblastes embryonnaires (MEF), dont le stock mitochondrial et l'activité de phosphorylation oxydative mesurée en temps réel sont plus importants chez les hétérozygotes mutants que chez les sauvages. L'analyse du profil d'expression génique du tissu adipeux blanc a également révélé un impact du génotype *Lmna* mutant sur l'expression des gènes mitochondriaux, qui pourrait être responsable des effets métaboliques observés sur l'animal entier, et en particulier, la modification de la dépense énergétique via l'expression de PGC-1 α .

2.1.2 Mise au point et validation des protocoles d'induction chronique

Au laboratoire, le travail de mise en place des conditions d'induction, notamment sur la lignée reprogrammable, a été réalisé à partir de 2015 par Camille Lemey au cours de sa thèse. Elle a pu mettre en évidence que les animaux portant deux copies de la cassette de reprogrammation, soit $R26^{rtTA/rtTA} Col1a1^{4F2A/4F2A}$, ne supportaient pas l'induction et ne survivaient pas à plus d'une semaine de traitement à la doxycycline. Ainsi, le laboratoire a décidé de travailler sur des animaux hétérozygotes ne portant qu'une seule copie du transgène OSKM, soit $R26^{rtTA/+} Col1a1^{4F2A/+}$. *In vitro*, après extraction de fibroblastes embryonnaires à partir de la lignée reprogrammable à l'état homozygote, elle a pu réaliser une reprogrammation totale. En revanche, quand les cellules étaient issues de cette même lignée mais à l'état hétérozygote, la reprogrammation totale a échoué. Ces résultats ont confirmé qu'il était plus approprié pour nos problématiques de travailler sur des animaux hétérozygotes $R26^{rtTA/+} Col1a1^{4F2A/+}$, présentant une meilleure tolérance à l'induction à la doxycycline et chez qui la reprogrammation totale était compromise.

Le projet s'est poursuivi avec la mise en place de différents protocoles de reprogrammation partielle et l'évaluation de leur impact sur la longévité des animaux. Ce travail a été assuré par Quentin Alle au cours de sa thèse commencée en 2017. Il a travaillé sur des animaux hétérozygotes progériques reprogrammables, $Lmna^{G609G/+} R26^{rtTA/+} Col1a1^{4F2A/+}$. Il a pu mettre au point deux protocoles d'induction chronique durant tout au long de la vie des animaux, de l'âge adulte à la mort (Figure 15A). Les animaux sont traités à la doxycycline dans l'eau de boisson à partir de leurs deux mois, ce qui correspond à l'entrée dans l'âge adulte chez la souris. Un premier protocole d'induction continue à 0,2 mg/mL a montré un impact positif sur la survie médiane des animaux traités, augmentée d'environ 10 semaines, passant de 42 à 52 semaines, ainsi que sur la longévité maximale dépassant 61 semaines pour les animaux traités, soit 6 semaines de plus que pour les animaux du groupe contrôle (Figure 15B, couleur bleue). Le second protocole consiste en une induction cyclique avec deux jours de traitement à la doxycycline à 1 mg/mL, suivie de cinq jours de reprise. Des résultats similaires au protocole continu ont été obtenus sur la survie médiane et l'espérance de vie maximale (Figure 15B, couleur rouge). Ces deux protocoles ont également montré un impact positif sur la perte de poids liée à l'âge, avec une masse corporelle 10 à 20% supérieure à celle des animaux contrôles sur les âges tardifs (Figure 15C).

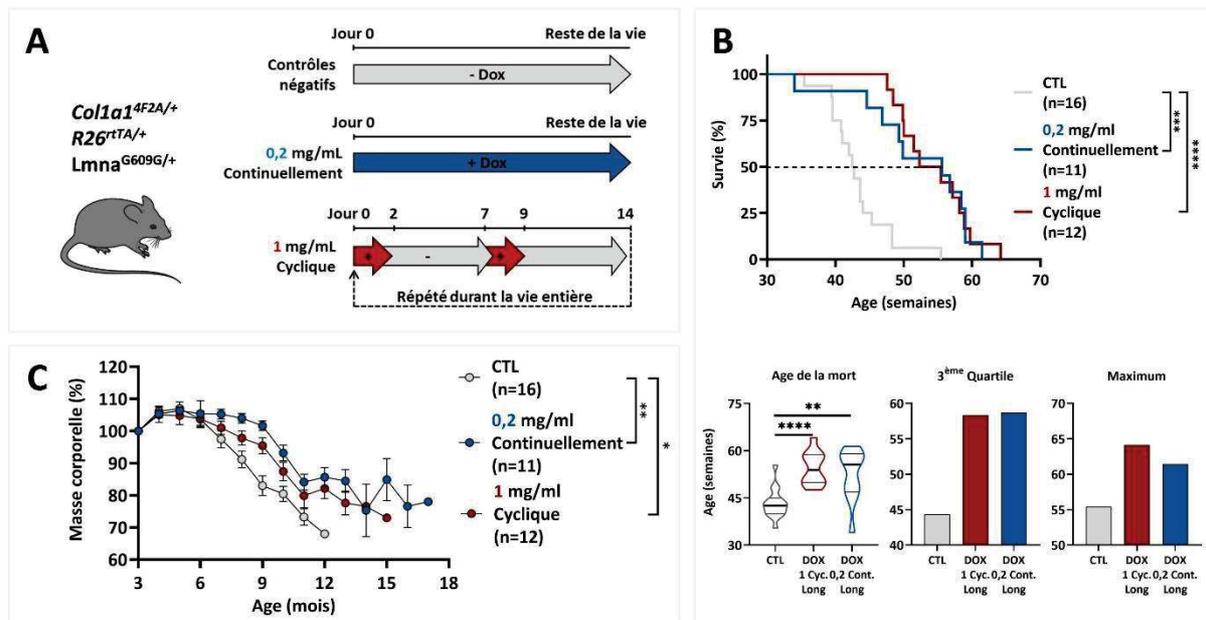


Figure 15 | Protocoles chroniques de reprogrammation transitoire in vivo et impact sur la longévité

- A. Schéma des protocoles d'induction à long terme à la doxycycline chez des animaux progériques reprogrammables (Col1a1^{4F2A/+} R26^{tTA/+} Lmna^{G609G/+}). L'induction de la cassette OSKM est réalisée sur des animaux âgés de deux mois par une administration de doxycycline dans l'eau de boisson des animaux deux jours par semaine à 1 mg/mL (flèches rouges) ou en continu à 0.2 mg/mL (flèche bleue).
- B. Courbes de survie associées aux protocoles d'induction à long terme. Les couleurs des courbes correspondent aux couleurs des protocoles d'induction associés illustrés en A. L'analyse statistique des courbes de survie a été effectuée au pourcentage de survie indiqué conformément au test de Mantel-Cox (test de log-rank). (**** p<0.0001; *** p=0.0003). Pour les diagrammes en violon (**** p<0.0001; ** p<0.01 selon des tests-t bilatéraux non paires).
- C. Courbes de poids correspondant aux protocoles d'induction à long terme. (** p<0.01; * p<0.05 selon des tests-t bilatéraux paires).

Les résultats que nous avons obtenus au laboratoire concernant la longévité des animaux sont comparables à ceux obtenus par Ocampo et al. dans leur modèle murin reprogrammable progéria homozygote (Ocampo et al., 2016). Comme nous utilisons le même modèle murin progérique mais à l'état hétérozygote, cela confirme que la reprogrammation partielle est également bénéfique dans un contexte de vieillissement accéléré plus proche du vieillissement physiologique.

2.2 IMPACT DE LA REPROGRAMMATION TRANSITOIRE SUR LE VIEILLISSEMENT

À partir de notre modèle d'animaux progériques reprogrammables, nous avons mis au point un nouveau protocole de reprogrammation transitoire précoce unique. Autrement dit, les animaux progériques reprogrammables sont traités à la doxycycline à 0,5 mg/mL dans leur eau de boisson pour induire l'expression des facteurs OSKM. Le traitement débute lorsqu'ils sont âgés de 2 mois, ce qui correspond à l'entrée dans l'âge adulte, et dure pendant 16 jours. À la suite de cette induction précoce, les animaux ne sont plus jamais traités tout au long de leur vie.

Nous nous sommes dans un premier temps, intéressés à l'impact que ce protocole de reprogrammation pouvait avoir sur la longévité de nos animaux. Est-il suffisant pour allonger l'espérance de vie des animaux comme le sont les protocoles chroniques ? Nous avons donc constitué une première cohorte destinée à l'étude de la longévité. Après induction des facteurs de reprogrammation, nous n'intervenons plus et laissons les animaux vieillir jusqu'à ce qu'ils décèdent de mort naturelle, sauf si, pour des raisons éthiques, une intervention de notre part est nécessaire, auquel cas ils sont pris en charge et exclus du groupe d'étude.

Afin de déterminer si ce protocole pouvait également avoir un effet bénéfique sur l'état de santé global des animaux, c'est-à-dire dans l'optique de promouvoir un vieillissement en bonne santé, nous avons évalué l'ultrastructure à des âges tardifs de différents tissus tels que la peau, les reins, la rate, les poumons, le foie et le cœur. Nous nous sommes également intéressés au développement de deux pathologies ostéoarticulaires associées au vieillissement, l'ostéoporose et l'arthrose, ainsi nous avons aussi prélevé les os et articulations des pattes de nos animaux. Pour ce faire, nous avons donc constitué une seconde cohorte d'animaux progériques reprogrammables. Les animaux ont suivi le même protocole de reprogrammation transitoire précoce puis ont été euthanasiés à 8 mois afin de prélever les organes à âges tardifs sans pour autant prendre le risque de perdre trop d'animaux.

2.3 PROFILAGE METABOLIQUE SUITE A UNE REPROGRAMMATION TRANSITOIRE UNIQUE PRECOCE

L'analyse des caractéristiques moléculaires au cours du temps pendant la génération des iPSCs, a révélé un changement progressif des voies métaboliques. Ainsi, au cours de la reprogrammation cellulaire, l'activité glycolytique des cellules somatiques augmente grâce à une augmentation de l'expression de gènes de la glycolyse et une stimulation des voies de signalisation de la glycolyse. Dans un même temps, le métabolisme mitochondrial est diminué par une régulation négative de gènes mitochondriaux mais également une diminution de la densité mitochondriale, entraînant une diminution de la consommation d'oxygène. Ces changements, qui sont nécessaires pour soutenir un état pluripotent, sont inversés quand des iPSCs sont différenciées, ce qui permet aux cellules d'acquérir des fonctions spécialisées. Cela suggère que, lors d'une reprogrammation cellulaire transitoire sans changement d'identité cellulaire, dans le but de rajeunir des cellules, on puisse observer une reprogrammation métabolique.

Afin d'étudier l'impact d'une reprogrammation transitoire précoce unique sur le métabolisme *in vivo* et son évolution au cours du vieillissement, nous avons mis en place un projet sur une plateforme spécialisée ; le plateau Metamus de l'animalerie de l'unité DMeM (INRAE). Le plateau dispose d'équipements uniques sur Montpellier pour l'analyse du métabolisme. Un EchoMRI™-700 permet la mesure de la composition corporelle, à savoir les masses maigre, grasse, eau libre et totale. Le plateau est également équipé de cages métaboliques permettant la mesure des échanges gazeux sur une période de temps donnée pour un individu isolé. Des équipements permettant de réaliser des tests musculaires fonctionnels, tels que le test de force d'agrippement ou le Rotarod sont également à disposition. De plus, des tests relatifs à l'étude de l'homéostasie du glucose tels que la mesure de la glycémie ou les tests de tolérance à l'insuline ou au glucose sont fréquemment réalisés sur le plateau.

Pour cette étude, nous avons constitué des cohortes d'animaux issus de notre lignée progénitrice reprogrammable à l'état triple hétérozygote, *Lmna*^{G609G/+} *R26*^{TA/+} *Col1a1*^{4F2A/+}. Ces animaux ont été soumis à notre protocole de reprogrammation transitoire précoce, à savoir une induction des facteurs de reprogrammation à 2 mois par administration de doxycycline dans l'eau de boisson à 0,5 mg/mL pendant 16 jours. Nous avons décidé de suivre les aspects suivants durant la vie des animaux avant et après induction de la reprogrammation transitoire : homéostasie du glucose (glycémie, test de tolérance à l'insuline et au glucose), composition corporelle (EchoMRI), fonction musculaire (Rotarod, Grip-test) et métabolisme respiratoire (cages métaboliques). Le suivi de la composition corporelle et de la fonction musculaire a été réalisé tous les mois. Les tests de tolérance à l'insuline et au glucose, ainsi que l'analyse du métabolisme respiratoire ont été réalisés en deux temps : post-induction (animaux âgés d'environ 3

mois) et un point tardif sur des animaux âgés d'environ 7,5 mois. Un point supplémentaire pour les cages métaboliques a été ajouté sur les animaux alors âgés de 5 mois environ. La Figure 16 schématise la chronologie et la fréquence de mesure des différents paramètres étudiés.

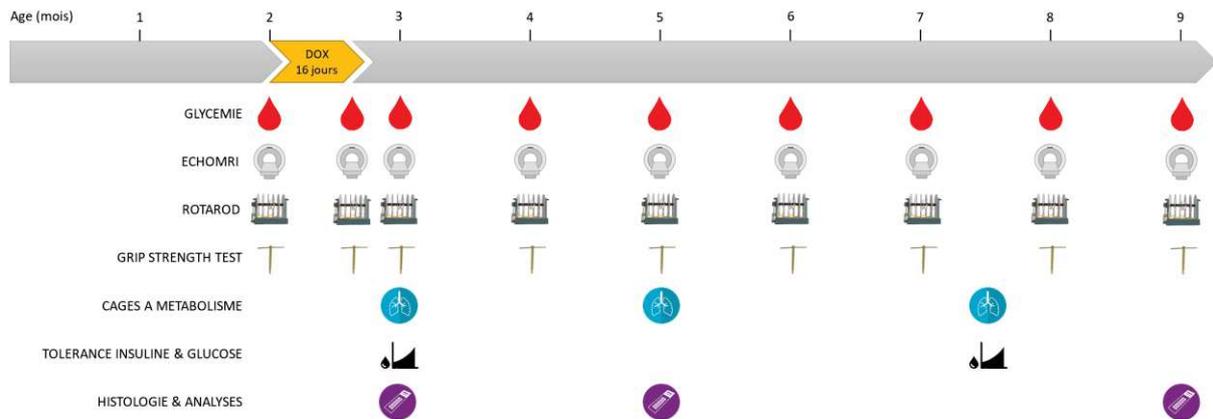


Figure 16 | Chronogramme de l'étude du profil métabolique in vivo après reprogrammation transitoire précoce

Trois cohortes ont été nécessaires pour mener à bien cette étude. Une première cohorte sur laquelle a été effectué l'ensemble des tests tout au long de leur vie, avant que les animaux ne soient euthanasiés à un âge tardif. Initialement l'euthanasie avait été programmée à 8 mois pour concorder avec les résultats obtenus par Quentin Alle sur ses prélèvements au même âge. À cause du premier confinement suite à l'épidémie de COVID-19, cela a dû être reporté d'un mois et les animaux ont été euthanasiés à l'âge de 9 mois. Deux cohortes supplémentaires ont été lancées après cette première étude, principalement afin de programmer des euthanasies à des âges différents. Ainsi une seconde cohorte a été prévue pour une euthanasie directement à la fin des 16 jours d'induction, afin de déterminer les mécanismes mis en place précocement par l'induction des facteurs de reprogrammation. Enfin, une troisième et dernière cohorte a été lancée pour une euthanasie des animaux à l'âge de 6 mois, âge qui correspond au pic des courbes de poids avant la phase de déclin (Figure 20). Chacune de ces cohortes se composait à minima de 5/6 individus mâles et autant d'individus femelles par groupe afin de pouvoir étudier séparément les effets sur les deux sexes.

3 RESULTATS

3.1 UNE REPROGRAMMATION TRANSITOIRE UNIQUE PRECOCE AMELIORE L'ETAT DE SANTE ET AUGMENTE LA LONGEVITE DES AGES TARDIFS

3.1.1 Introduction

Au laboratoire, nous avons mis en place un protocole de reprogrammation transitoire inédit. Ce protocole que nous qualifions de reprogrammation transitoire précoce, consiste en une induction des facteurs de reprogrammation OSKM unique au cours de la vie sur une période de 16 jours, débutant lorsque les animaux atteignent l'âge de deux mois. Pour cette étude, nous avons continué d'utiliser notre modèle murin progérique reprogrammable à l'état triple hétérozygote, à savoir $Lmna^{G609G/+}$ $R26^{rtTA/+}$ $Col1a1^{4F2A/+}$. Nous avons étudié les effets à long terme sur l'intégrité tissulaire suite à ce protocole de reprogrammation transitoire précoce et exploré la piste des modifications épigénétiques pour tenter d'expliquer les phénomènes observés.

3.1.2 Prépublication

Les résultats obtenus par Quentin Alle et moi-même ont été compilés pour former une publication dont nous sommes co-premiers auteurs, actuellement en cours de soumission. Vous trouverez ci-après la version de travail la plus récente.

Une version antérieure a été déposée sur la plateforme d'archivage en ligne BioRxiv, accessible en suivant ce lien : <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.05.13.443979v1> (Alle et al., 2021b).

A single short reprogramming early in life improves fitness and increases lifespan in old age

Quentin Alle^{1†}, Enora Le Borgne^{1†}, Paul Bensadoun^{1‡}, Camille Lemey^{1‡}, Nelly Béchir¹, Mélissa Gabanou¹, Fanny Estermann¹, Christelle Bertrand-Gaday^{3,7}, Laurence Pessemesse³, Karine Toupet^{1,4}, Jérôme Vialaret^{1,6}, Christophe Hirtz^{1,6}, Danièle Noël^{1,4}, Christian Jorgensen^{1,4}, François Casas^{3,7}, Ollivier Milhavel^{2,5*} and Jean-Marc Lemaître^{1,5*}

¹IRMB, Univ Montpellier, INSERM, Montpellier, France.

²IRMB, Univ Montpellier, INSERM, CNRS, Montpellier, France.

³DMEM, Univ Montpellier, INRAE, Montpellier, France.

⁴ECELLFrance Montpellier Facility, Univ Montpellier, France

⁵SAFE-iPSC Facility, CHU Montpellier, Montpellier, France

⁶PPC Facility, CHU Montpellier, Montpellier, France

⁷RAM-METAMUS, Univ Montpellier, INRAE, Montpellier, France

[†]First authors contribute equally to this work

[‡]Second authors contribute equally to this work

*Corresponding authors: Jean-Marc Lemaître (jean-marc.lemaître@inserm.fr) and Ollivier Milhavel (ollivier.milhavel@inserm.fr)

Abstract:

Recent advances in cell reprogramming showed that OSKM induction is able to improve cell physiology in vitro and in vivo. Here, we show that a single short reprogramming induction is sufficient to prevent musculoskeletal functions deterioration of mice, when applied in early life. In addition, treated mice have improved tissue structures in lung, spleen, kidney and skin, in old age, with an increased lifespan of 15%, associated to differential DNA methylation signatures. Altogether, our results indicate that a single short reprogramming early in life might initiate and propagate an epigenetically related mechanism, to promote a healthy lifespan.

Keywords:

Aging, longevity, metabolism, transient reprogramming

One Sentence summary:

A single short reprogramming early in life rejuvenates cell physiology, improves body composition, tissue fitness and increases lifespan in elderly.

Introduction:

Over the course of a human lifetime, the entry into old-age brings increased likelihood of contracting age-related diseases. The aging demographic makes this issue a central scientific concern in medicine. Aging is a complex process often punctuated by the appearance of age-related pathologies and a decrease of cell and tissue regenerative capacity. It intensifies cell and tissue vulnerability and deterioration and increases the risk of developing diseases like cancer, cardiovascular disorders, diabetes, atherosclerosis, age-related macular degeneration or neurodegeneration and ultimately precipitating death (Campisi 2013; López-Otín et al. 2013). The mechanisms causing aging are still poorly understood, making it difficult to develop prophylactic strategies to increase healthy lifespan. There are numerous molecular and cellular hallmarks of the aging process, including, cellular senescence, genomic instability, deregulated autophagy, mitochondrial dysfunction, telomere shortening, oxidative stress, systemic inflammation, metabolism dysfunctions, epigenetic alterations and stem cell exhaustion (López-Otín et al. 2013). Although many of these hallmarks have been extensively described and studied, few of them have been translated into effective therapies, with the notable exception of the removal of senescent cells, which has led to the development of senolytic drugs in humans (Childs et al. 2017). Among the described hallmarks, DNA methylation was proposed to be pertinent to evaluate the physiological age of individuals, since the deviation of predicted and chronological age correlates with all-cause mortality in human (Marioni et al. 2015; Horvath and Raj 2018) and was described to be affected by genetic, dietary, or pharmacological interventions (Field et al. 2018).

In 2006, it was shown that mouse somatic cells can be converted into pluripotent cells (iPSCs) (Takahashi and Yamanaka 2006). This process of cellular reprogramming induces a global remodeling of epigenetic landscape to revert cell identity to a pluripotent embryonic-like state. Recently, a new reprogramming method was developed using a transient expression of a nuclear reprogramming factors to promote amelioration of aging hallmarks human cells (Sarkar et al. 2020).

Previous experiments using a reprogrammable mouse model demonstrated that a cyclic induction of OSKM two days a week, over the entire extremely short lifetime of a homozygous accelerated aging mouse model, increased longevity (Ocampo et al. 2016). A short OSKM induction, was described to ameliorate immediate tissue regeneration after experimentally induced tissues injury and Although various local reprogramming induction protocols were described on different mice models to study the immediate impact on tissue fitness, they led to direct or indirect beneficial or deleterious effect (Ohnishi et al. 2014; Mosteiro et al. 2016; Ocampo et al. 2016; Chiche et al. 2017; Doeser et al. 2018; Senís et al. 2018; Olova et al. 2019; Lu et al. 2020; Rodríguez-Matellán et al. 2020; Wang et al. 2021), but whether it might increase lifespan and prevent tissues aging is an unresolved issue.

In this study, we investigate for the impact of a single short period of *in vivo* OSKM induction on aging, as pre-clinical proof of principle for a potential usage in clinic to prevent aging defects. We focused on mouse model with mild accelerated physiological aging, which have moderate lifespan and levels of progerin (Osorio et al. 2011). Surprisingly, we found that many health measures, and longevity itself, were ameliorated in elderly, by a single two and a half weeks treatment on two months old mice. As a differential DNA methylation signature is revealed at 8 months of age in several tissues, our results indicate that a single short reprogramming early in life might initiate and propagate an epigenetically related mechanism, to promote a healthy lifespan.

Results and Discussion:

A single early short transient reprogramming increases late age lifespan.

Previous experiments demonstrated that a cyclic induction of OSKM two days a week, over the entire extremely short lifetime of the homozygous accelerated aging mouse model ($Lmna^{G609G/G609G}$), increased longevity (Ocampo et al. 2016). These mice have two alleles of a mutated *Lmna* gene, producing high level of the protein Progerin, a truncated form of Lamin A, recapitulating the human phenotype of HGPS, leading to short-lived mice (Osorio et al. 2011).

As progerin is produced at low level in natural aging (Scaffidi and Misteli 2006), we considered a specific mouse model ($Lmna^{G609G/+}$) producing less progerin, to be closer to physiological aging. Whereas homozygous mice have an average lifespan of 15 weeks, heterozygous mice live around 35 weeks, presenting accelerated onset of several phenotypic alterations related to aging (Osorio et al. 2011). We crossed these mice with a homozygous transgenic murine model ($R26^{rtTA/rtTA};Col1a1^{4F2A/4F2A}$) allowing the controlled induction of the expression of OSKM factors through an rtTA trans-activator, by addition of doxycycline (DOX) in the drinking water, thus reprogramming all the animal's cells (Carey et al. 2010).

After reproducing the previously published OSKM treatment (Ocampo et al. 2016), which was to administrate 1 mg/ml DOX, two days a week, throughout life on our heterozygous progeric model (Supplementary figure 1A), we evaluated different induction protocols and we designed an extremely simplified protocol of a single period of treatment (Figure 1A), as it might be straightforward for clinical translation. We thus induced reprogramming factors by 0.2 mg/ml and 0.5 mg/ml DOX for just a single two and a half weeks treatment at two months of age. There was a very minor but non-significant effect at 0.2 mg/ml, whereas a continuous treatment at 0.2mg/ml lifelong, led to similar effects to 1 mg/ml DOX, two days a week, throughout life (Supplementary Figure 1A). However, the short more concentrated treatment at 0.5 mg/ml DOX noticeably improved lifespan in those mice. Indeed, while no difference was noticeable in median age of death, the 0.5 mg/ml doxycycline treatment remarkably increased the age of death for the third quartile from 44.3 weeks to 54.8 weeks for treated animals compared to controls. Surprisingly, this protocol also increased the maximum lifespan in the group to 66.1 weeks, which is 11 weeks longer than the longest-lived animals (Figure 1B, 1C). We finally develop this last protocol on non-progeric mice and we observed a similar significant, but smaller effect on longevity, consistent with a lower sensitivity of healthy animals. Wild type mice that survive to middle age (the third quartile) lived on average 113 weeks instead of 131 weeks in the treated group (Supplementary Figure 1B).

Collectively, these results demonstrate for the first time that a single short transient expression of reprogramming factors *in vivo* can increase lifespan of physiological and mild accelerated aging mice.

A single short reprogramming treatment ameliorates body composition and motor skills.

To gain further insight of the impact of an early treatment on aging, we decided to study the potential effect of the single short reprogramming induction protocol on organismal metabolism and its consequences. Maintenance of lean mass and mobility is a pertinent indicator of health, both in human and mice (Kyle et al. 2001). Unexpectedly, while no significant effect on the total body weight evolution was revealed (Figure 2A), we observed a highly significant lower decrease of lean mass proportion in treated progeric animals, starting early after the treatment and maintained during aging (Figure 2B). Consistently, a highly significant decrease in the percentage of fat mass accumulation was observed suggesting that a global metabolic switch is triggered by our short reprogramming protocol, early in life, leading to the amelioration of body composition in treated animal (Figure 2B).

As it generally favors healthy aging, we also evaluated the motor coordination of treated animals using the traditional increasing speed method on a rotarod (Justice et al. 2014) and we also tested muscle strength by grip tests. Both tests revealed improved motor skills in treated animal, initiated early after the treatment and maintained in aging (Figure 2C, 2D). Recently, a local chronic OSKM induction regimen in muscle was described to improve regeneration after injury by remodeling the muscle stem cell niche (Wang et al. 2021), refining previous observations suggesting a role of Pax7 muscle stem cell (Ocampo et al. 2016). Although this piece of work identified an immediate improvement of muscle regeneration after injury, it did not show long-term effect.

Consequently, our results demonstrate for the first time that a single short reprogramming induction early in life can initiate an improvement of body composition, whose positive consequences on motor skills are maintained during aging.

A single short reprogramming treatment prevent age related tissue structure deteriorations and fibrosis.

With a view to deepen our understanding of the effects of the transient reprogramming, enabled by our short treatment, we extended our analysis to a wide panel of organs to highlight macroscopic changes in their structure and integrity.

Skin, gradually loses its self-renewal potential during aging and becomes thinner, losing its properties of resistance, plasticity and elasticity, as well as its role of protective barrier (Zouboulis and Makrantonaki 2011). Strikingly our short reprogramming protocol at 0.5 mg/ml DOX induced at two months of age led to a major protective effect on skin age-related thickness atrophy with a positive impact on all skin layers observed at 8 months of age (Figure 3A). There was a 40% average thickening of the epidermis and dermis, while the fat subcutaneous superficial layer and the panniculus carnosus smooth muscle layer increased by 120%. Thus, this result demonstrates that the short reprogramming in the early life is able to delay skin deteriorations resulting in a maintained integrity at up to 8 months of age.

Idiopathic pulmonary fibrosis, most often observed in patient over 70 years of age, is a severe pulmonary impairment resulting in death, 2 to 5 years after diagnosis, from respiratory failure. Fibrosis results in excessive accumulation of extracellular matrix and remodeling of lung architecture, in particular with the filling of the alveolar space with connective tissue (Noble et al. 2012). To explore the impact of our short reprogramming on lung alterations and fibrosis, we used the validated Masson's Trichrome staining. Quantification of fibrosis, in mice treated by our short early-in-life reprogramming protocol, showed significant decrease of covered areas at 8 months of age, suggesting a protective effect on age related pulmonary deterioration (Figure 3B).

Spleen, as well as lymph nodes, is an important secondary lymphoid organ involved in immune response to pathogens and prevention of senescent cells accumulation during aging (Palacio et al. 2019). Spleen structural loss of integrity is commonly observed in the elderly, compromising the immune system efficiency. Histological analysis of the spleen revealed significant changes induced by our treatment early in life. Indeed, after scoring the architecture of the marginal zone, as presented in methods, we determined that the treated animals obtained an average score ranging from 4 to 6, characterizing a mild alteration against an average score ranging from 0 to 2 characterizing a severe alteration of the marginal zone in the control animals ($p < 0.0001$, Figure 3B). In addition, we measured a decreased fibrosis in treated mice, confirming that our short OSKM induction protocol, early in life, led to a greater maintenance of spleen integrity in elderly.

Kidneys are also affected during aging where a loss of integrity and increased fibrosis alters their function, and may result in an increased susceptibility to drug toxicity and a potentially harmful electrolyte imbalance. The histological features from the elderly include decreased cortical mass, glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, tubular atrophy, and arteriosclerosis. Our study of the renal tissue first focused on the space surrounding the glomeruli, also named the fractional mesangial area and which is known to increase during aging (Lim et al. 2012). In the group of treated mice, we measured a strong significant decrease of the fractional mesangial area of 85% on average ($p < 0.0001$) with an associated decreased fibrosis (Figure 3D).

In addition to the amelioration of the organ structure, a global decrease of fibrosis at the organismal level is observed and particularly significant in lungs, spleen and kidneys with an additional trend in liver and heart (Supplementary Figure 2).

Consequently, our data clearly demonstrated that structure and integrity of tissues, in older individuals, is positively impacted by a single short reprogramming, through the expression of OSKM, early in life.

A single short reprogramming treatment prevent age related osteoarticular diseases.

Osteoarthritis is the most common joint disease in humans and etiology of the pathology is a complex combination of hereditary and environmental determinants (Hunter and Bierma-Zeinstra 2019). At the knee level, it is characterized by an alteration of all the structures of the joint and in particular by a degradation of

the cartilage which can even go as far as a degradation of the subchondral bone. We thus wanted to assess whether there was an improvement in cartilage and bone tissue in the knees of our treated mice (Figure 4). We studied the cartilage of the lateral and median plates of the left knee by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and the subchondral bone of these same plates was analyzed by X-ray microtomography (μ -CT). The CSLM measurements revealed that the mice induced at the age of 2 months had a significantly higher volume of cartilage and a reduced cartilage surface degradation 6 months later, when compared to untreated control mice (Figure 4A). This trend was confirmed in the subchondral bone by a decrease in the degradation of the surface exemplified by a smoother appearance of the bone on the 3D reconstruction (Supplementary Figure 3A).

Another pathology commonly encountered during aging is osteoporosis. This skeletal pathology decreases bone mass and deteriorates its internal structure making it more fragile, and greatly increases the risk of fracture (Aspray and Hill 2019). The causes of osteoporosis are manifold and still mostly unknown. However consequences of subchondral bone structure alterations associated to osteoporosis might be an early event in osteoarthritis pathology (Stewart and Kawcak 2018).. To assess the level of osteoporosis in our animals, we firstly analyzed the subchondral bone subjected to alterations in microstructure in aging. We observed, a larger volume as well as a greater thickness of the bone (Figure 4B). Then, we analyzed the cortical region of two tibia by μ -CT. We were able to observe a higher bone volume and mineral density in the induced mice without any difference in bone thickness nor in its surface degradation, suggesting a lower porosity in the treated mice compared to the controls (Figure 4C, Supplementary Figure 3B).

Collectively these results demonstrated for the first time, that a single short induction of cell reprogramming factors early in life positively regulates aging features of bone by protecting from osteoarthritis and osteoporosis in later life.

Amelioration of tissue structure and function at the onset of age-related pathologies by an epigenetically related mechanism.

Previous experiments demonstrated that a cyclic induction of OSKM two days a week, over the entire lifetime of a homozygous accelerated aging mouse model, increased longevity, eventually through a chronic epigenetic remodeling of unstable histone marks (Ocampo et al. 2016). Thus, we investigate whether our induction protocol of two and a half week might engrave more permanent epigenetic marks that could explain the maintained integrity of tissues observed in aging, in following DNA methylation.

Recently, Illumina Infinium Mouse Methylation arrays covering 280 000 CpG sites, were released allowing us to investigate for differentially methylated regions across the mice genome. Consequently, we analyzed DNA methylation on the various organs studied, skin, spleen, kidney, lung, heart and liver, from 8 months-old mice and identified differentially methylated CpG signature in treated mice, specific of each organ (Figure 5A, 5B).

Interestingly, GO analysis with the genes associated to these differentially methylated sites, revealed functions related to regeneration, development and aging (Supplementary Table 1). As an example, among the 70 genes associated to the 2641 differentially methylated sites of skin, 26 genes and miRNAs are related to aging (Supplementary Table 2). Some of them are directly or indirectly involved in chromatin remodeling (Viscarra et al. 2020), DNA damage response pathways (Watanabe et al. 2013), stress resistance (Tiana et al. 2018) and longevity (Barnes et al. 2014) and some miRNAs like mir125b-1 are preferentially expressed by skin stem cells regulating self-renewal and differentiation (Zhang et al. 2011).

To further obtain a signature that could reflect the decreased physiological age of our treated mice, we included all the organs studied in the analysis and then we selected the 100 loci with the highest difference in methylation between control and doxycycline treated groups (Figure 5C, Supplementary Table 3). This highly significant signature reveals that our short induction protocol delivered at 2 months is able to memorize DNA methylated regulations correlated with a positive impact on functions of various tissues at 8 months of age.

In an attempt to develop a pan tissue “epigenetic clock” on our mild accelerated physiological aging model, we selected loci, based on their β values, corresponding to the 3 highest methylation level differences between control (CTL, n=18) and doxycycline (DOX, n=18) mice groups (Figure 5D; Supplementary Table 4). We propose that this specific signature extracted for the 280 000 loci might allow in the future to calculate

the biological age of our treated mice to evaluate the extent and propagation of tissue rejuvenated physiology triggered by our single short OSKM reprogramming protocol.

Conclusion:

Here, we discovered that a single step of cellular reprogramming at the level of the organism by a two and half weeks of treatment on two month-young heterozygotes impacts both lifespan and healthspan, protecting tissues and organs that deteriorate during aging.

Although, we cannot define precisely the mechanism involved, this indisputable ‘distal’ effect, is associated to DNA methylation changes, ultimately turning out to increased lifespan and healthspan. We propose that our OSKM induction protocol might be involved in the initiation and propagation of a favorable epigenetic memory improving cell and tissues physiology in old age.

Altogether, our results open the door to potential clinical applications based on reprogramming mRNA delivery for therapeutic intervention to prevent tissue aging deterioration and age-related pathologies.

Figures:

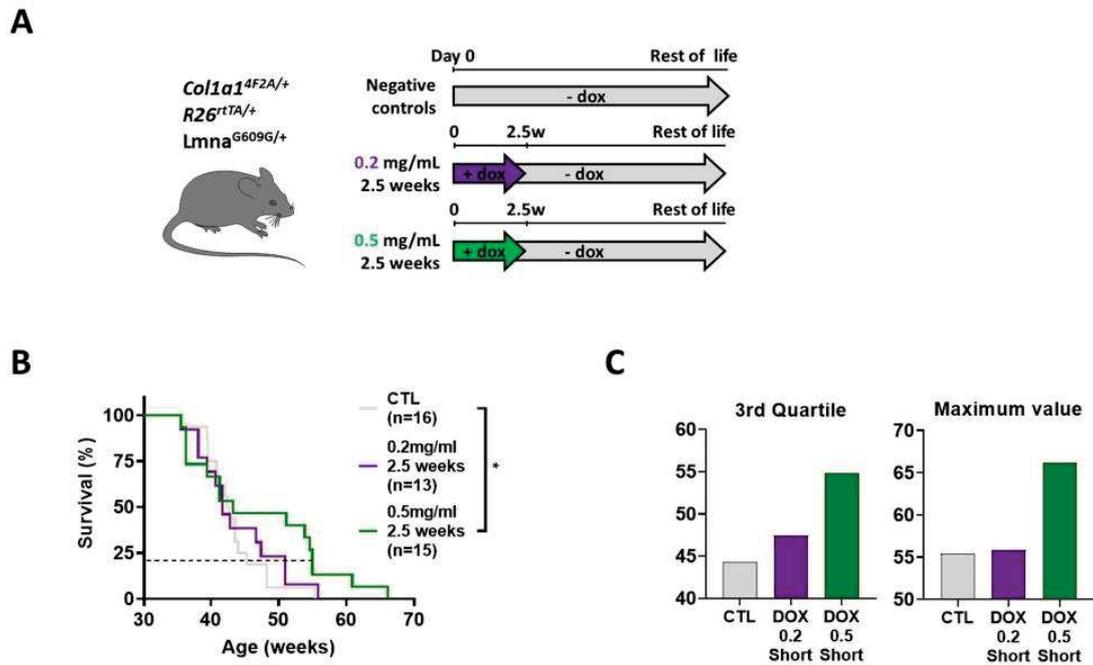


Figure 1: A single short transient OSKM induction applied early in life, increases late age lifespan.

(A) Scheme of the single short induction protocol for *R26*^{rtTA/+}; *Col1a1*^{4F2A/+}; *Lmna*^{G609G/+} heterozygous progeric mice. Mice are treated with 0.2 mg/ml or 0.5 mg/ml doxycycline for 2.5 weeks at the age of 2 months. **(B)** Survival curves of doxycycline treated mice after induction compared to untreated mice (grey curve) are presented. Statistical analysis of curves was performed at the corresponding indicated percent survival. * (p=0.0113) is according to log-rank (Mantel-Cox) test. **(C)** Median survival for the 3rd quartile and maximum lifespan value is presented.

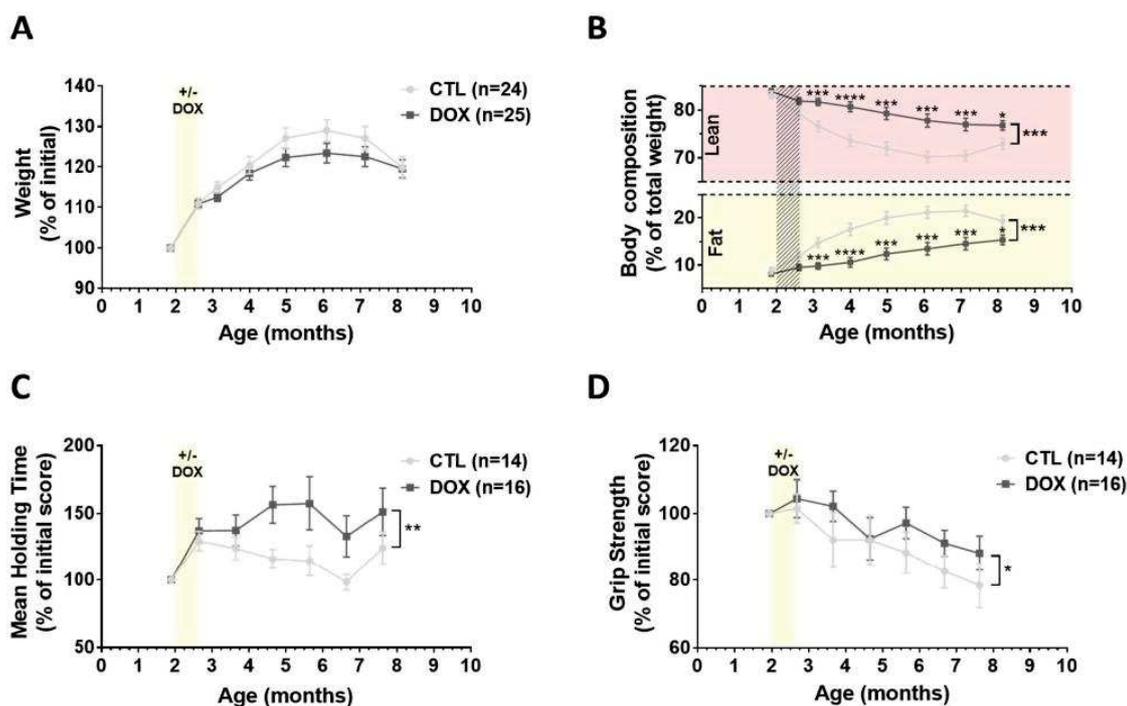


Figure 2: A single OSKM induction early in life induces healthier body composition and improves lifelong muscular capacities in progeric mice.

(A) Body weight curves of treated heterozygotes progeric mice with 0.5 mg/ml doxycycline for 2.5 weeks at the age of 2 months, compared with untreated controls. **(B)** Body composition through over life measured by EchoMRI-700. Results are expressed in percentage of total individual weight. *** p-value<0.001 is according to multiple t-test for 1 vs 1 comparisons and paired t-test for whole curves. **(C)** Rotarod Assay. Maximal time to fall (strength endurance) compared to initial individual score. ** p-value<0.01 is according to paired t-test. **(D)** Maximal Grip Strength compared to initial individual score. * p-value<0.05 is according to paired t-test on whole curves.

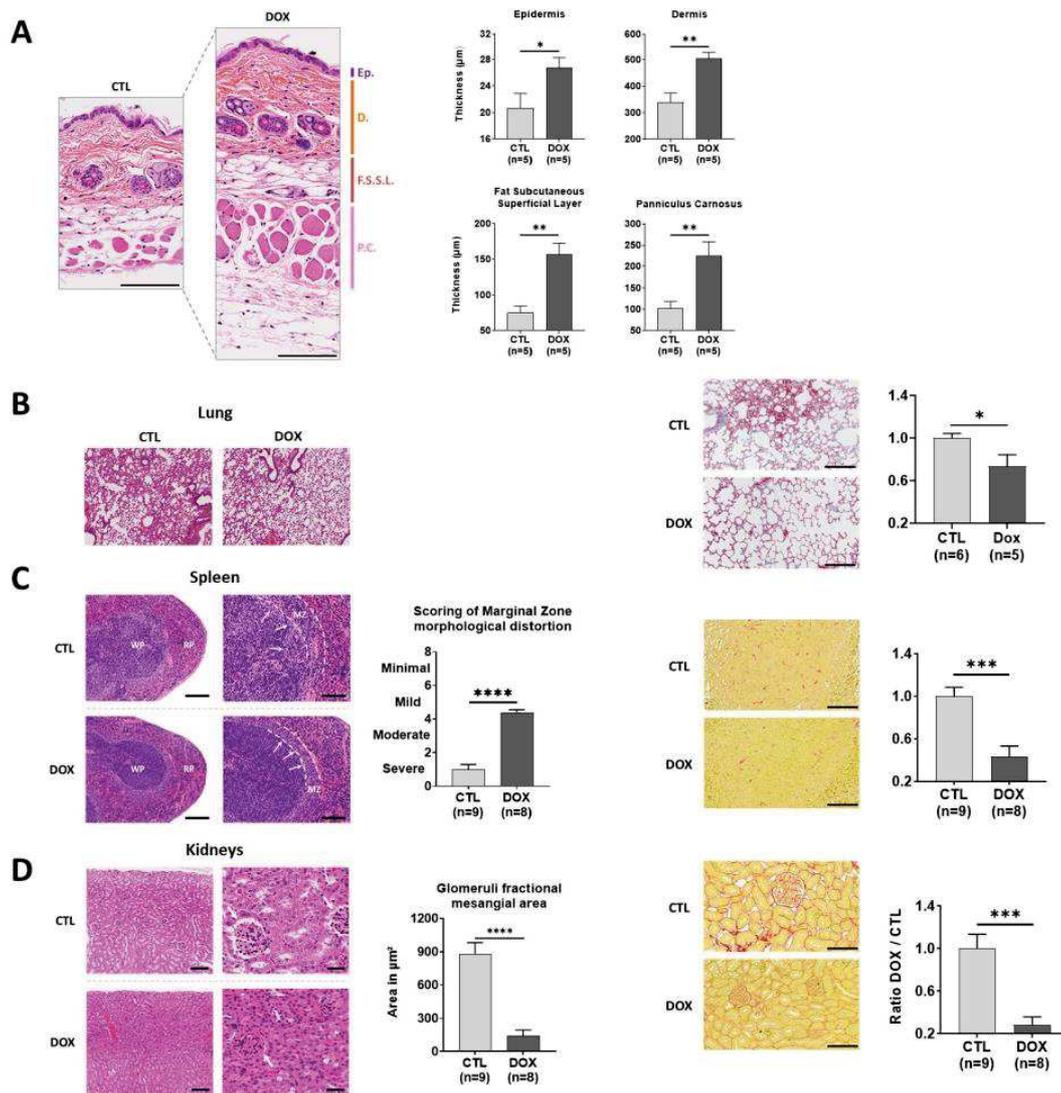


Figure 3: Tissue structure and age-related tissue fibrosis is improved in aging by a single OSKM induction early in life.

(A) Histological analyzes of skin section. Ep.: Epidermis, D.: Dermis, F.S.S.L.: Fat Subcutaneous Superficial Layer, P.C.: Panniculus Carnosus. Quantifications of skin layers thickness. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ is according to unpaired t-test, two-tailed. **(B)** Morphologic comparison of lung structure and fibrosis in treated and untreated mice. Scoring of fibrosis level is as described in methods. **(C)** Morphologic comparison of spleen. Marginal Zone (MZ) architecture and the MZ/White pulp interface distortion is depicted by the inner line. The percent radius involvement (MZ protruding into the white pulp area) is depicted by arrows and scoring was determined as described methods. The white pulp fibrosis was scored as described in the methods. **(D)** Measurement of kidney's fractional mesangial area, representing the space surrounding glomeruli (depicted by arrows) and inter-tubular fibrosis.

All tissues were analyzed on 8 months old heterozygous progeric mice. CTL represents untreated mice and DOX represents treated mice with 0.5 mg/ml doxycycline for 2.5 weeks at the age of 2 months. All Measurements of areas and distances were performed on ImageJ software. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ is according to unpaired t-test, two-tailed.

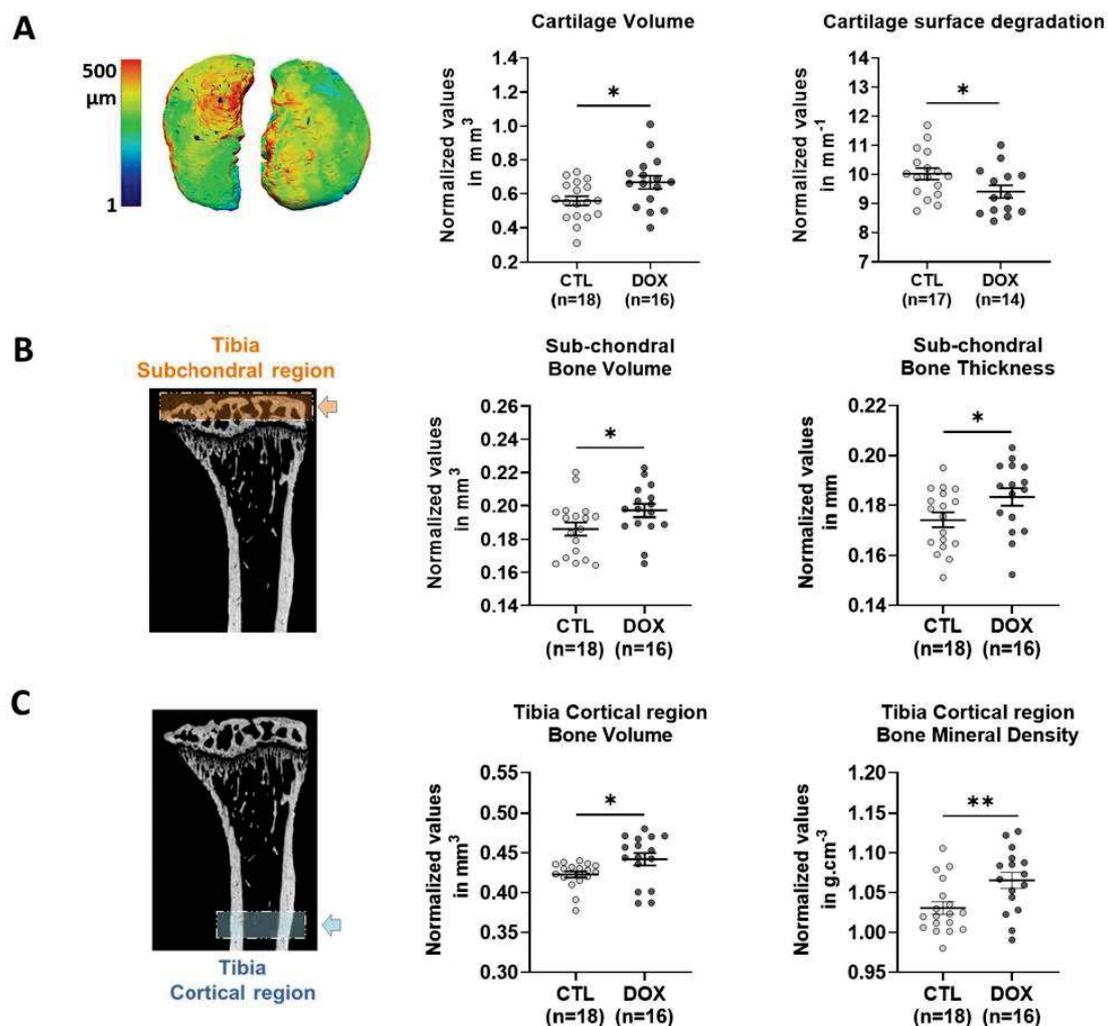


Figure 4: A single short OSKM induction early in life prevents osteoarthritis and osteoporosis in aged mice. (A) Histomorphometric analysis of 3D images of knee joint cartilage by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Cartilage volume, and surface degradation were measured in the lateral and medial plateau. * $p < 0.05$ is according to unpaired t-test, two-tailed. (B) X-ray micro-computed tomography (μ -CT). Histomorphometric analysis of left tibia sub-chondral bone, in the knee joint (orange box and arrow). Sub-chondral bone volume and thickness were measured in the lateral and medial plateau. (C) μ -CT histomorphometric analysis of tibia cortical region (blue box and arrow). Cortical bone volume and mineral density were measured on both tibias. Bone and cartilage tissues were analyzed on 8 months heterozygous progeric mice. CTL represents untreated mice and DOX represents treated mice with 0.5mg/ml doxycycline during 2.5 weeks at the age of 2 months. For μ CT analysis, ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ is according to unpaired t-test, one-tailed, with Welch's correction.

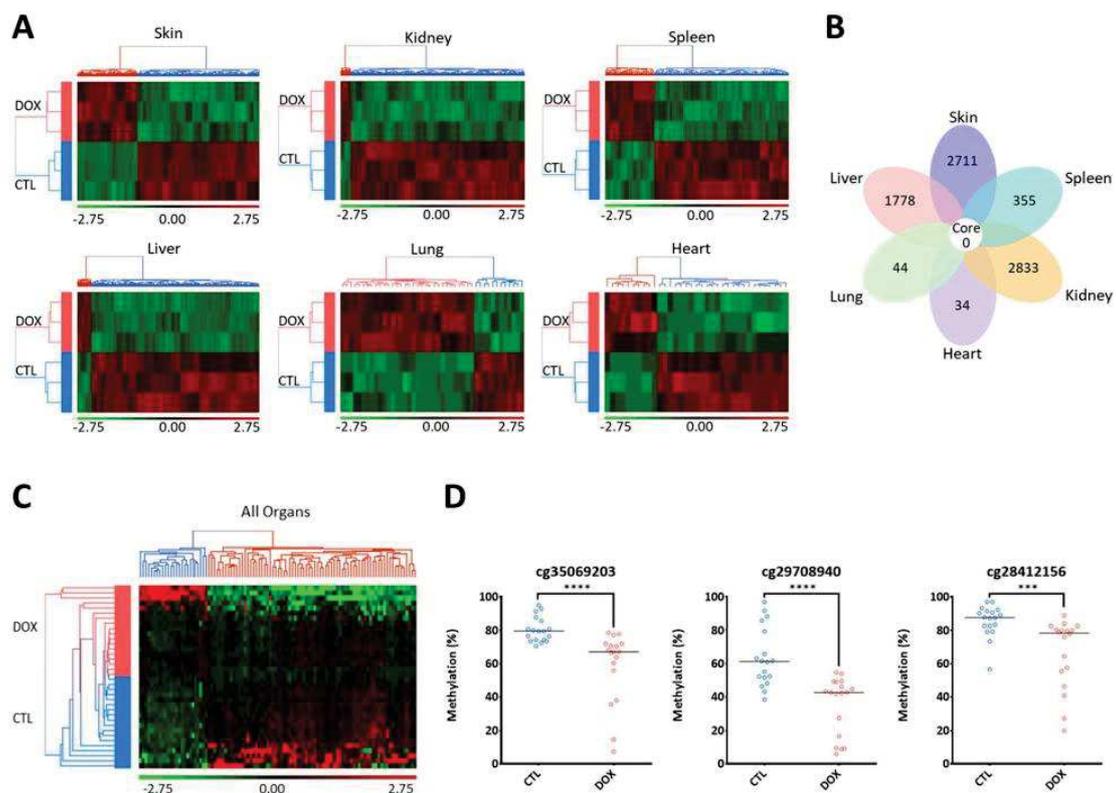


Figure 5: Differential methylation analysis of mice tissues in old age reveals an epigenetic signature set by a single short OSKM induction early in life.

(A) Supervised hierarchical clustering of differentially methylated CpG loci between doxycycline treated (DOX, n=3) and control mice (CTL, n=3) in the 6 selected tissues at analyzed at 8 months. Red and green color represent respectively hypermethylated and hypomethylated CpG Loci. **(B)** Flower diagram with the number of differentially methylated CpG for each organ. **(C)** Supervised hierarchical clustering on the 100 most significant differentially methylated CpG loci from all organs. **(D)** Scatter plot performed on CpG loci corresponding to the 3 highest methylation differences in the “all organs’ signature”. Loci methylation levels of each CpG are compared between experimental mice control group (CTL, n=18) and doxycycline treated group (DOX, n=18). Values of each group are represented by a black line. Significance of differences between control and doxycycline treated mice are indicated (Mann-Whitney test: **** p<0.0001).

Methods:

Mice model and housing

Experiments were performed on heterozygous progeric mice $R26^{rtTA/+};Col1A1^{4F2A/+};Lmna^{G609G/+}$ generated by the crossing of two lines of the following genotypes : Reprogramming mice from JAX (STOCK Gt(ROSA)26Sor^{tm1(rtTA+M2)Jae} Col1a1^{tm3(tetO-Pou5f1,-Sox2,-Klf4,-Myc)Jae/J} (JAX: 011004) in homozygous form for the two transgenes (two copies for the rtTA transactivator ($R26^{rtTA/rtTA}$) and two copies for the 4 reprogramming factors (OSKM) cassette ($Col1A1^{4F2A/4F2A}$) and progeria mice $Lmna^{G609G/+}$ (MGI: 5295747))(Osorio et al. 2011), recapitulating the human HGPS accelerated aging phenotype through the accumulation of the prelamin A truncated form, also called progerin.

The Project was validated by the Ethical committee (Agreement APAFIS #21760), and animal care and use were performed in accordance with the recommendations of the European community (2010/63/UE).

Longevity studies

OSKM induction was performed by 0.2 mg/ml or 0.5 mg/ml doxycycline in drinking water of $R26^{rtTA/+};Col1a1^{4F2A/+};Lmna^{G609G/+}$ mice, for only 2.5 weeks at the age of two months.

Body composition analysis

Mice whole-body composition (fat and lean masses) was measured every month throughout the study by quantitative magnetic resonance with a whole-body composition analyzer (EchoMRI™-700 Echo Medical Systems, Houston, TX, USA) according to the manufacturer's instructions and individually weighted before each measurement.

Functional Assays

We measured the motor coordination of mice, on a rotarod machine with automatic timers and falling sensors (47650 Rota-Rod, Ugo Basile®), set up in a ramp mode from 5 rpm to 40 rpm over 300 seconds. The latency to falling is recorded. Each animal ran 3 times for a maximal time of 10 minutes followed by 20 minutes of resting between each run once a month until time of death.

Muscular strength of mouse front legs, was performed by a vertical grip strength test (Bio-GS3, BioSeb). Mice were held by the tail, placed above the gripping bar until they grasped the bar, and pulled up until grip was released. Maximal grip force developed was measured 3 times, with a few minutes rest, in its cage between each test. A test was performed once a month until time of death.

Measurement of histopathological parameters

For the thickness measurement of the various skin layers, images with 20x digital magnification were taken on a minimum of 3 identically oriented skin sections per individual. Hundreds of measurements were then carried out for each layer of the skin.

For spleen, the architecture of the marginal zone was evaluated according to the scoring method developed previously for evaluation of age-related alteration in mice (Birjandi et al. 2011), based on percentage of distortions between the white pulp and the marginal zone. The characterization of the alteration ranges from minimal (score between 7-8) to severe (score between 0-2).

For kidney, the mesangial area around the renal glomeruli was analyzed using ImageJ software (NIH).

Tissue fibrosis

Fibrosis levels were quantified after MT staining in lungs or SR staining in spleen and kidneys. A color deconvolution procedure was applied for each, using the appropriate function available on Fiji software, based on the MRI developed plugin (http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Fibrosis_Tool). Then channels of interest were selected and the background noise was subtracted using the MaxEntropy auto-threshold method. The areas covered by fibrosis were then measured and quantified.

Cartilage degradation and bone structure evaluation

A Leica Microsystems TCS SP5-II confocal laser scanning microscope was used to acquire images of the articular cartilage of the lateral and median plateau. The cartilage was scanned in-depth (XYZ mode) using the following parameters (voxel size 6 μm , 5x dry objective and UV laser light source at 405 nm). Image stacks were used to reconstruct a 3D image of the cartilage as well as for quantification.

Osteoporosis and surface degradation were measured on the trabecular and subchondral region (lateral and median plateau in the knee joint) of the tibia. The samples were scanned by X-ray microtomography ($\mu\text{-CT}$) on a SkyScan 1176 scanner (Bruker) using CTAn software (Bruker) and the following parameters (aluminum filter, 45kV, 500 μA , resolution of 18 μm , 0.5° rotation angle). Scans were then reconstructed using NRecon software (Bruker). The 3D images of the joints were reconstructed using Avizo software (Avizo Lite 9.3.0, FEI Visualization Sciences Group).

For the $\mu\text{-CT}$ and confocal laser scanning microscopy experiments, each sample was independent and represented an experimental unit providing a unique result.

DNA methylation

Genomic DNA was extracted from lysed tissues using Invitrogen TRIzol™ reagent experimental protocol for DNA isolation (Catalog Numbers 15596026) and further processed by Life & Brain GmbH Platform Genomics for DNA methylation profiling on “Illumina Infinium Mouse Methylation arrays” according to the manufacturer’s instructions. For each CpG locus, normalized methylation levels (β values), ranging from 0 (completely unmethylated) to 1 (completely methylated) were calculated and used for differential methylation analysis between control (CTL, n=3) and doxycycline (DOX, n=3) mice group. A one-way-ANOVA statistical test was performed and the significant differentially methylated CpG loci ($p < 0.01$) were used in tissues specific hierarchical clustering and flower diagram.

Two successive statistical tests were used to select the 100 loci multi organs signature. One-way ANOVA ($p < 0.05$) followed by an additional unpaired nonparametric Mann-Whitney statistical test. CpG corresponding to the 100 most significant p-value were selected ($p < 0.0005$) and CpG presented in hierarchical clustering to illustrate the “all organs’ signature”.

CpG loci methylation values corresponding to the 3 highest methylation differences between control (CTL, n=18) and doxycycline (DOX, n=18) mice group were selected from “all organs’ signature” and represented in a scatter plot (**** $p < 0.0001$; according to unpaired – Mann-Whitney test, two-tailed).

References:

- Aspray TJ, Hill TR. 2019. Osteoporosis and the Ageing Skeleton. *Sub-cellular biochemistry* **91**: 453-476.
- Barnes VL, Bhat A, Unnikrishnan A, Heydari AR, Arking R, Pile LA. 2014. SIN3 is critical for stress resistance and modulates adult lifespan. *Aging (Albany NY)* **6**: 645-660.
- Birjandi SZ, Ippolito JA, Ramadorai AK, Witte PL. 2011. Alterations in marginal zone macrophages and marginal zone B cells in old mice. *J Immunol* **186**: 3441-3451.
- Campisi J. 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* **75**: 685-705.
- Carey BW, Markoulaki S, Beard C, Hanna J, Jaenisch R. 2010. Single-gene transgenic mouse strains for reprogramming adult somatic cells. *Nat Methods* **7**: 56-59.
- Chiche A, Le Roux I, von Joest M, Sakai H, Aguin SB, Cazin C, Salam R, Fiette L, Alegria O, Flamant P et al. 2017. Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. *Cell Stem Cell* **20**: 407-414.e404.
- Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge RM, Marquess D, Dananberg J, van Deursen JM. 2017. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov* **16**: 718-735.
- Doeser MC, Schöler HR, Wu G. 2018. Reduction of Fibrosis and Scar Formation by Partial Reprogramming In Vivo. *Stem Cells* **36**: 1216-1225.
- Field AE, Robertson NA, Wang T, Havas A, Ideker T, Adams PD. 2018. DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. *Molecular cell* **71**: 882-895.
- Horvath S, Raj K. 2018. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet* **19**: 371-384.
- Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. 2019. Osteoarthritis. *Lancet* **393**: 1745-1759.
- Justice JN, Carter CS, Beck HJ, Gioscia-Ryan RA, McQueen M, Enoka RM, Seals DR. 2014. Battery of behavioral tests in mice that models age-associated changes in human motor function. *Age (Dordr)* **36**: 583-592.

- Kyle UG, Genton L, Hans D, Karsegard L, Slosman DO, Pichard C. 2001. Age-related differences in fat-free mass, skeletal muscle, body cell mass and fat mass between 18 and 94 years. *European journal of clinical nutrition* **55**: 663-672.
- Lim JH, Kim EN, Kim MY, Chung S, Shin SJ, Kim HW, Yang CW, Kim YS, Chang YS, Park CW et al. 2012. Age-associated molecular changes in the kidney in aged mice. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2012**: 171383.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell* **153**: 1194-1217.
- Lu Y, Brommer B, Tian X, Krishnan A, Meer M, Wang C, Vera DL, Zeng Q, Yu D, Bonkowski MS et al. 2020. Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature* **588**: 124-129.
- Marioni RE, Shah S, McRae AF, Chen BH, Colicino E, Harris SE, Gibson J, Henders AK, Redmond P, Cox SR et al. 2015. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol* **16**: 25.
- Morawietz G, Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Bube A, Keane K, Halm S, Heuser A, Hellmann J. 2004. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* **55**: 433-449.
- Mosteiro L, Pantoja C, Alcazar N, Marión RM, Chondronasiou D, Rovira M, Fernandez-Marcos PJ, Muñoz-Martin M, Blanco-Aparicio C, Pastor J et al. 2016. Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* **354**.
- Noble PW, Barkauskas CE, Jiang D. 2012. Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators. *J Clin Invest* **122**: 2756-2762.
- Ocampo A, Reddy P, Martinez-Redondo P, Platero-Luengo A, Hatanaka F, Hishida T, Li M, Lam D, Kurita M, Beyret E et al. 2016. In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell* **167**: 1719-1733.e1712.
- Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T et al. 2014. Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell* **156**: 663-677.
- Olova N, Simpson DJ, Marioni RE, Chandra T. 2019. Partial reprogramming induces a steady decline in epigenetic age before loss of somatic identity. *Aging Cell* **18**: e12877.
- Osorio FG, Navarro CL, Cadiñanos J, López-Mejía IC, Quirós PM, Bartoli C, Rivera J, Tazi J, Guzmán G, Varela I et al. 2011. Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci Transl Med* **3**: 106ra107.
- Palacio L, Goyer ML, Maggiorani D, Espinosa A, Villeneuve N, Bourbonnais S, Moquin-Beaudry G, Le O, Demaria M, Davalos AR et al. 2019. Restored immune cell functions upon clearance of senescence in the irradiated splenic environment. *Aging Cell* **18**: e12971.
- Rodríguez-Matellán A, Alcazar N, Hernández F, Serrano M, Ávila J. 2020. In Vivo Reprogramming Ameliorates Aging Features in Dentate Gyrus Cells and Improves Memory in Mice. *Stem Cell Reports* **15**: 1056-1066.
- Sarkar TJ, Quarta M, Mukherjee S, Colville A, Paine P, Doan L, Tran CM, Chu CR, Horvath S, Qi LS et al. 2020. Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nat Commun* **11**: 1545.
- Scaffidi P, Misteli T. 2006. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* **312**: 1059-1063.
- Senís E, Mosteiro L, Wilkening S, Wiedtke E, Nowrouzi A, Afzal S, Fronza R, Landerer H, Abad M, Niopek D et al. 2018. AAV vector-mediated in vivo reprogramming into pluripotency. *Nature Communications* **9**: 2651.
- Stewart HL, Kawcak CE. 2018. The Importance of Subchondral Bone in the Pathophysiology of Osteoarthritis. *Frontiers in veterinary science* **5**: 178.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663-676.
- Tiana M, Acosta-Iborra B, Puente-Santamaría L, Hernansanz-Agustin P, Worsley-Hunt R, Masson N, García-Rio F, Mole D, Ratcliffe P, Wasserman WW et al. 2018. The SIN3A histone deacetylase complex is required for a complete transcriptional response to hypoxia. *Nucleic acids research* **46**: 120-133.
- Viscarra JA, Wang Y, Nguyen HP, Choi YG, Sul HS. 2020. Histone demethylase JMJD1C is phosphorylated by mTOR to activate de novo lipogenesis. *Nat Commun* **11**: 796.
- Wang C, Rabadan Ros R, Martinez-Redondo P, Ma Z, Shi L, Xue Y, Guillen-Guillen I, Huang L, Hishida T, Liao HK et al. 2021. In vivo partial reprogramming of myofibers promotes muscle regeneration by remodeling the stem cell niche. *Nat Commun* **12**: 3094.
- Watanabe S, Watanabe K, Akimov V, Bartkova J, Blagoev B, Lukas J, Bartek J. 2013. JMJD1C demethylates MDC1 to regulate the RNF8 and BRCA1-mediated chromatin response to DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 1425-1433.
- Zhang L, Stokes N, Polak L, Fuchs E. 2011. Specific microRNAs are preferentially expressed by skin stem cells to balance self-renewal and early lineage commitment. *Cell Stem Cell* **8**: 294-308.
- Zouboulis CC, Makrantonaki E. 2011. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clinics in dermatology* **29**: 3-14.

Acknowledgements:

We thank Biocampus Montpellier for technical support and expertise as well as all the staff involved for animal housing on RAM (Réseau des Animaleries de Montpellier) facilities, for metabolism experiments on RAM-Metamus platform at the DMEM laboratory, for tissue processing on RHEM (Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier) facility, on MRI (Montpellier Ressources Imagerie) platform for imaging, on the National platform ECELLFrance for μ -CT and CLSM analysis. We thank Metamontp platform supported by the European Regional Development Funds (ERDF) for EchoMRI experiments. We thank Dr Julian Venables for the edition of the manuscript.

Funding:

Research was supported by the University of Montpellier, the CHRU Montpellier and Grant from Dotation INSERM, Ligue Nationale Contre le Cancer "Equipe Labellisée (2015-2019) and from la Ligue Comité régional de l'Hérault (2020-2021).

Author contributions:

Conceptualization and Supervision: J.M.L., O.M. Funding acquisition and project administration: J.M.L. Data analysis: Q.A., E.L.B., P.B., O.M., J.M.L. Writing original draft: Q.A., E.L.B., P.B., O.M., J.M.L. Animal experiments and sample analysis: Q.A., E.L.B., C.L., O.M. Histology: Q.A. In vitro experiment: Q.A., E.L.B. RNAseq: Q.A., E.L.B. Methylome: P.B. Animal model: C.L. Bone and cartilage: Q.A., K.T., D.N., C.J. Animal metabolism profiling: E.L.B., C.B.G., L.P., F.C. Scientific and technical support: N.B., M.G., F.E.

Competing interests:

Authors declare that they have no competing interests.

Data availability:

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding authors on reasonable request.

Supplementary extended Methods:

Mice model and housing

Mice allowing *in vivo* transient reprogramming were originally developed by Rudolf Jaenisch (Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA) and purchased from Jackson Laboratories Laboratories (STOCK Gt(ROSA)26Sor^{tm1(rtTA+M2)Jae} Col1a1^{tm3(tetO-Pou5f1,-Sox2,-Klf4,-Myc)Jae/J} (JAX: 011004). These mice are bred in homozygous form for the two transgenes (two copies for the rtTA transactivator (R26^{rtTA/rtTA}) and two copies for the 4 reprogramming factors (OSKM) cassette (Col1A1^{4F2A/4F2A}). The murine line exhibiting the accelerated aging phenotype (Hutchinson-Gilford progeria syndrome) was originally developed by Carlos Lopez-Otin from University of Oviedo, Spain (Lmna^{tm1.10tin} (MGI: 5295747))(Osorio et al. 2011). This line carries the G609G mutation on the LMNA gene, leading to the activation of a cryptic splicing site and the accumulation of the prelamin A truncated form, also called progerin. This line is bred in heterozygous form for the progeria mutation (Lmna^{G609G/+}).

Experimental groups were generated by the crossing of these two lines and are represented by the following genotypes: progeric R26^{rtTA/+};Col1A1^{4F2A/+};Lmna^{G609G/+} and non-progeric R26^{rtTA/+};Col1A1^{4F2A/+};Lmna^{+/+}.

Animal care and use for this study were performed in accordance with the recommendations of the European community (2010/63/UE). The Project was validated by the Ethical committee of the French Ministry of Research through the agreement APAFIS #21760. All mice were produced at PCEA (Agreement n°A34-172-45) and transferred to the analysis platform one week before starting experiments for habituation. The procedures and protocols concerning body composition and functional analysis were performed on the Metamus platform, at the DMEM unit of the INRAE-UM in Montpellier, France (Veterinary Services National Agreement n° E34-172-10, 04 March 2019). All the others procedures and protocols were performed at INM (Agreement n° C34-172-36). Mice were housed in groups in filter-top cages with free access to standard diet (A04, SAFE diets, Augy, France) and tap water. They were maintained in a temperature-controlled room (24°C ±1°C) in a standard 12:12 light-dark cycle (lights at 7:30 am). All cages were enriched with nesting materials (cellulose squares, SAFE). Animal behavior was checked daily for welfare and health status and mice weight was monitored every two weeks. For mice subjected to body composition analysis and functional assays, cages were also enriched with a hanging red polycarbonate tunnel. This tube is equivalent to the animal holder used for EchoMRI measures and allows mice habituation to a restrained environment.

Longevity studies

To induce reprogramming in our animals, we implemented either lifelong or short induction protocols. For both, doxycycline was administered in drinking water in opaque bottles. All protocols started at the age of two months and were carried out on animals of genotype R26^{rtTA/+};Col1a1^{4F2A/+};Lmna^{G609G/+} or R26^{rtTA/+};Col1a1^{4F2A/+};Lmna^{+/+}. Two lifelong protocols were used and lasted until the animals died. The first one that we have developed consists of a lower induction at 0.2 mg/ml of doxycycline, maintained continuously every day of life. In addition to this, two short induction protocols were developed. Both consists in inducing animals for only 2.5 weeks at the age of two months, at 0.2 mg/ml of doxycycline for the first and 0.5 mg/ml for the second. The last one was also developed on non-progeric animals of genotype R26^{rtTA/+};Col1a1^{4F2A/+};Lmna^{+/+}.

Body composition analysis

Mice whole-body composition (fat and lean masses) was measured every month throughout the study by quantitative magnetic resonance with a whole-body composition analyzer (EchoMRI™-700 Echo Medical Systems, Houston, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. Mice were individually weighted before each measurement.

Functional Assays

To measure the motor coordination of mice, we used a rotarod machine with automatic timers and falling sensors (47650 Rota-Rod, Ugo Basile®). We set up the machine in ramp mode from 5 rpm to 40 rpm over 300 seconds. Before acquiring the initial data, 2 month-old mice were accustomed and trained once on the

rotarod machine. Then they performed a test once a month until time of death. All mice were placed on the 3 cm diameter fluted cylinder, the run started at 5 rpm for a few seconds until all mice were facing the running direction and then the rotating speed increased. We recorded the latency to falling of each animal. The animals were placed back in their cages directly after falling from the cylinder. Each animal ran 3 times for a maximal time of 10 minutes followed by 20 minutes of resting between each run.

To assess the muscular strength of mouse front legs, we performed a vertical grip strength test (Bio-GS3, BioSeb). Before acquiring the initial data, 2 months-old mice were accustomed and trained once on the machine. Then they performed a test once a month until time of death. Mice were held by the tail and placed above the gripping bar until they grasped the bar. Then the animal was pulled up until grip was released. We recorded the maximal grip force developed. Each animal was submitted to the test 3 times, with a few minutes rest, in its cage between each test. The test was always performed by the same experimenter.

Tissue sampling and preparation

In these experiments, animals of the short-term OSKM induction group (0.5 mg/ml of doxycycline at 2 months for 2.5 weeks and untreated controls) were sacrificed at 8 months following an ethical and authorized procedure, 6 months after the end of the induction. Nine controls animals and eight treated animals with both sexes were used in these studies.

Organs were removed and dissected according to RITA standardization procedures (Morawietz et al. 2004). The samples intended for tissue structure analysis were fixed in 4% PFA, for 24 h at room temperature, then washed three times in 1X PBS and stored in 70% EtOH at 4°C before staining.

At the same time, tissue samples were also snap-frozen in liquid nitrogen for protein and RNA content analysis. The samples were placed in 1.5 ml tubes with stainless steel beads of different sizes (1 x 3mm, 2 x 2mm and 4 x 1mm in diameter) and ground in an adequate buffer using the Qiagen MixerMill MM300 tissue lyser. More details are available in dedicated sections.

For cartilage and bone analysis, whole hind legs were fixed in 4% PFA for 7 days at room temperature, washed three times with 1X PBS and stored in 70% EtOH at 4°C. The soft tissues were removed manually before analysis.

Histological staining

Stainings were carried out by the Montpellier Experimental Histology Network platform (RHEM) using standardized procedure based on Leica Autostainer XL technology. For each organ sample, 3 µm of thickness slices were produced and mounted on slides. For each animal sampled, Hematoxylin, Eosin and Saffron (HES) staining was performed to assess the of tissue's structural parameters. Sirius Red (SR) and Masson's Trichrome (MT) staining were also used to measure the fibrosis level in those tissues. All slides were scanned by the Montpellier Ressources Imagerie platform (MRI), using a Hamamatsu Photonics NanoZoomer, fitted with a dry x40 objective. NDP.view2 software (Hamamatsu) was used for viewing virtual scans for image acquisition. For all the experiments, acquisition and display settings were identical between each sample to guarantee a reliable quantification.

Measurement of histopathological parameters

The architecture of the marginal zone was evaluated according to the scoring method developed previously for evaluation of age-related alteration in mice (Birjandi et al. 2011). For each animal 5 to 8 whole white pulp follicles were analyzed. For each of them, the percentage of distortion of the interface between the white pulp and the marginal zone was measured and assigned a score of 1 to 4. In addition to this, the percentage of radial distortion, representing the advance of the marginal zone towards the center of the follicle, was also measured and assigned a second score from 1 to 4. These two scores were then added together to obtain the final score characterizing the alteration of the marginal zone of the follicle. The characterization of the alteration ranges from minimal (score between 7-8) to severe (score between 0-2).

To calculate the mesangial area around the renal glomeruli, 10 to 22 glomeruli were analyzed per animal. The measurement was performed using ImageJ software (NIH).

For the thickness measurement of the various skin layers, images with 20x digital magnification were taken on a minimum of 3 identically oriented skin sections per individual. Hundreds of measurements were then carried out for each layer of the skin. All distance measurements were made with ImageJ.

Tissue fibrosis

Images were analyzed on ImageJ software equipped with the Fiji processing software using an automated analysis script developed within the laboratory. MT Staining was used to quantify pulmonary fibrosis, and the SR staining was used to measure fibrosis in the kidneys, spleen and heart. A color deconvolution was applied according to the following parameters (Colour_1 R: 0.7995107, G: 0.5913521, B: 0.10528667; Colour_2 R: 0.099971585, G: 0.73738605, B: 0.6680326; Colour_3 R: 0.59227383, G: 0.3264422, B: 0.73669) for each MT image, using the appropriate function available on Fiji. For all RS images the color deconvolution parameters were set as follow (Colour_1 R: 0.148, G: 0.772, B: 0.618; Colour_2 R: 0.462, G: 0.602, B: 0.651; Colour_3 R: 0.187, G: 0.523, B: 0.831) based on the MRI developed plugin (http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Fibrosis_Tool). Then channels of interest were selected and the background noise was subtracted using the MaxEntropy auto-threshold method. The areas covered by fibrosis were then measured and quantified.

Pulmonary fibrosis was quantified in the superior and inferior right lobes and in the left lobe with 20x digital magnification. Cardiac fibrosis was quantified in the left ventricle. Fibrosis in the spleen was measured in white pulp follicles with a 40x digital magnification. Renal fibrosis was measured in the cortex, medulla and papillae with 20x digital magnification.

Bone structure evaluation

Osteoporosis and surface degradation were measured on the trabecular and subchondral region (lateral and median plateau in the knee joint) of the tibia. The samples were scanned by X-ray microtomography (μ -CT) on a SkyScan 1176 scanner (Bruker) using CTAn software (Bruker) and the following parameters (aluminum filter, 45kV, 500 μ A, resolution of 18 μ m, 0.5° rotation angle). Scans were then reconstructed using NRecon software (Bruker).. The 3D images of the joints were reconstructed using Avizo software (Avizo Lite 9.3.0, FEI Visualization Sciences Group).

Cartilage degradation

A Leica Microsystems TCS SP5-II confocal laser scanning microscope was used to acquire images of the articular cartilage of the lateral and median plateau. The cartilage was scanned in-depth (XYZ mode) using the following parameters (voxel size 6 μ m, 5x dry objective and UV laser light source at 405 nm). Image stacks were used to reconstruct a 3D image of the cartilage as well as for quantification.

Statistical analyses

For the μ -CT and confocal laser scanning microscopy experiments, each sample was independent and represented an experimental unit providing a unique result.

Statistical analyzes were performed with Prism 7 software (GraphPad). In all histograms, data are presented as the mean \pm SEM. For the comparisons of two groups, an unpaired (*in vivo*) or paired (*in vitro*) t-test was used. For the comparisons of the survival curves a log-rank test (Mantel-Cox) was used. For the hair recovery experiment a Chi-square test was used. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

DNA methylation

Genomic DNA (gDNA) was extracted from animal lysed tissues using Invitrogen TRIzol™ reagent experimental protocol for DNA isolation (Catalog Numbers 15596026) enabling to isolate sequentially RNA, DNA and proteins from the same sample. gDNA was further processed by Life & Brain GmbH Platform Genomics for DNA methylation profiling. Briefly, bisulfite conversion was performed on qualified gDNA and DNA Methylation levels were measured on “Illumina Infinium Mouse Methylation arrays” according to the manufacturer’s instructions. This new array quantitatively targets over 280 000 CpGs sites across the mice genome. Methylation and Gene Ontology (GO) analysis were conducted using Partek® Genomics Suite®

software. We used Illumina's standard normalization with filtering option to exclude probe on sexual chromosomes and low-quality probes based on p-value detection. For each CpG locus, normalized methylation levels (β values), ranging from 0 (completely unmethylated) to 1 (completely methylated) were calculated and used for differential methylation analysis between control (CTL, n=3) and doxycycline (DOX, n=3) mice group.

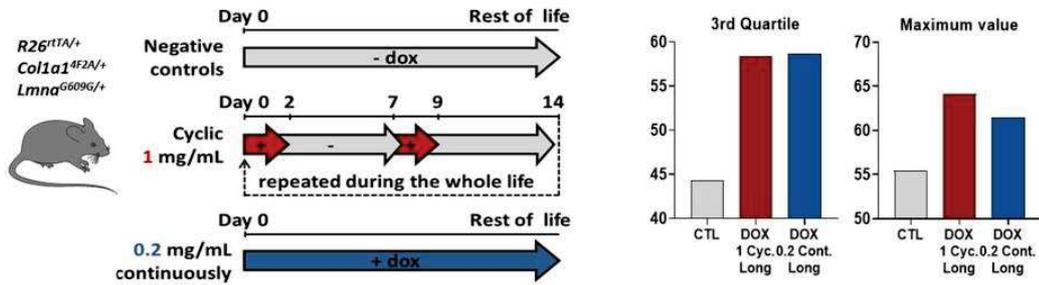
A one-way-ANOVA statistical test was performed on log2 converted β values ($M \text{ value} = \log_2(\beta/(1-\beta))$). The significant differentially methylated CpG loci ($p \leq 0.01$) were used in tissues specific hierarchical clustering, flower diagram and GO analysis.

Two successive statistical tests were used to select the 100 loci multi organs signature. One-way ANOVA ($p < 0.05$) CpG was first applied on M value followed by an additional unpaired nonparametric Mann-Whitney statistical test on the corresponding β values. CpG corresponding to the 100 most significant Mann-Whitney p-value were selected ($p < 0.0005$) and CpG represented in hierarchical clustering to illustrate this "all organs' signature".

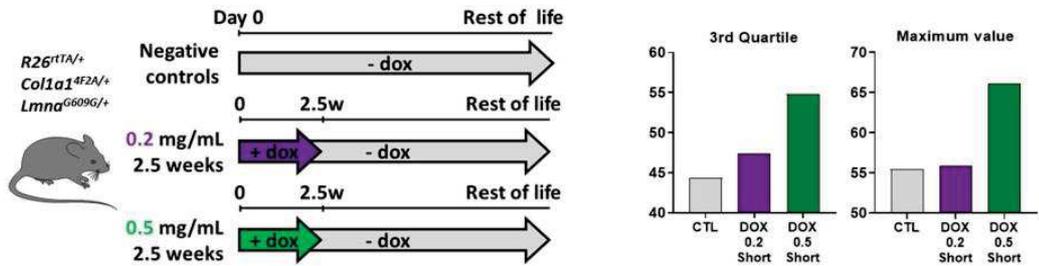
CpG loci β values corresponding to the 3 highest methylation differences between control (CTL, n=18) and doxycycline (DOX, n=18) mice group were selected from "all organs' signature" and represented in a scatter plot (**** $p < 0.0001$; according to unpaired – Mann-Whitney test, two-tailed).

Supplementary Figures:

A

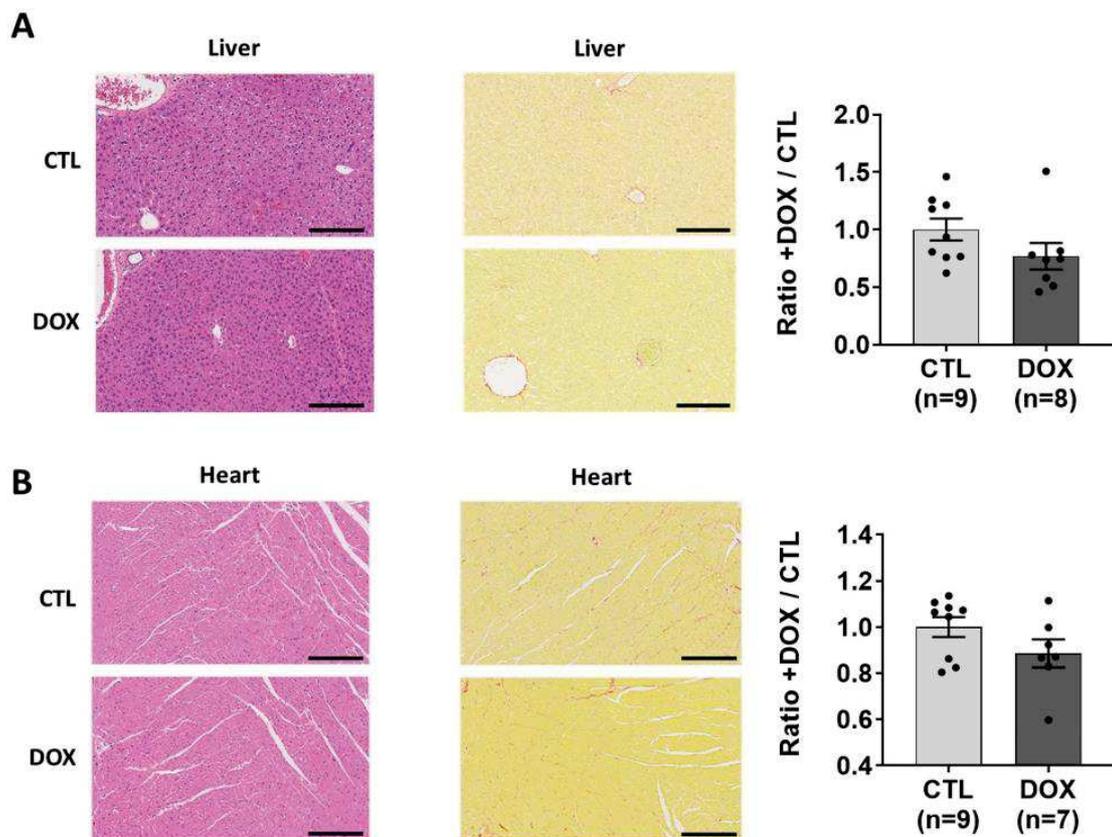


B



Supplementary Figure 1: Longevity parameters of continuous and single short OSKM induction protocols.

(A) Lifelong OSKM induction protocols were performed on progeric *R26^{rtTA/+}; Col1a1^{4F2A/+}; Lmna^{G609G/+}* mice by administrating 0.2 mg/ml doxycycline in the drinking water either continuously (blue curve) or a chronically 2 days a week at 1mg/ml, started at 2 months old and maintained over the entire life, as previously published (Ocampo et al. 2016)(red curve). Survival curves of doxycycline-treated mice compared to untreated mice (grey curve) with the same genotype are presented. **(B)** Single short OSKM doxycycline induction protocols, administrating 0.5 mg/ml doxycycline in the drinking water during 2.5 weeks at 2 months old for *R26^{rtTA/+}; Col1a1^{4F2A/+}; Lmna^{+/+}* non progeric mice. **** p<0.0001; ** p<0.01 * is according to unpaired t-test, two tailed.



Supplementary Figure 2: Tissue structure and age-related tissue fibrosis is improved in aging by a single OSKM induction early in life.

Histological analyzes of Liver **(A)** and heart **(B)** sections were performed after staining with Hematoxylin, Eosin and Saffron (HES) and fibrosis after Red Sirius (RS) and Masson's Trichrome (MT) staining. Both staining was used to detect collagen fibers and stained areas were measured after color deconvolution as described in methods section. **(A)** Morphologic illustration of liver tissue structure and fibrosis analysis in treated and untreated mice. **(B)** Morphologic illustration of heart left ventricle tissue structure and fibrosis analysis in treated and untreated mice. All tissues were analyzed on 8 months old $R26^{rtTA/+};Col1a1^{4F2A/+};Lmna^{G609G/+}$ progeric mice. CTL represents untreated mice and DOX represents treated mice with 0.5 mg/ml doxycycline during 2.5 weeks at the age of 2 months following short-induction protocol. All Measurements of areas and distances were performed on ImageJ software. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ according to unpaired t-test, two-tailed.

Supplementary Figure 3: A single short OSKM induction, early in life, prevents osteoarthritis and osteoporosis in age mice.

(A) Representative 3D reconstruction of sub-chondral bone is represented on the upper right corner of the panel. Rough appearance is representative of bone degradation. Sub-chondral bone surface degradation was measured in the lateral and medial plateau. **(B)** μ -CT histomorphometric analysis of tibias cortical region (blue box and arrow). Cortical bone thickness and surface degradation were measured on both tibias. Bone tissues were analyzed on 8 months old $R26^{rtTA/+};Col1a1^{4F2A/+};Lmna^{G609G/+}$ progeric mice. CTL represents untreated mice and DOX represents treated mice with 0.5 mg/mL doxycycline during 2.5 weeks at the age of 2 months following short-induction protocol. * $p < 0.05$ according to unpaired t-test, one-tailed, with Welch's correction.

Supplementary Table 1: List of genes associated to the differentially methylated loci in the different organs

The table summarizes the genes associated to the differentially methylated loci, between experimental mice control group (CTL, n=3) and doxycycline treated group (DOX, n=3), in the different organs. “Ensembl Transcripts release 100” was chosen as annotation database. Promoter region was configured as 5000 base pairs upstream and 3000 base pairs downstream from the transcription start site (TSS).

Supplementary Table 2: List of genes associated to the differentially methylated loci in skin and belonging to aging Go term by tissue.

The table summarizes the genes associated to the differentially methylated loci in skin belonging to Aging Go term that are found by the global Gene Ontology analysis performed on significant ($p < 0,01$) differentially methylated CpG loci between experimental mice control group (CTL, n=3) and doxycycline treated group (DOX, n=3).

Supplementary Table 3: List of the 100 selected CpG loci for all organs.

The table summarizes the hundred most significant loci selected for their highest methylation differences between control (CTL, n=18) and doxycyclin (DOX, n=18) mice group among “all organs’ signature” (see Figure 5C).

Supplementary Table 4: List of genes associated to the 3 best differentially methylated loci.

The table summarizes the genes associated to CpG loci corresponding to the 3 highest methylation differences between control (CTL, n=18) and doxycycline (DOX, n=18) mice group among “all organs’ signature” (see Figure 5D). “Ensembl Transcripts release 100” was chosen as annotation database. Promoter region was configured as 5000 base pairs upstream and 3000 base pairs downstream from the transcription start site (TSS).

3.1.3 Impact d'une reprogrammation transitoire précoce sur le vieillissement

Jusqu'alors, la démonstration des bienfaits d'une reprogrammation transitoire *in vivo* n'avait été faite que selon un protocole d'induction chronique nécessitant une intervention hebdomadaire (Ocampo et al., 2016). Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence l'efficacité de protocoles de reprogrammation transitoire alternatifs, dont en particulier un protocole condensé consistant en une induction courte et unique au début de la vie des animaux. Dans notre modèle murin progérique reprogrammable, à l'état triple hétérozygote soit $Lmna^{G609G/+} R26^{rtTA/+} Col1a1^{4F2A/+}$, nous avons pu mettre en évidence qu'une reprogrammation transitoire unique précoce, consistant en 16 jours de traitement à la doxycycline à 0,5 mg/mL dans l'eau de boisson à l'âge de 2 mois, était suffisante pour améliorer la longévité des âges tardifs, avec un gain de 10 semaines au 3^e quartile ainsi qu'une longévité maximale augmentée de 11 semaines. Ce protocole s'est également avéré efficace indépendamment du contexte progérique dans le même modèle murin reprogrammable (Figure 17). Ainsi, lorsque ce protocole est appliqué sur des souris sauvages reprogrammables, toujours à l'état hétérozygote $R26^{rtTA/+} Col1a1^{4F2A/+}$, il permet également une amélioration significative de la longévité des âges tardifs avec un gain de 18 semaines au 3^e quartile.

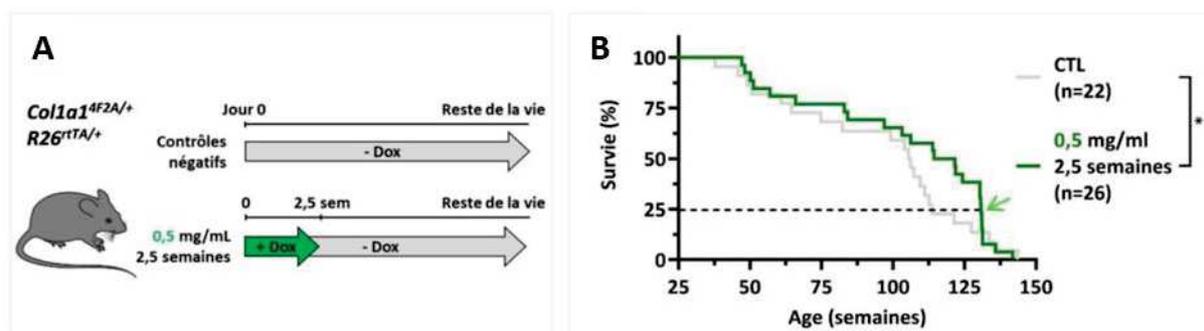


Figure 17 | Courbe de survie associée au protocole d'induction transitoire précoce sur animaux sauvages

Bien que ces résultats soient extrêmement encourageants quant à l'efficacité de notre protocole de reprogrammation transitoire dans un contexte de vieillissement physiologique, ils révèlent également toute la difficulté d'une telle étude chez des animaux dont la survie médiane s'élève à plus de 100 semaines, soit plus de deux ans.

L'intérêt des stratégies anti-âge ne consiste pas seulement en une amélioration de la longévité, assurant ainsi une vie plus longue, mais surtout en une amélioration de l'espérance de vie en bonne santé, c'est-à-dire ralentir l'apparition des dysfonctionnements liés à l'âge. Le suivi de la composition corporelle des animaux a révélé une morphologie assainie maintenue sur le long terme avec une diminution de la proportion de masse grasse au profit d'une augmentation de la masse maigre, se traduisant au niveau

fonctionnel par une amélioration des capacités musculaires. De plus, nous nous sommes intéressés à l'ultrastructure de différents tissus, dans lesquels les effets de l'âge sont largement décrits. Ainsi nous avons pu mettre en évidence à des âges tardifs, que la structure et ainsi probablement la fonction tissulaire, de la peau, des reins, de la rate, et des poumons étaient préservée à la suite d'une reprogrammation transitoire précoce. Enfin, au niveau ostéoarticulaire, notre protocole permettait également de prévenir la sévérité de deux pathologies liées à l'âge, l'arthrose et l'ostéoporose. Ces résultats confirment qu'une reprogrammation transitoire précoce a, non seulement, des effets bénéfiques sur la longévité, mais également sur l'état de santé global des animaux, et notamment, ces effets sont toujours visibles/observables au niveau tissulaire des mois après la fin du protocole et l'arrêt de l'expression des facteurs OSKM. Ainsi, il semble indéniable que l'induction de l'expression des facteurs de reprogrammation initie un ou plusieurs processus pérennes qui permettent l'obtention d'effets à long terme.

Il existe plusieurs hypothèses permettant d'expliquer les effets à long terme d'une reprogrammation transitoire unique précoce, et ces dernières ne sont pas nécessairement exclusives les unes des autres (Figure 18). La première repose sur l'idée que l'induction de l'expression des facteurs de reprogrammation, bien que transitoire, induirait des modifications épigénétiques qui se stabiliseraient et seraient ainsi maintenues tout au long de la vie. Les mécanismes épigénétiques interviennent en effet dans la régulation de nombreux processus biologiques tels que le cycle cellulaire, la survie ou encore la différenciation. Ainsi la modification du profil épigénétique dans un ou plusieurs tissus pourrait avoir des impacts fonctionnels importants sur la physiologie tissulaire. Une seconde hypothèse repose sur l'idée qu'au cours et/ou à la suite de la reprogrammation, l'expression des facteurs OSKM va induire un stress au niveau cellulaire et tissulaire en générant entre autres, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des dommages à l'ADN conduisant à la formation de cellules sénescents. Ces cellules sénescents vont alors être reconnues par le système immunitaire, parfaitement fonctionnel à des âges précoces, lui apprenant ainsi de façon préventive à gérer la sénescence cellulaire. Ainsi, lorsqu'au cours du vieillissement, les cellules sénescents vont progressivement s'accumuler, le système immunitaire sera plus compétent pour les éliminer, étant donné qu'il y aura déjà été confronté. Cette hypothèse rejoint une hypothèse hormétique qui consisterait à dire qu'une confrontation précoce au stress de la reprogrammation stimulerait les réponses de notre organisme aux différents stress rencontrés au cours du vieillissement. Une troisième hypothèse repose sur les cellules souches. On peut imaginer que l'induction des facteurs de reprogrammation, même si celle-ci reste partielle et ne remonte donc pas jusqu'à la pluripotence, aurait un impact sur les niches de cellules souches tissulaires. Ainsi, en augmentant leur nombre, ou bien en les stimulant, la reprogrammation permettrait d'optimiser nos stocks de cellules souches et ainsi de mieux répondre aux besoins régénératifs avec l'avancée en âge.

Enfin, une quatrième hypothèse suggère qu'une reprogrammation transitoire induirait, tout comme cela a été démontré pour une reprogrammation totale, une transition métabolique globale permettant ainsi de gérer au mieux les besoins et les réponses de l'organisme.

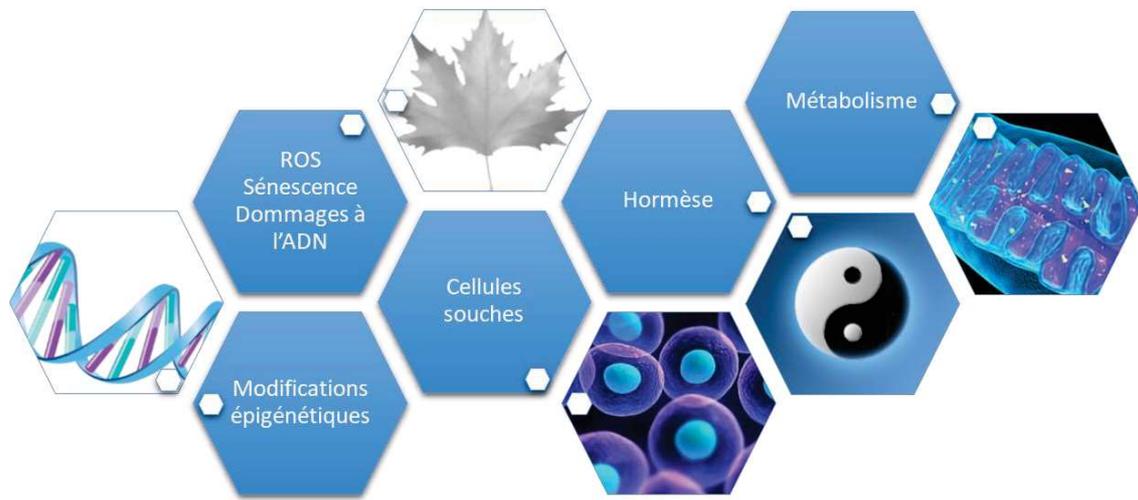


Figure 18 | Hypothèses pour expliquer les effets à long terme d'une reprogrammation transitoire précoce

Dans le cadre de cette étude, et comme cela fut suggéré par Ocampo et al. dans leur étude (Ocampo et al., 2016), nous avons exploré tout particulièrement la piste des modifications épigénétiques. Ainsi, sur nos tissus prélevés à 8 mois et sur lesquels nous avons observé une amélioration de la structure tissulaire suite à une reprogrammation transitoire précoce, nous avons analysé les niveaux de méthylation sur plusieurs centaines de sites CpG. Les analyses ont ainsi révélé des signatures épigénétiques très distinctes pour chaque organe entre les conditions contrôles et les conditions traitées, suggérant ainsi que, même à des âges tardifs, une reprogrammation transitoire précoce laisse une signature épigénétique spécifique dans de nombreux tissus. Cependant, cette signature est propre à chacun des tissus et nous n'avons pas pu mettre en évidence de site différenciellement méthylé commun à l'ensemble des organes. Dans l'optique d'identifier une signature épigénétique « pan-tissus », nous avons effectué une seconde analyse à partir des mêmes données de méthylome. Ainsi, nous avons considéré l'ensemble des échantillons indépendamment de l'origine tissulaire, nous avons ensuite sélectionné les cent sites présentant les différentiels de méthylation les plus significatifs parmi lesquels nous en avons identifié trois, qui se trouvent être tous les trois hypométhylés dans les conditions traitées par rapport aux contrôles. En l'état, bien que mettant en évidence un différentiel de méthylation aux âges tardifs, cette étude ne nous permet pas d'affirmer que ces modifications épigénétiques sont à l'origine du rajeunissement observé.

C'est pourquoi nous sommes actuellement en train de compléter ces données. Ainsi nous avons analysé les niveaux de méthylation dans ces mêmes organes, à savoir peau, reins, rate, foie, poumons et cœur, mais cette fois-ci prélevés juste après les seize jours d'induction des facteurs de reprogrammation. Ces données nous permettront de connaître l'ensemble des modifications épigénétiques mises en place par l'expression *in vivo* des facteurs OSKM, et en les comparant avec nos données sur les âges tardifs, de distinguer les marques transitoires des marques stabilisées au cours du temps. Ainsi nous espérons pouvoir identifier d'éventuelles marques communes aux âges précoces et tardifs, permettant ainsi d'affirmer que notre protocole de reprogrammation transitoire précoce est à l'origine de modifications épigénétiques pérennes.

Enfin, si on veut pouvoir conclure que ces marques épigénétiques sont responsables de l'effet rajeunissant observé, il faudrait pouvoir rapporter ces différentiels de méthylation à une horloge épigénétique. Bien que de nombreuses horloges aient déjà été proposées dans la littérature, il sera difficile de s'en servir de support principalement pour deux raisons. La première est que nous avons analysé nos échantillons sur une puce Illumina spécifique au modèle murin relativement récente, sortie fin 2019, et proposant un nombre de sites spécifiques qui ne correspondent pas nécessairement aux sites proposés par les autres méthodes d'analyse. Deuxièmement, il faut rappeler que nos données ont été obtenues à partir d'un modèle murin de vieillissement accéléré dont le phénotype, bien que mimant un vieillissement physiologique, reste pathologique. Ainsi, nous n'avons aucune garantie que la signature épigénétique du vieillissement de ces animaux progériques réponde aux horloges décrites dans des modèles de vieillissement physiologique.

Pour répondre à cette problématique, la solution idéale serait de construire notre propre horloge épigénétique spécifique de notre modèle murin progérique sur cette puce Illumina. Construire une horloge pan-tissus dans ce contexte serait relativement long, coûteux, et nécessiterait un nombre important d'animaux. Nous avons donc envisagé une approche alternative qui consiste à construire une horloge épigénétique sur un tissu facilement prélevable sans exiger l'euthanasie systématique des animaux à chaque âge choisi : le sang. Ainsi nous avons d'ores et déjà prélevé des échantillons sanguins de 2 à 6 mois sur une cohorte d'animaux progériques et non progériques, ce qui devrait permettre de pouvoir établir deux nouvelles horloges murines : l'une relative au vieillissement physiologique et une seconde propre au vieillissement progérique. Ceci nous permettra non seulement de rapporter la signature épigénétique du vieillissement dans un contexte progérique à celle d'un vieillissement physiologique, mais aussi de pouvoir rapporter les sites identifiés suite à une reprogrammation transitoire précoce à la signature liée à l'âge.

3.2 IMPACT DE LA REPROGRAMMATION TRANSITOIRE SUR LE METABOLISME *IN VIVO*

3.2.1 Validation des niveaux d'expression des facteurs de reprogrammation

Notre protocole d'induction transitoire précoce *in vivo* étant inédit, nous nous sommes assurés que dans ces conditions expérimentales, l'induction des facteurs de reprogrammation avait bien lieu. Pour rappel, notre protocole d'induction transitoire précoce consiste en une induction des facteurs de reprogrammation à 2 mois pendant 16 jours par traitement à la doxycycline à 0,5 mg/mL dans l'eau de boisson des animaux. Une série d'animaux a été sacrifiée à la fin du 16^e jour d'induction et leurs organes ont été prélevés, broyés puis l'extraction des ARN a été réalisée. Après une rétrotranscription en ADN complémentaire, ces échantillons ont été analysés par qPCR avec des amorces contre les quatre facteurs de reprogrammation OSKM. Les résultats sont présentés selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$, correspondant au niveau d'expression génique dans les échantillons traités à la doxycycline par rapport à la moyenne des échantillons contrôles.

Suite aux seize jours de traitement à la doxycycline, les niveaux d'expression d'OCT4 et SOX2 augmentent considérablement dans la peau, les reins, la rate, le tissu adipeux blanc (WAT) et le quadriceps (Figure 19). Les niveaux d'expression de KLF4 et c-MYC sont bien moins impactés par le traitement à la doxycycline dans l'ensemble de ces organes. Pourtant, la construction génique du modèle repose sur une cassette de reprogrammation polycistronique, ce qui suppose que les gènes des quatre facteurs sont transcrits simultanément et devraient donc présenter des taux d'expression similaires. Cependant, les deux derniers facteurs, KLF4 et c-MYC sont déjà exprimés de façon constitutive dans les tissus. Il se peut que les niveaux d'expression endogènes masquent alors l'expression induite *via* la cassette de reprogrammation. Une seconde hypothèse permettant d'expliquer cette différence dans les niveaux d'expression des quatre facteurs, serait que l'expression endogène de KM s'accompagne de mécanismes d'autorégulation de leur expression et que l'induction de leur surexpression exogène par la cassette de reprogrammation serait maîtrisée par une boucle de rétrocontrôle. Dans notre modèle murin reprogrammable, ce phénomène n'est pas spécifique à l'induction *in vivo* des facteurs de reprogrammation. En effet, *in vitro* lorsque des fibroblastes dermiques, extraits à partir de biopsies cutanées de ce même modèle, sont traités à la doxycycline pour induire l'expression des 4F, nous observons également une expression plus importante d'OCT4 et SOX2 par rapport à KLF4 et c-MYC.

Ces résultats confirment qu'un traitement à la doxycycline à 0,5 mg/mL pendant 16 jours sur nos souris triple hétérozygotes à l'âge de 2 mois, est suffisant pour induire l'expression des facteurs de reprogrammation OSKM.

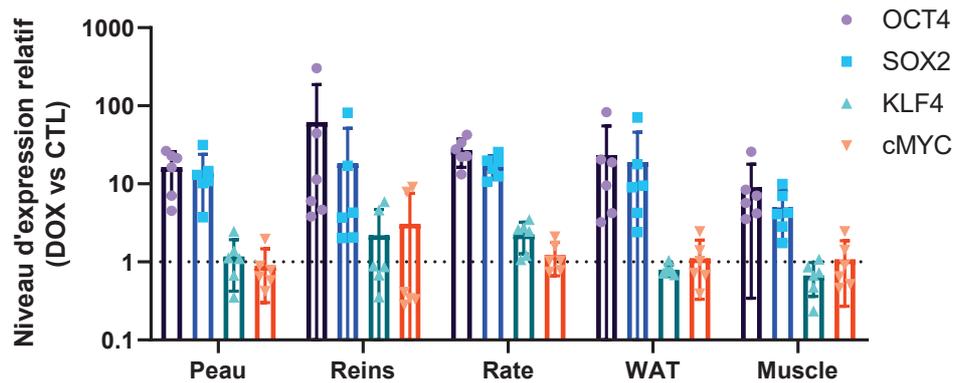


Figure 19 | Niveaux d'expression relatifs des facteurs de reprogrammation dans différents organes

Sur les mêmes organes à âges tardifs, l'expression des facteurs de reprogrammation est indétectable ou constante entre les échantillons contrôles et traités. Ceci confirme que l'arrêt du traitement à la doxycycline induit l'arrêt de l'expression des facteurs de reprogrammation, validant ainsi le caractère transitoire de notre protocole.

3.2.2 Étude détaillée de la composition corporelle

Nous allons revenir plus en détails sur les résultats de composition corporelle intégrés à la publication présentée dans la section précédente. Ici, nous avons séparé les résultats obtenus sur les individus femelles (Figure 20A à D) et mâles (Figure 20E à H).

Chez les femelles, on observe un ralentissement de la prise de masse chez les souris induites, initié dès la fin de l'induction des facteurs de reprogrammation (Figure 20A). Ce différentiel se maintient au cours du temps et est maximal autour de 6 mois. Chez les animaux contrôles, une perte de poids s'initie à partir de 6 mois et semble être ralentie chez les femelles reprogrammées. Comme décrit dans la publication, un changement global s'opère quant à la composition corporelle suite à la reprogrammation transitoire précoce (Figure 20B). Les femelles traitées montrent une proportion de masse maigre accrue avec une proportion de masse grasse réduite par rapport aux femelles contrôles. Comme pour la masse corporelle, ces changements s'initient pendant l'induction, sont notables dès la fin des seize jours d'induction et se maintiennent tout au cours de la vie. Ces résultats de composition corporelle expriment les masses maigre et grasse en pourcentage de la masse corporelle à un instant donné. Ils donnent donc des indications sur les proportions de chacune des masses mais ne renseignent pas précisément sur les quantités absolues de masses grasse et maigre. C'est pourquoi les résultats sont également présentés en Figure 20C et D selon une autre méthode d'analyse des données. Ici, les données sont exprimées en pourcentage de la valeur individuelle de chacune des masses initiales avant traitement. Ainsi ces

graphiques permettent de suivre l'évolution des masses maigre et grasse au cours de la vie des animaux. Pour les femelles, on observe que l'évolution de la masse corporelle est en fait calquée sur celle de la masse grasse (Figure 20C). Un ralentissement de la prise de masse grasse s'opère pendant l'induction des facteurs de reprogrammation et se maintient tout au long de la vie de l'animal. De façon assez surprenante, on n'observe aucune perte de cette masse grasse à âges tardifs chez les femelles traitées par rapport aux femelles contrôles, pour lesquelles une diminution progressive s'opère à partir du sixième mois environ. Concernant les masses maigres, aucune différence n'est notable entre les femelles traitées et les femelles contrôles (Figure 20D). Les modifications de poids et de composition corporelle en proportions (Figure 20A, B) observées chez les femelles traitées par rapport aux contrôles reposent uniquement sur une modification de la masse grasse.

Chez les mâles, la dynamique est différente en comparaison des femelles. Bien que le même profil s'observe quant aux proportions de masses maigre et grasse au cours de la vie des individus (Figure 20F), aucune différence n'est relevée quant à l'évolution du poids entre les mâles contrôles et traités (Figure 20E). Lorsque l'on s'intéresse à l'évolution individuelle de la masse grasse (Figure 20G), on observe des effets similaires chez les mâles et les femelles. La prise de masse grasse ralentit à la période d'induction des facteurs de reprogrammation et se maintient tout au long de la vie des animaux traités sans pertes à âges tardifs. En revanche, spécifiquement chez les mâles, la masse maigre est également impactée par l'induction des facteurs de reprogrammation (Figure 20H). En effet, dès la fin de la période d'induction, on observe une augmentation de la quantité de masse maigre chez les mâles traités par rapport aux contrôles. Cette augmentation se maintient tout au long de la vie des animaux et s'intensifie entre 4 et 8 mois. Ainsi, on peut supposer que les modifications des quantités de masses grasse à la baisse et maigre à la hausse chez les individus traités se compensent et ne se ressentent pas sur la courbe de suivi du poids.

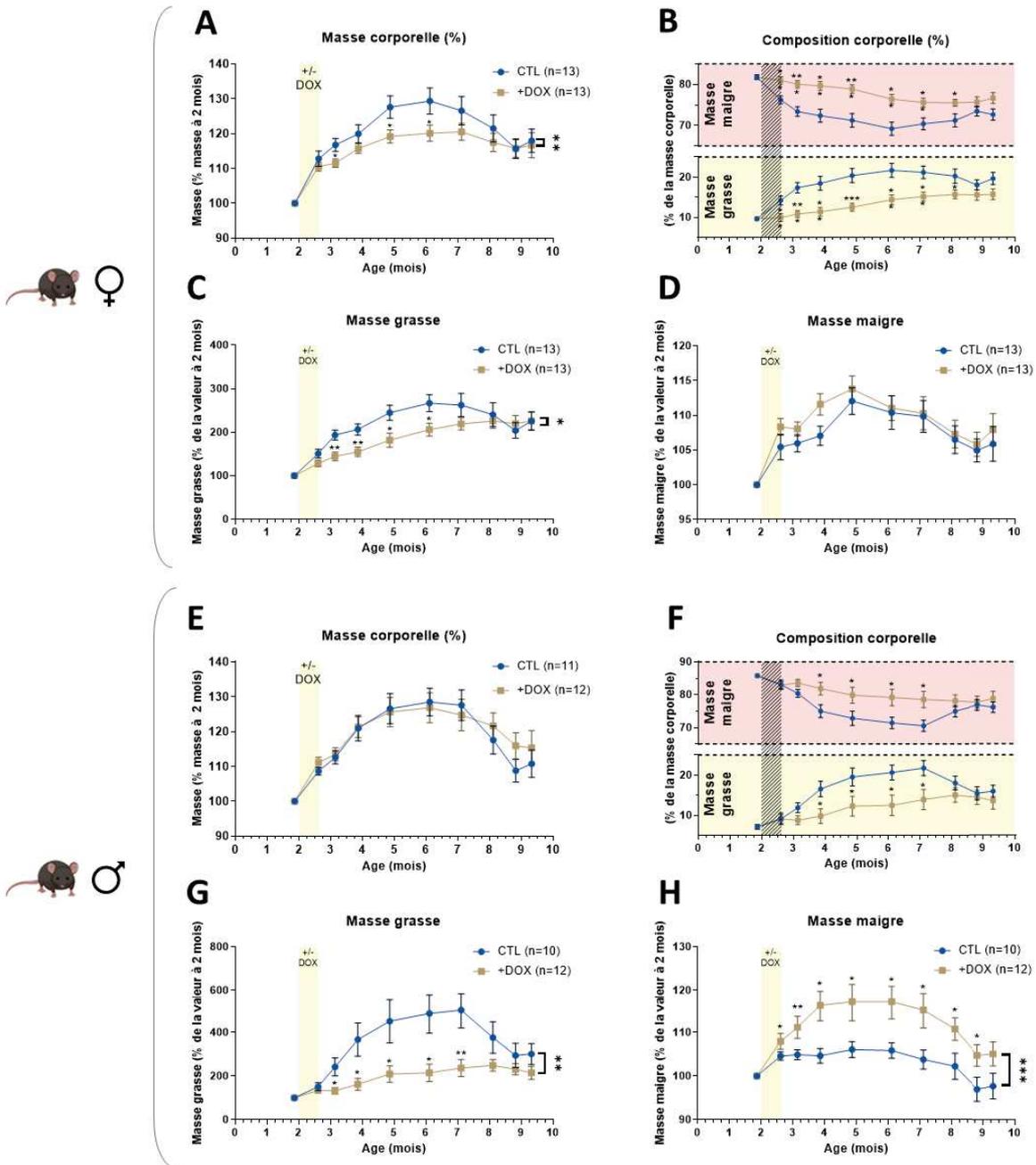


Figure 20 | Composition corporelle détaillée

- A. Courbe de suivi du poids des femelles. Les résultats de masse corporelle sont exprimés en pourcentage de la valeur initiale à 2 mois.
- B. Composition corporelle des femelles. Les données de composition corporelle sont exprimées en pourcentage de la masse corporelle à un âge donné.
- C. Courbe de suivi de la masse grasse au cours du temps chez les femelles. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur individuelle à 2 mois.
- D. Courbe de suivi de la masse maigre au cours du temps chez les femelles. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur individuelle à 2 mois.
- E. Courbe de suivi du poids des mâles. Les résultats de masse corporelle sont exprimés en pourcentage de la valeur initiale à 2 mois.
- F. Composition corporelle des mâles. Les données de composition corporelle sont exprimées en pourcentage de la masse corporelle à un âge donné.
- G. Courbe de suivi de la masse grasse au cours du temps chez les mâles. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur individuelle à 2 mois.
- H. Courbe de suivi de la masse maigre au cours du temps chez les mâles. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur individuelle à 2 mois.

Nous avons vérifié si le seul traitement à la doxycycline dans l'eau de boisson pouvait avoir un effet sur la composition corporelle des animaux, indépendamment de l'induction des facteurs de reprogrammation. Pour ce faire, nous avons utilisé des animaux progériques non reprogrammables, c'est-à-dire présentant seulement une copie de la mutation G609G dans le gène *Lmna*, sans présenter les transgènes *4F* et *rtTA*, soit de génotype *Lmna*^{G609G/+} *rtTA*^{+/+} *4F*^{+/+}. Ainsi, ces animaux ont suivi le même protocole d'induction transitoire précoce, à savoir 16 jours de traitement à la doxycycline à 0,5 mg/mL dans l'eau de boisson à 2 mois, et nous avons suivi l'évolution de leurs poids et composition corporelle au cours du temps. Chez les femelles comme chez les mâles, nous n'avons observé aucune différence significative que ce soit sur l'évolution des poids, des masses grasse ou maigre (Figure 21A, B). Ces résultats confirment que les modifications corporelles observées chez nos animaux progériques reprogrammables (3He) ne sont pas dues au traitement à la doxycycline en lui-même mais bien à l'activation des facteurs de reprogrammation que ce traitement provoque.

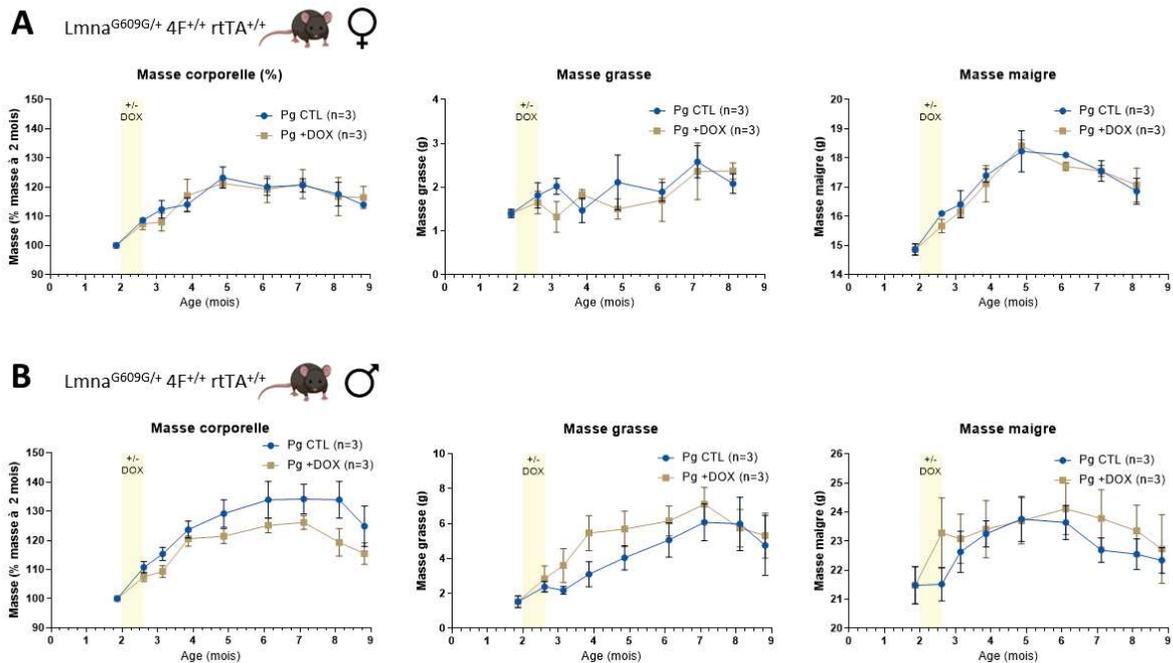


Figure 21 | Suivi de la composition corporelle d'animaux progériques non reprogrammables traités à la doxycycline

- A. Courbe de suivi du poids, des masses grasse et maigre de femelles progériques non reprogrammables (*Lmna*^{G609G/+} *rtTA*^{+/+} *4F*^{+/+}) traitées ou non à la doxycycline à 0,5 mg/mL dans l'eau de boisson pendant 16 jours à 2 mois.
- B. Courbe de suivi du poids, des masses grasse et maigre de mâles progériques non reprogrammables (*Lmna*^{G609G/+} *rtTA*^{+/+} *4F*^{+/+}) traitées ou non à la doxycycline à 0,5 mg/mL dans l'eau de boisson pendant 16 jours à 2 mois.

Compte tenu des différences importantes observées sur la masse et la composition corporelle, nous nous sommes intéressés à la prise alimentaire afin de savoir si celle-ci était impactée suite à l'induction des facteurs de reprogrammation par traitement à la doxycycline et pouvait expliquer les effets observés. Les animaux étant élevés en cages collectives tout au long du protocole, il est difficile de mesurer la prise alimentaire individuelle. Nous avons donc estimé la prise alimentaire individuelle moyenne par cage et par jour. Nous avons dissocié les données obtenues pendant l'induction, période pendant laquelle les animaux traités reçoivent de la doxycycline dans leur eau de boisson, de celles obtenues après la fin des 16 jours d'induction.

On observe que pendant la période d'induction, les animaux progériques reprogrammables (3He) traités ont une consommation alimentaire légèrement inférieure par rapport aux contrôles (Figure 22A). Chez les animaux non progériques reprogrammables (2He), cet effet ne se retrouve que chez les mâles. À la fin de la période d'induction, les animaux traités comme les contrôles reçoivent des biberons d'eau similaires. On observe alors que la réduction de la prise alimentaire observée chez les animaux progériques (3He) traités à la doxycycline se maintient chez les femelles comme chez les mâles (Figure 22B). Ainsi, indépendamment de la présence de doxycycline dans l'eau de boisson, l'expression des facteurs de reprogrammation pendant 16 jours à l'âge de 2 mois induit une modification durable du comportement alimentaire des animaux avec une diminution globale de la quantité moyenne de nourriture consommée quotidiennement chez les deux sexes.

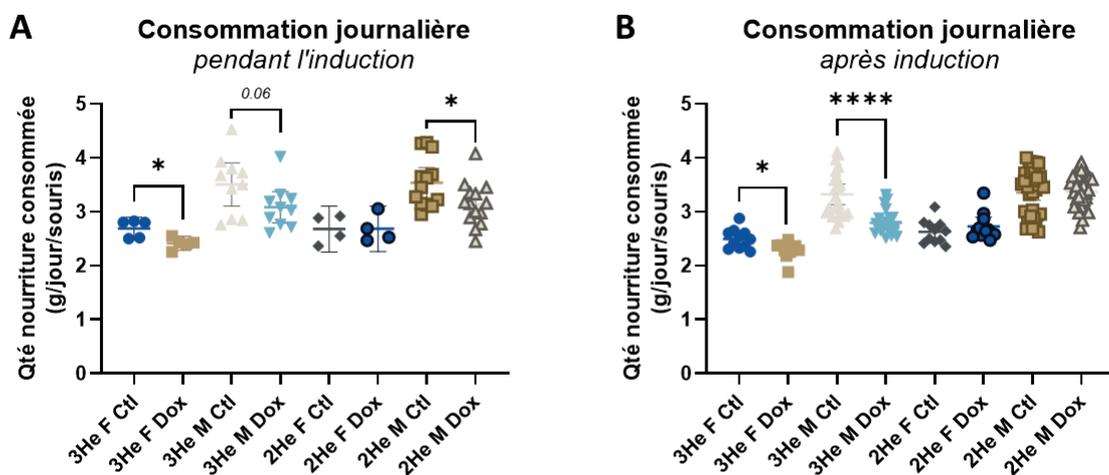


Figure 22 | Consommation alimentaire journalière

- Quantité de nourriture consommée individuellement en fonction du sexe, du génotype et du traitement pendant la période d'induction des facteurs de reprogrammation, à savoir 16 jours à partir de 2 mois.
- Quantité de nourriture consommée individuellement en fonction du sexe, du génotype et du traitement après la période d'induction des facteurs de reprogrammation, à savoir à partir de 2,5 mois.

Il serait intéressant de regarder si cette modification de la prise alimentaire induite par une reprogrammation transitoire précoce, provoque une modification du comportement alimentaire plus globale, par exemple concernant la durée, la fréquence et la répartition temporelle des périodes d'alimentation.

Lors des différentes euthanasies réalisées, l'ensemble des organes prélevés a été pesé et photographié individuellement. Aucune différence notable n'a été constatée entre les individus contrôles et les individus traités à la doxycycline quant à l'aspect macroscopique des différents organes, ni quant à leur masse relative par rapport à la masse corporelle individuelle (Figure 23).

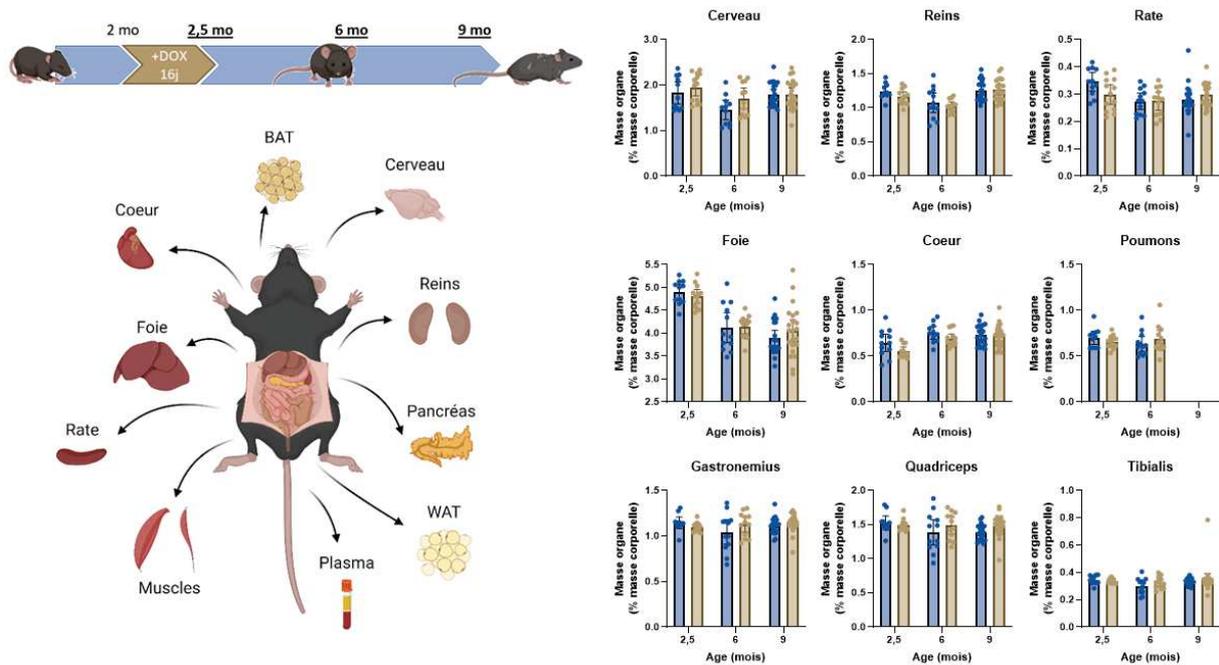


Figure 23 | Masse relative des organes aux prélèvements à 2,5 mois, 6 mois et 9 mois

Représentation schématique des organes d'intérêts aux prélèvements et diagrammes en barres des pesées individuelles de ces organes à 2,5 mois, 6 mois et 9 mois. Les pesées sont exprimées en pourcentage de la masse corporelle individuelle et sont compilées pour les individus mâles et femelles.

3.2.3 Étude des paramètres de l'homéostasie du glucose

Nous avons suivi la glycémie à l'état nourri des animaux tout au long du protocole (Figure 24A). Avant induction des facteurs de reprogrammation, la glycémie postprandiale varie en moyenne entre 160 mg/dL pour les femelles et 180 mg/dL pour les mâles. Ces valeurs relativement élevées suggèrent une hyperglycémie qui peut s'expliquer soit par une situation de stress pour les animaux, soit par une tendance à un phénotype diabétique. Au cours du temps, la glycémie des animaux, que ce soient les femelles ou les mâles, a tendance à diminuer progressivement pour atteindre les 130-140 mg/dL lorsque les animaux sont âgés de 9 mois, ce qui correspond à une perte d'environ 20% par rapport au taux de glucose sanguin à 2 mois. Aucune différence n'est visible entre les animaux du groupe contrôle et les animaux induits à la doxycycline. La glycémie a également pu être mesurée à deux âges différents, 3 mois et 7 mois, dans trois états d'alimentation différents, en postprandial, après un jeûne de quelques heures et après un jeûne sur toute une nuit (Figure 24B). Que ce soit chez les femelles ou chez les mâles, un jeûne modéré de quelques heures n'a pas grand impact sur le taux de glucose sanguin, à 3 mois comme à 7 mois. En revanche un jeûne sur la nuit entière, qui est la principale période d'alimentation des souris, qui sont des animaux nocturnes, entraîne une diminution de la glycémie de près de moitié, passant d'une valeur moyenne de 150 mg/dL à l'état nourri à une valeur moyenne autour de 75 mg/dL. Comme pour la glycémie à l'état nourri, aucune différence significative n'est observable entre les animaux contrôles et les animaux partiellement reprogrammés.

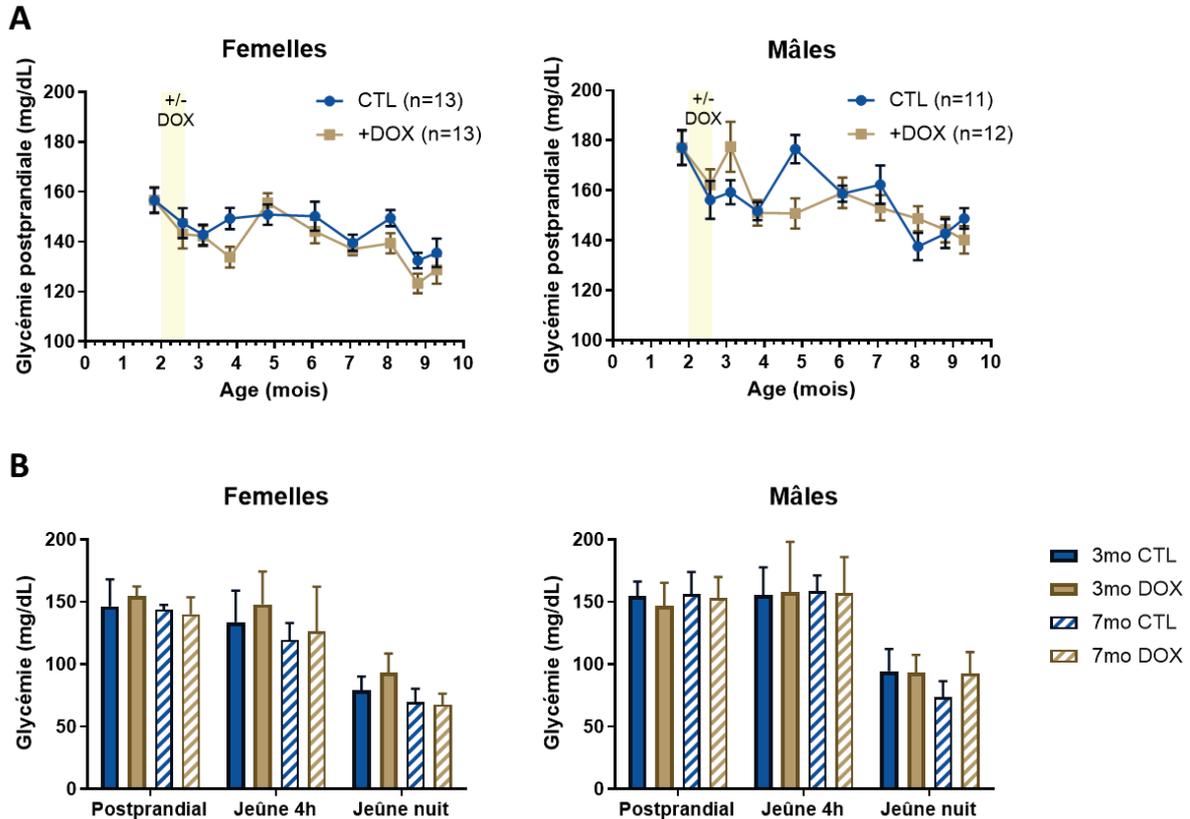


Figure 24 | Suivi de la glycémie après reprogrammation transitoire précoce

- A. Glycémie postprandiale au cours du temps chez les femelles (gauche) et les mâles (droite).
 B. Comparaison des glycémies postprandiale, après un jeûne de 4h et après un jeûne sur la nuit entière chez les femelles (gauche) et les mâles (droite) à 3 mois (barres pleines) et à 7 mois (barres rayées).

Pour analyser plus en détails l'impact de la reprogrammation transitoire précoce sur l'homéostasie du glucose, nous avons réalisé des tests de résistance à l'insuline, ITT (Figure 25A) et au glucose, OGTT (Figure 27A). Dès les premiers tests de résistance à l'insuline, les souris mâles ont démontré une forte insensibilité à l'insuline. En effet, on remarque que la glycémie demeure inchangée chez les animaux mâles contrôles après l'injection intrapéritonéale d'insuline à 0,75 UI/kg alors que celle-ci devrait chuter de façon significative. Cette insensibilité à l'insuline chez les mâles contrôles est visible dès 3 mois (Figure 25B) et reste inchangée à 7,5 mois (Figure 25C). L'induction des facteurs de reprogrammation chez les mâles semble restaurer une légère sensibilité à l'insuline à 3 comme à 7,5 mois (Figure 25B, C). Quant aux femelles, elles semblent montrer une sensibilité à l'insuline plus importante que les mâles à 3 et à 7,5 mois. En revanche, aux deux âges, aucune différence n'est notable entre les femelles contrôles et les femelles induites à la doxycycline.

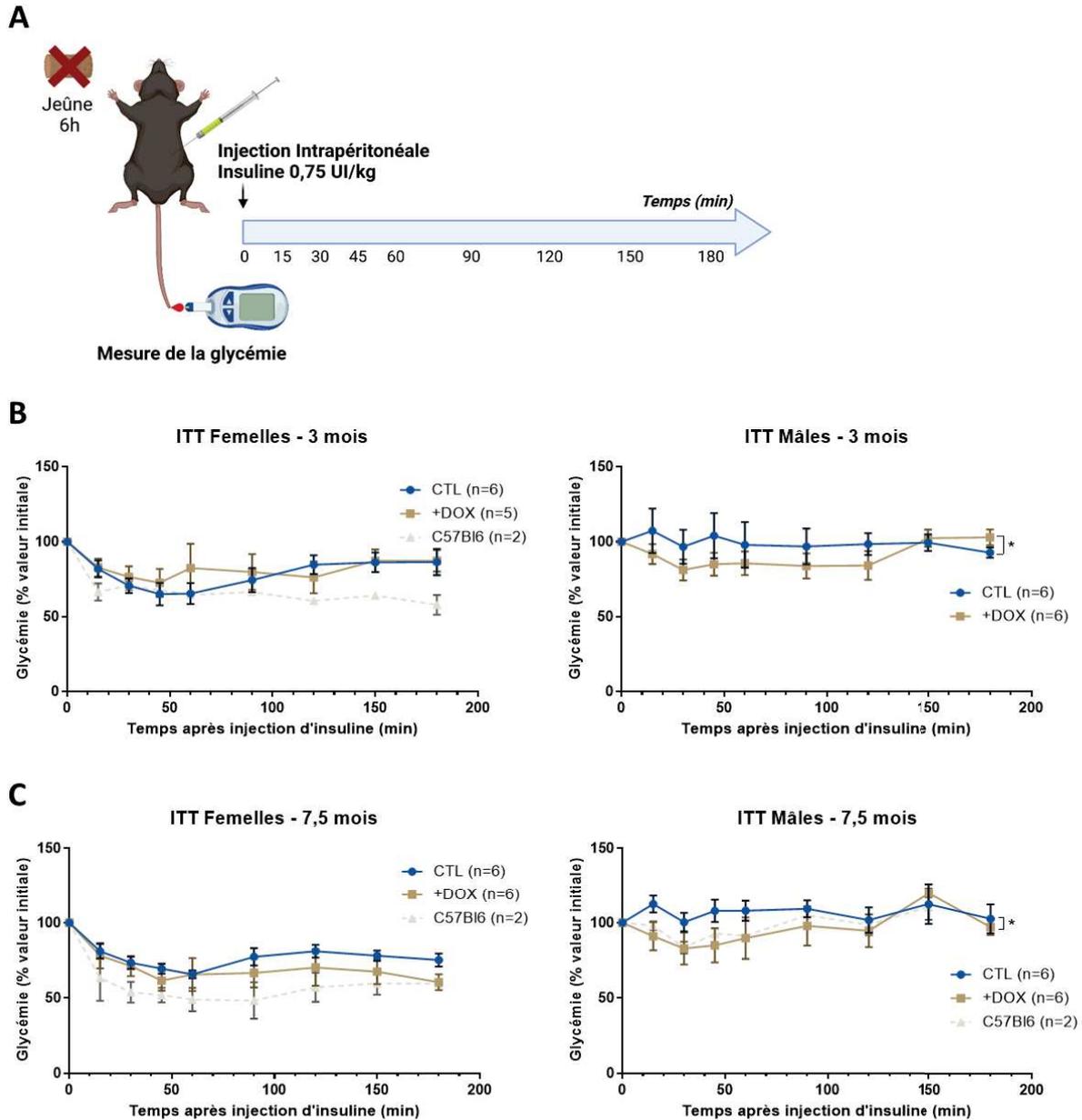


Figure 25 | Test de tolérance à l'insuline

- A. Schématisation du déroulé de test de tolérance à l'insuline (ITT). Après une injection intrapéritonéale d'insuline à 0,75 UI/kg sur des animaux à jeun depuis 6h, les mesures de glycémie sont faites régulièrement pendant 3 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur initiale individuelle.
- B. ITT à 3 mois chez les femelles (gauche) et les mâles (droite).
- C. ITT à 7,5 mois chez les femelles (gauche) et les mâles (droite).

En complément, nous avons réalisé des dosages plasmatiques des niveaux protéiques d'insuline circulante (Figure 26). Les résultats indiquent une tendance non significative vers une diminution des taux d'insuline circulante chez les femelles dès la fin de l'induction (2,5 mois) et maintenue à âges tardifs (9 mois) (Figure 26A). Chez les mâles, aucune différence n'est observable à 2,5 mois alors qu'une tendance non significative à 9 mois suggère une diminution de la sécrétion d'insuline (Figure 26B).

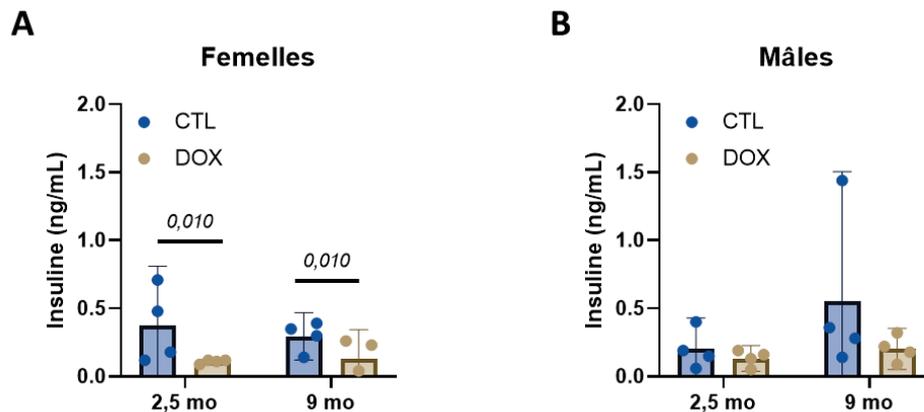


Figure 26 | Dosage biochimique des niveaux protéiques d'insuline plasmatique.

Les dosages ont été réalisés sur des prélèvements sanguins effectués en conditions postprandiales à deux âges différents : à 2,5 mois, soit directement à la suite des 16 jours d'induction des facteurs de reprogrammation, ainsi qu'à des âges tardifs, soit à 9 mois. Les résultats sont présentés pour les individus femelles (A) et mâles (B).

Nous avons également réalisé des tests de tolérance au glucose administré par voie orale (OGTT). On mesure ainsi la capacité à réguler la glycémie par la sécrétion pancréatique d'insuline suite à un pic hyperglycémique (Figure 27A). A 3 mois, les femelles traitées à la doxycycline démontrent une meilleure tolérance au glucose avec un contrôle de la glycémie plus rapide comme l'illustre la diminution de l'aire sous la courbe de la glycémie en fonction du temps, en comparaison des femelles contrôles (Figure 27B). Au même âge, on n'observe aucune différence chez les individus mâles. A 7,5 mois, les femelles traitées et contrôles montrent des réponses semblables au test de tolérance au glucose (Figure 27C). Alors qu'à cet âge chez les mâles, les mâles reprogrammés montrent une tendance à une meilleure capacité de tolérance au glucose, bien que les résultats ne soient pas statistiquement significatifs.

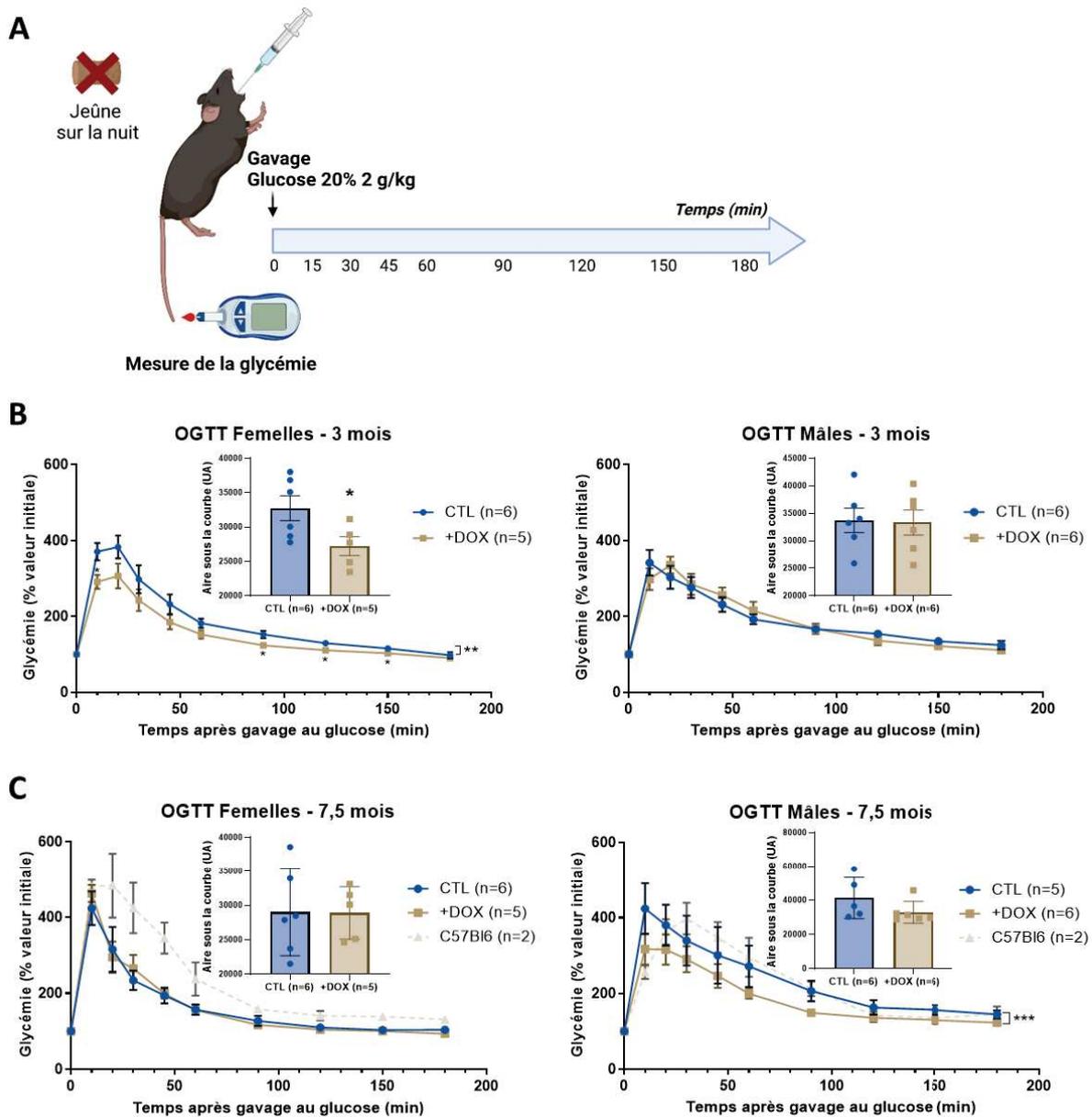


Figure 27 | Test de tolérance au glucose

- A. Schématisation du déroulé de test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT). Après un gavage avec une solution de glucose à 20% à 2 g/kg sur des animaux à jeun depuis la veille au soir, les mesures de glycémie sont faites régulièrement pendant 3 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur initiale individuelle.
- B. OGTT à 3 mois chez les femelles (gauche) et les mâles (droite) et graphique en barres des aires sous la courbe.
- C. OGTT à 7,5 mois chez les femelles (gauche) et les mâles (droite) et graphique en barres des aires sous la courbe.

Enfin, nous avons réalisé des coupes histologiques des pancréas prélevés sur les animaux à 9 mois. Les coupes ont été colorées d'abord en HES (Figure 28A). L'analyse des images n'a pas révélé de différence quant à l'ultrastructure du tissu pancréatique après induction des facteurs de reprogrammation. La mesure de la surface individuelle des îlots de Langerhans dans les conditions contrôle et DOX a mis en évidence une distribution similaire des îlots par leur taille, qui en moyenne se situe autour de $10^4 \mu\text{m}^2$. Un marquage immunohistochimique contre le glucagon sur ces mêmes coupes permet de surligner les cellules α à l'origine de sa synthèse (Figure 28B). Ces cellules se situent généralement en périphérie des îlots, le marquage permet ainsi de les entourer facilitant leur identification. L'analyse de ces images a permis de quantifier le nombre et la surface occupée par les îlots relativement à la surface de la coupe pancréatique. Les quantifications n'ont révélé aucune différence sur ces paramètres chez les femelles traitées à la DOX par rapport aux contrôles à 9 mois. Chez les mâles, seule une diminution du nombre d'îlots par mm^2 de tissu est notable chez les animaux reprogrammés par rapport aux animaux contrôles. Cette diminution du nombre relatif ne s'accompagne pas d'une modification significative de la surface totale relative occupée par les îlots.

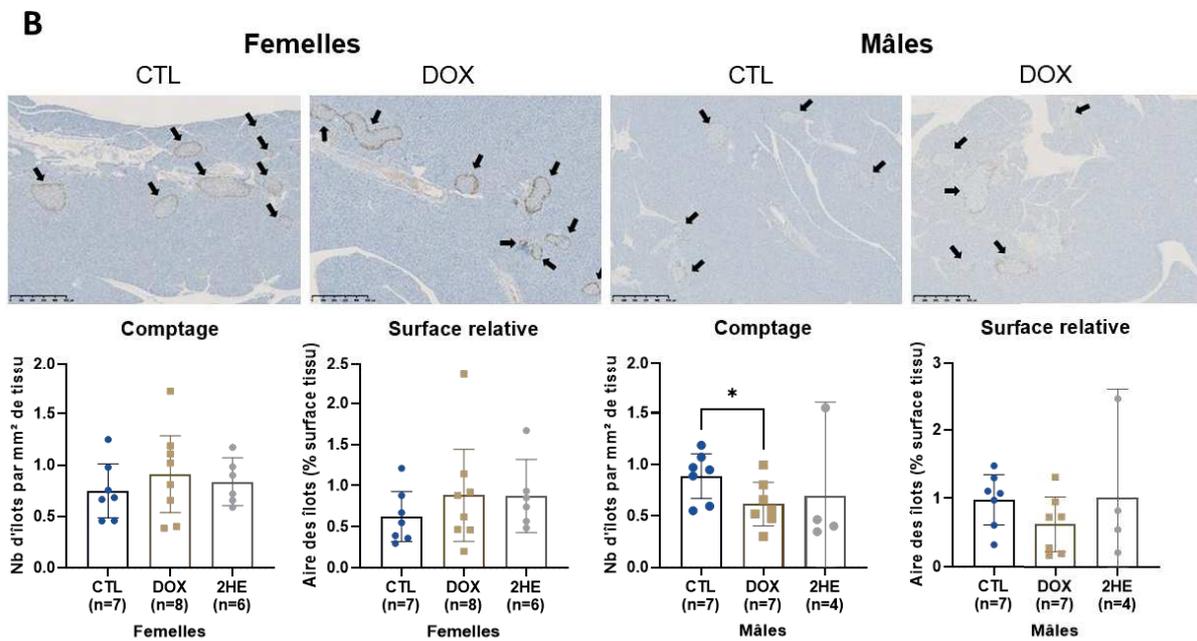
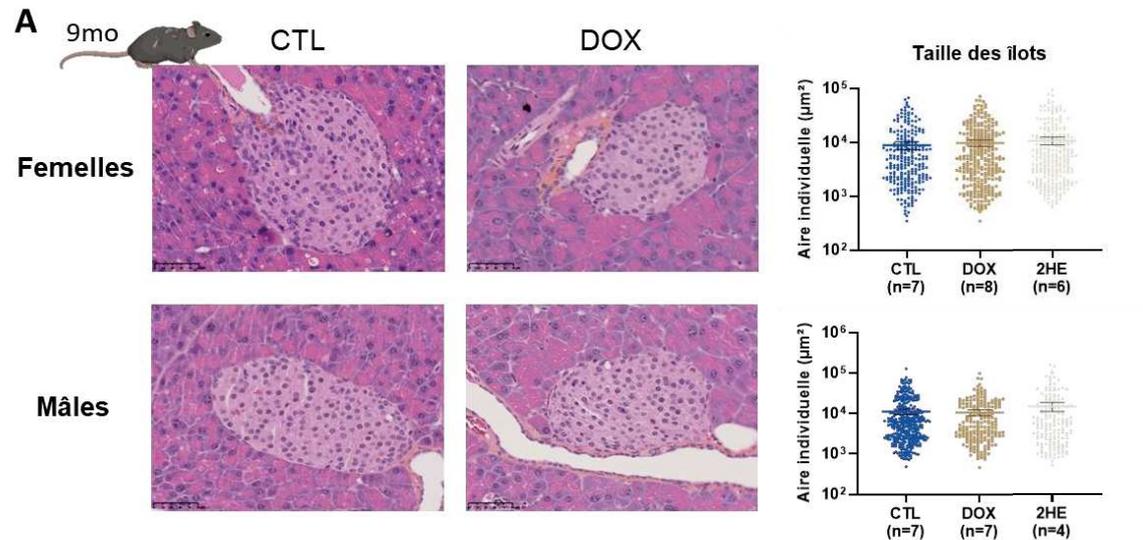


Figure 28 | Histologie du pancréas à 9 mois

- A. Histologie du pancréas des animaux à 9 mois, coloration hématoxyline éosine safran (HES). Mesure de la surface des îlots de Langerhans par tracé manuel dans NDPview.
- B. Histologie du pancréas des animaux à 9 mois, marquage immunohistochimique contre le glucagon. Les îlots de Langerhans sont indiqués par les flèches noires. Les diagrammes en barres représentent de gauche à droite le nombre d'îlots par surface tissulaire et leur surface relative par rapport à la surface de la coupe pour les individus femelles et mâles.

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que la reprogrammation transitoire partielle précoce ne présente qu'un faible impact sur les paramètres de l'homéostasie du glucose. De plus, il semble que le modèle animal que nous étudions présente des anomalies notamment quant à sa sensibilité à l'insuline et un potentiel contexte diabétique, ce qui remet en question la pertinence de ce modèle et des résultats obtenus pour l'étude de ces paramètres dans le contexte de la reprogrammation transitoire *in vivo*.

3.2.4 Étude de la formulation sanguine et du profil inflammatoire circulant

Nous avons réalisé la numération de la formule sanguine des animaux contrôles et induits à la doxycycline juste à la fin de la période d'induction (2,5 mois) et à l'âge de 6 mois. Dans l'ensemble, les résultats à 2,5 mois n'ont pas révélé de différentiel entre les conditions contrôle et doxycycline quant aux concentrations globales en globules blancs, rouges et en plaquettes (Figure 29, barres pleines). Bien que n'étant pas significative, on peut noter chez les mâles une tendance à l'augmentation du taux de globules blancs à la suite de l'induction des facteurs de reprogrammation. Cette hyperleucocytose pourrait s'expliquer par une réaction inflammatoire suite à l'administration de doxycycline et/ou l'expression des facteurs de reprogrammation.

À 6 mois, on observe peu de variations des taux de globules blancs chez les femelles, que ce soit en comparaison avec les données à 2,5 mois ou entre les conditions contrôles et traitées. En revanche chez les mâles, on observe une diminution de la concentration en globules blancs d'environ 30% à 6 mois, passant de 6.10^3 globules/mm³ chez les contrôles à 4.10^3 globules/mm³ chez les traités. Concernant les globules rouges, on observe une nette augmentation de leur concentration chez les femelles contrôles avec l'âge, passant de 5.10^3 à plus de 10.10^3 unités/mm³. Cette augmentation chronologique semble ralentie chez les femelles traitées, qui présentent une concentration inférieure aux femelles contrôles à 6 mois. Chez les mâles, on observe également une augmentation des taux de globules rouges avec l'âge, cependant le traitement à la doxycycline ne semble pas prévenir cette augmentation. Enfin, en ce qui concerne les concentrations plaquettaires, on observe une nette diminution de près de 50% de leur taux chez les femelles contrôles entre 2,5 et 6 mois. Cette perte de plaquette ne s'observe pas chez les mâles traités avec un maintien de leur taux entre 2,5 et 6 mois. Aussi une nette augmentation du taux de plaquette est visible chez les femelles traitées par rapport aux contrôles à 6 mois. Une fois de plus, ce phénomène ne se reproduit pas chez les individus mâles.

En résumé, il semblerait que l'induction transitoire précoce des facteurs de reprogrammation aurait peu d'effets immédiats sur les populations cellulaires sanguines, hors une tendance vers une augmentation transitoire des globules blancs chez les mâles. Mais elle permettrait à long terme de prévenir

spécifiquement chez les femelles, l'augmentation des globules rouges liée à l'âge et également de prévenir une diminution liée à l'âge de la concentration plaquettaire.

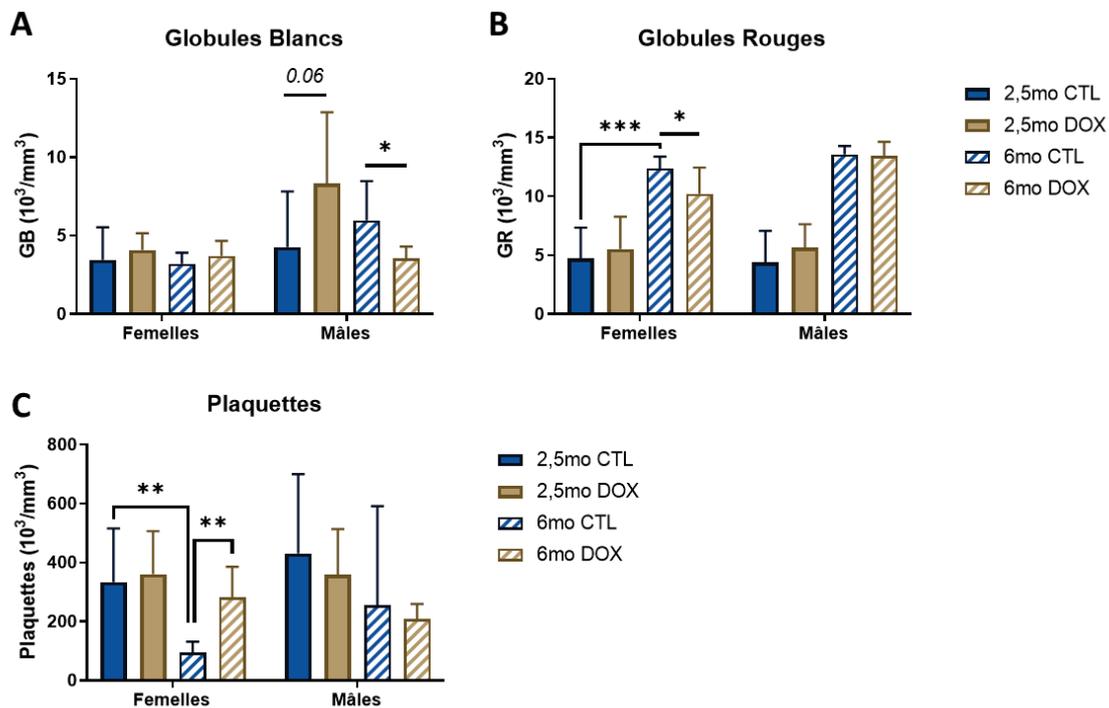


Figure 29 | Évolution de la numération de la formule sanguine entre 2,5 mois et 6 mois

- A. Concentrations en globules blancs après induction des facteurs de reprogrammation à 2,5 mois et à 6 mois.
 B. Concentrations en globules rouges après induction des facteurs de reprogrammation à 2,5 mois et à 6 mois.
 C. Concentrations en plaquettes après induction des facteurs de reprogrammation à 2,5 mois et à 6 mois.

Sur les prélèvements à 2,5 mois, nous avons pu obtenir la numération de la formule sanguine détaillée (Figure 30). Ainsi, parmi les globules blancs, on n'observe pas de modification des différentes proportions de lymphocytes, granulocytes, monocytes et polynucléaires éosinophiles chez les deux sexes à la suite de l'induction de l'expression des facteurs de reprogrammation (Figure 30A). Concernant les plaquettes, le volume plaquettaire moyen n'est pas plus impacté que la concentration de celles-ci (Figure 30B). Les différents paramètres associés aux globules rouges, à savoir la concentration en hémoglobine, l'hématocrite, le volume globulaire moyen, la teneur corpusculaire moyenne, la concentration globulaire moyenne en hémoglobine, et enfin l'indice de distribution des globules rouges sont stables entre conditions contrôle et traitée pour les deux sexes.

Suite à un incident technique sur la machine lors de l'analyse des prélèvements à 6 mois, nous n'avons pas pu obtenir ces paramètres détaillés. Les analyses de formulation sanguine se font le jour même à partir de sang fraîchement prélevé. Or l'expérience à 6 mois avait été prévue la veille des euthanasies.

Le temps d'obtenir les résultats de NFS, il n'était donc malheureusement pas possible de réitérer l'expérience avant les sacrifices.

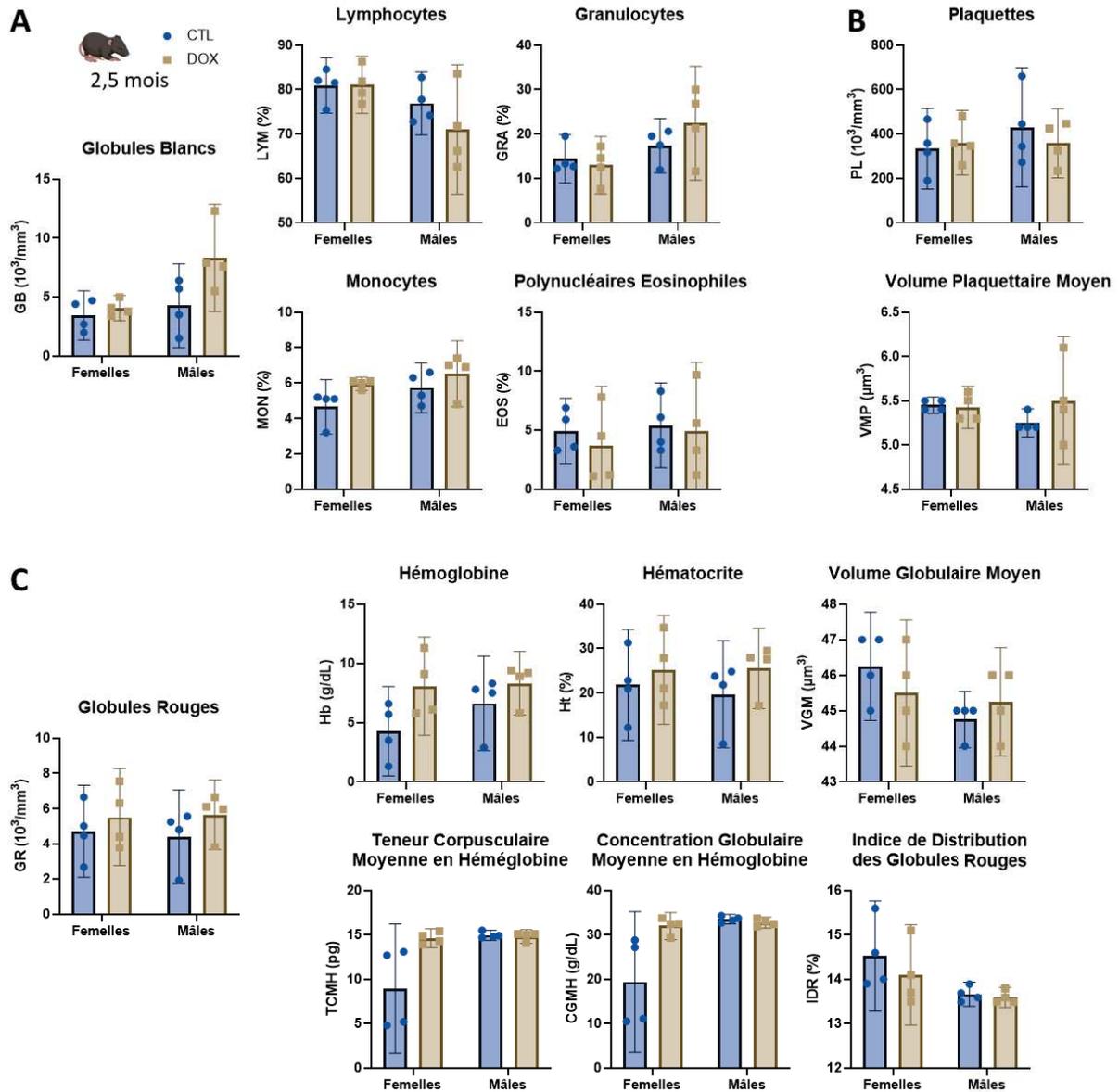


Figure 30 | Numération de formule sanguine (NFS) détaillée à 2,5 mois

- A. Paramètres de la numération sanguine relatifs aux globules blancs : concentration et proportions relatives en lymphocytes, granulocytes, monocytes et éosinophiles polynucléaires.
- B. Paramètres de la numération sanguine relatifs aux plaquettes : concentration et volume plaquettaire moyen.
- C. Paramètres de la numération sanguine relatifs aux globules rouges : concentration totale, en hémoglobine, hématocrite, volume globulaire moyen, teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine, concentration globale moyenne en hémoglobine, et indice de distribution.

L'existence d'un lien entre vieillissement et sénescence (López-Otín et al., 2013), et entre reprogrammation *in vivo* et sénescence (Abad et al., 2013; Chiche et al., 2017; Mosteiro et al., 2016), nous a amenés à nous intéresser à la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires circulants suite à notre protocole de reprogrammation transitoire précoce. Ainsi, à partir de plasma prélevé sur des individus femelles et mâles, juste après les 16 jours d'induction des 4F (2,5 mois), à 6 mois et à 9 mois, nous avons quantifié 31 cytokines dont certaines sont apparentées au phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP).

La Figure 31A présente les résultats des trente-et-uns dosages de cytokines à chaque âge pour tous les échantillons individuellement sous forme de classification non hiérarchisée. Les données en bleu et en rouge indiquent respectivement une diminution ou une augmentation de la quantification par rapport à la moyenne du groupe contrôle pour un sexe donné. Globalement, on observe une augmentation des niveaux de présence d'une grande partie des cytokines testées chez les mâles à 2,5 mois. Ce différentiel est bien moins marqué chez les femelles au même âge, bien que lorsque qu'on s'intéresse individuellement aux cytokines présentant un différentiel de quantification à 2,5 mois chez les deux sexes, on dénombre 6 cytokines dont les résultats sont statistiquement significatifs (Figure 31B). Il s'agit chez les femelles, des cytokines LIX et MCP-1 dont la présence est significativement renforcée chez les animaux traités par rapport aux contrôles. Chez les mâles, IL-1 α et LIX sont régulés à la hausse alors qu'IL-10, IL-17 et MIP-1 α le sont à la baisse chez les animaux traités par rapport aux contrôles. L'unique point commun aux femelles et aux mâles est donc la cytokine LIX, aussi connue sous le nom de CXCL5. Elle est décrite comme associée à l'activation et à la migration des neutrophiles, mais semble aussi jouer un rôle dans la maintenance des cellules souches hématopoïétiques (Choong et al., 2004).

A 6 mois comme à 9 mois, le profil des cytokines plasmatiques est similaire quels que soient le traitement et le sexe (Figure 31A). Ces résultats indiquent que l'activation des facteurs de reprogrammation de façon précoce induit un léger phénotype pro-inflammatoire mais que celui-ci n'est pas maintenu à des âges plus tardifs. Enfin, à 9 mois, l'induction des facteurs de reprogrammation précoce ne semble pas montrer d'effets bénéfiques sur les niveaux de cytokines inflammatoires circulantes, dont certaines cytokines du phénotype sécrétoire associé à la sénescence pourtant décrites pour participer activement au phénotype du vieillissement.

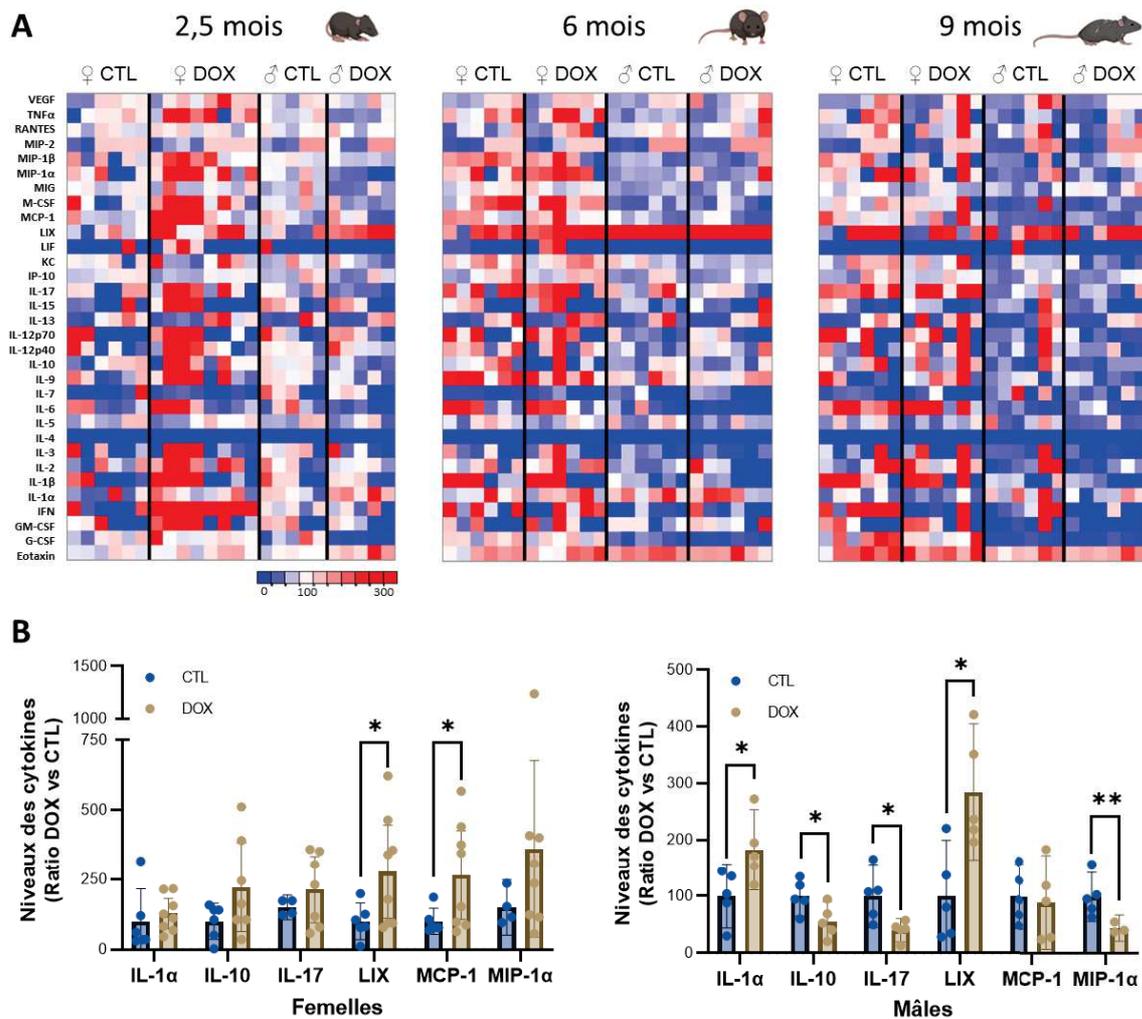


Figure 31 | Profil inflammatoire circulant après reprogrammation transitoire précoce

- A. Classification non hiérarchisée des niveaux protéiques des cytokines plasmatiques chez les individus femelles et mâles, juste après l'induction (2,5 mois), à 6 mois et à 9 mois.
- B. Graphiques en barres des principales cytokines différenciellement secrétées chez les femelles et/ou les mâles après l'induction des facteurs (2,5 mois).

3.2.5 Étude du métabolisme respiratoire *in vivo*

L'étude des échanges gazeux chez l'animal, à savoir la consommation de dioxygène et la production de dioxyde de carbone, permet de prédire le métabolisme global que l'organisme utilise pour produire son énergie. On peut alors déterminer un ratio d'échange respiratoire, ou RER, en rapportant la production de dioxyde de carbone à la consommation en dioxygène. Sa valeur fluctue entre 0,7 et 1 en fonction de la source énergétique. En effet, dans le bilan global de la glycolyse pour la conversion d'une molécule de glucose en ATP, six molécules de dioxygène sont consommées et six molécules de dioxyde de carbone sont produites, ce qui donne donc un ratio d'échange respiratoire (RER) égal à 1. Lorsque l'organisme utilise plutôt les acides gras pour produire son énergie, le RER diminue alors autour de 0,7.

Par exemple, l'oxydation d'une molécule d'acide palmitique requiert 23 O₂ et produit 16 CO₂. Une valeur de RER intermédiaire autour de 0,8 indique une source mixte de carbohydrates et d'acides gras pour la production énergétique.

Nous avons donc suivi pendant 24 h les échanges respiratoires d'individus isolés femelles (Figure 32) et mâles (Figure 34) à 3 mois, 5 mois et 7 mois. On observe une augmentation du volume d'oxygène consommé pendant 24h chez les femelles traitées par rapport au contrôle, quel que soit leur âge (Figure 32A). Ce différentiel est d'autant plus visible sur la période nocturne lors de laquelle les animaux sont actifs. Dans l'ensemble, le volume respiratoire moyen diminue avec l'avancée en âge chez les femelles contrôles (Figure 32C). Cette tendance est ralentie chez les femelles traitées grâce à l'augmentation constante du volume respiratoire. Si le ratio d'échange respiratoire est identique à 3 mois, il est en revanche, significativement augmenté à 5 et 7 mois chez les femelles traitées par rapport aux contrôles (Figure 32B). Si on suit l'évolution de ce ratio, on remarque qu'à 3 mois il se situe entre 0,85 et 0,90 indiquant un métabolisme mixte à base de carbohydrates et d'acides gras (Figure 32D). Chez les femelles contrôles, il reste stable autour de ces valeurs à 5 mois puis augmente tardivement, traduisant un métabolisme de plus en plus basé sur les glucides. De façon assez surprenante, cette transition s'opère plus précocement chez les femelles traitées, pour lesquelles une augmentation du RER est visible dès 5 mois. Le calcul de la dépense énergétique indique une tendance vers une augmentation chez les mâles traités à 3 et 5 mois, maintenue à 7 mois bien qu'amoindrie (Figure 32E). Cette augmentation de la dépense énergétique est indépendante des processus de thermogénèse, bien que ceux-ci représentent une part majoritaire de la dépense énergétique globale chez la souris, puisque la température corporelle des animaux est en moyenne stable au cours du temps et identique pour les deux groupes (Figure 33A). Enfin, la mesure de la prise alimentaire sur les 24 h de tests ne révèle aucune différence entre les femelles contrôles et les femelles traitées quel que soit leur âge (Figure 32F).

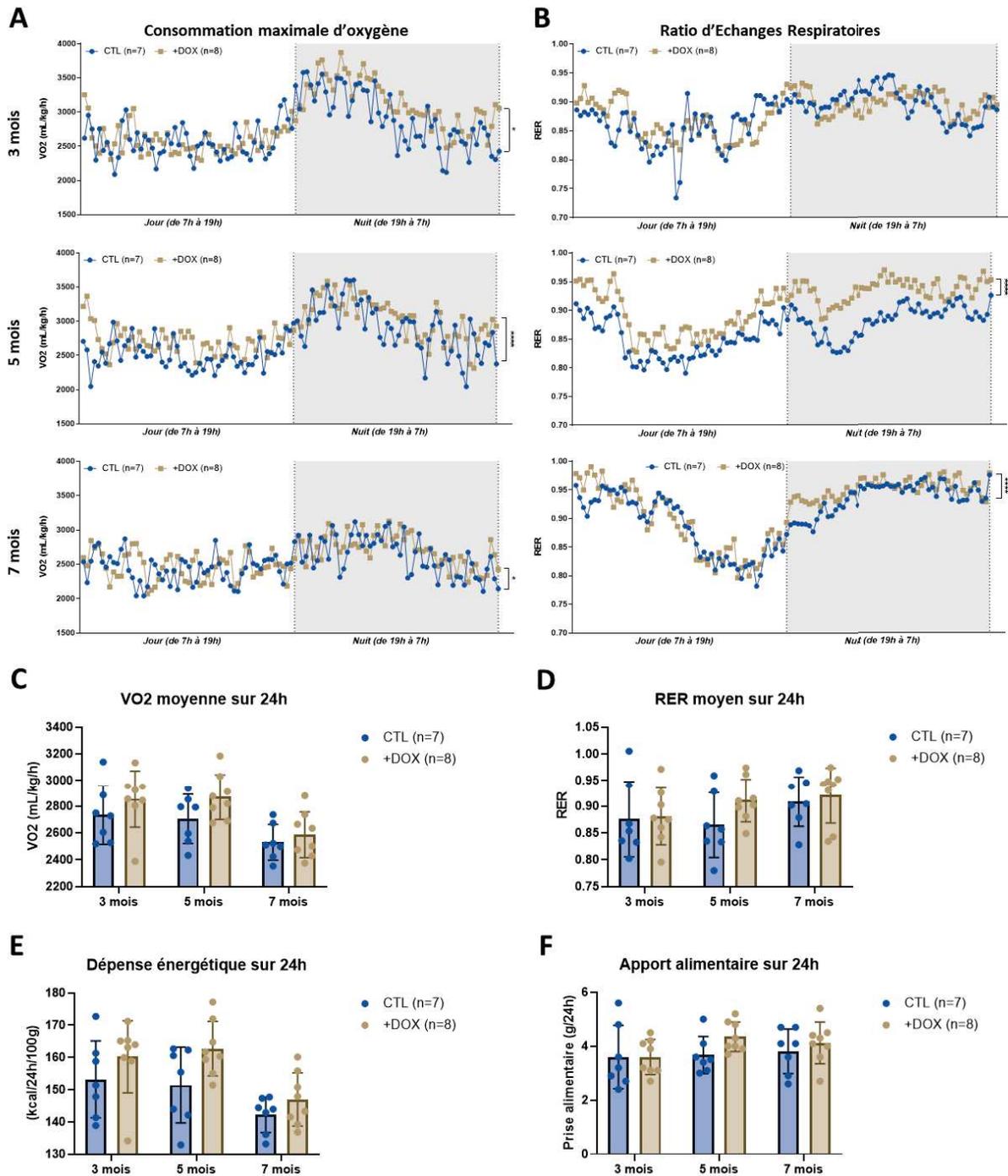


Figure 32 | Métabolisme respiratoire in vivo des femelles

- A. Courbes de suivi de la consommation de dioxygène individuelle sur 24h à 3, 5 et 7 mois.
- B. Courbes de suivi du ratio d'échange respiratoire (RER) individuel sur 24h à 3, 5 et 7 mois. Le RER représente le ratio entre le volume de CO₂ expiré et le volume d'O₂ inspiré.
- C. Diagramme en barres du volume de dioxygène moyen sur une période de 24h à 3, 5 et 7 mois.
- D. Diagramme en barres du RER moyen sur une période de 24h à 3, 5 et 7 mois.
- E. Diagramme en barres de l'estimation de la dépense énergétique individuelle rapportée à la masse de chaque individu en kcal pour 100 g de masse corporelle sur une période de 24 h à 3, 5 et 7 mois.
- F. Diagramme en barres de la mesure de la prise alimentaire individuelle sur la période de 24h pendant laquelle les mesures ont été réalisées.

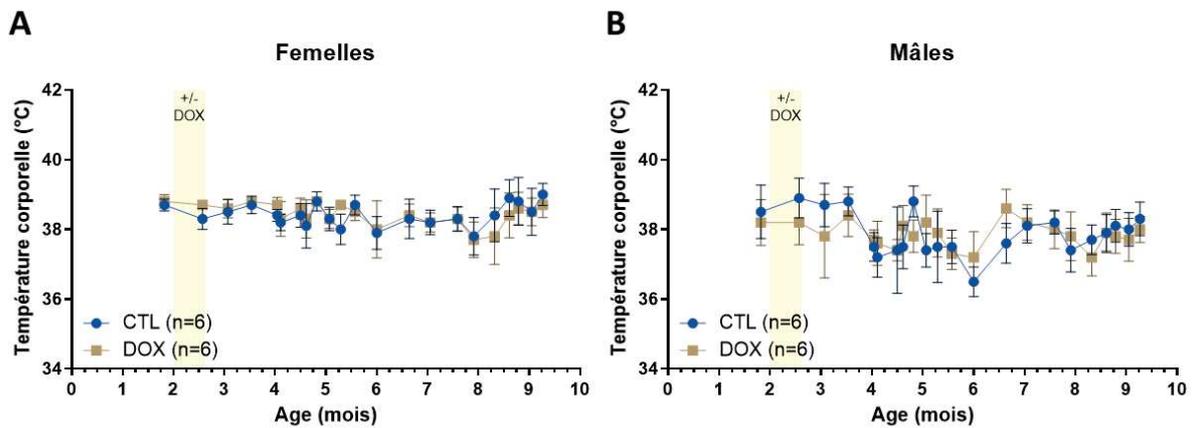


Figure 33 | Suivi de la température corporelle

Courbes de suivi de la température corporelle mesurée par voie rectale tout au long du protocole chez les individus femelles (A) et mâles (B).

Chez les mâles, on observe également une augmentation du volume respiratoire chez les individus traités par rapport aux contrôles quel que soit l'âge (Figure 34A). Parallèlement, on observe une très nette augmentation du ratio d'échange respiratoire à 5 et 7 mois (Figure 34B). Contrairement à ce qui se passe chez les femelles, le RER semble en moyenne diminuer avec l'avancée en âge chez les individus contrôles (Figure 34D). Le traitement à la doxycycline semble permettre de maintenir le RER au cours du temps à sa valeur initiale de 0,9, indiquant ainsi le maintien d'un métabolisme préférentiellement basé sur les sucres tout au long de la vie des individus. La dépense énergétique semble tendre vers une légère augmentation chez les individus traités (Figure 34E), toujours indépendamment de l'apport pour le maintien de la température corporelle (Figure 33B). Enfin en ce concerne l'apport alimentaire pendant les 24 h du test, aucune différence significative n'est notable bien qu'une tendance s'initie à 5 mois et persiste à 7 mois vers une augmentation de la prise alimentaire chez les individus traités à la doxycycline (Figure 34F). Ces résultats ne concordent pas avec les estimations de la prise alimentaire individuelle moyenne présentées en Figure 22 mais ils résultent de deux méthodes d'analyse différentes. Ici, on mesure la prise alimentaire individuelle sur 24 h dans des conditions d'hébergement atypiques, qui sont potentiellement stressante pour l'animal et peuvent donc influencer sur son comportement. Dans ce cadre, cette donnée nous permet d'estimer l'apport calorique des animaux et de prendre en compte le différentiel le cas échéant pour l'interprétation des mesures de dépense énergétique.

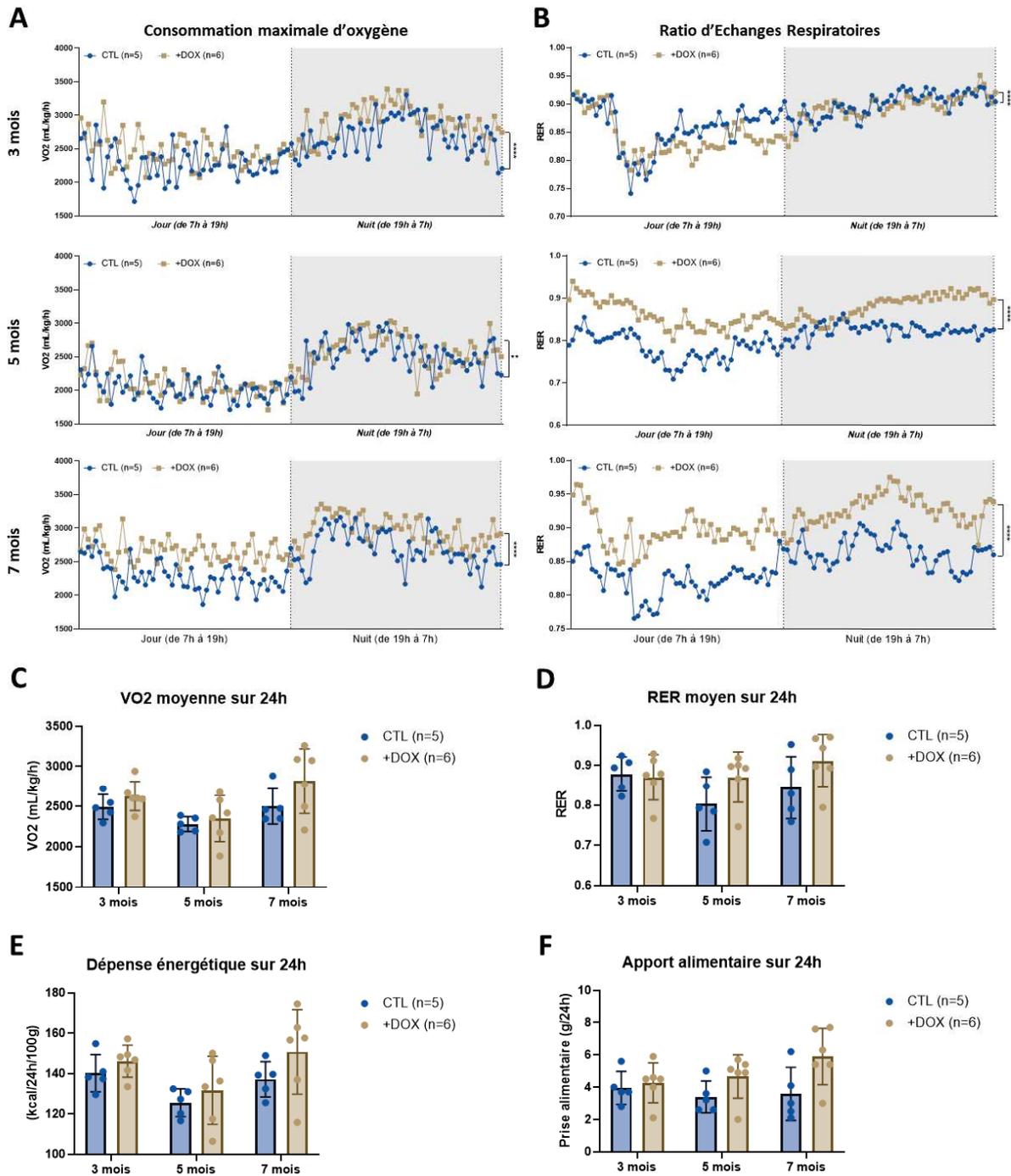


Figure 34 | Métabolisme respiratoire *in vivo* des mâles

- A. Courbes de suivi de la consommation de dioxygène individuelle sur 24h à 3, 5 et 7 mois.
- B. Courbes de suivi du ratio d'échange respiratoire (RER) individuel sur 24h à 3, 5 et 7 mois. Le RER représente le ratio entre le volume de CO₂ expiré et le volume d'O₂ inspiré.
- C. Diagramme en barres du volume de dioxygène moyen sur une période de 24h à 3, 5 et 7 mois.
- D. Diagramme en barres du RER moyen sur une période de 24h à 2, 5 et 7 mois.
- E. Diagramme en barres de l'estimation de la dépense énergétique individuelle rapportée à la masse de chaque individu en kcal pour 100 g de masse corporelle sur une période de 24 h à 3, 5 et 7 mois.
- F. Diagramme en barres de la mesure de la prise alimentaire individuelle sur la période de 24h pendant laquelle les mesures ont été réalisées.

3.2.6 Étude du tissu adipeux brun (BAT)

Le tissu adipeux brun est principalement impliqué dans les mécanismes de thermogénèse, permettant de maintenir la température corporelle de l'organisme par la lipolyse de ses adipocytes. Par rapport au tissu adipeux blanc, il est enrichi en mitochondries et contient de nombreuses gouttelettes lipidiques plus petites.

Bien que le suivi de la température corporelle n'ait pas révélé de différences suite à l'induction transitoire précoce de l'expression des facteurs de reprogrammation (Figure 33), nous avons analysé les coupes histologiques du tissu adipeux brun à la fin du protocole d'induction, soit 2,5 mois, et à âges tardifs, 9 mois (Figure 35). La multitude de gouttelettes lipidiques et leur petit diamètre rendant complexe leur individualisation et la mesure de leur diamètre, nous avons réalisé une analyse globale du contenu lipidique. Pour ce faire, à l'aide du logiciel ImageJ, nous avons converti les images en binaire et quantifié les pixels blancs, correspondant au contenu lipidique, et les pixels noirs, correspondant aux membranes et noyaux cellulaires. Ainsi en calculant la proportion de pixels blancs correspondant aux lipides par rapport à l'ensemble des pixels, nous avons pu déterminer globalement le contenu lipidique.

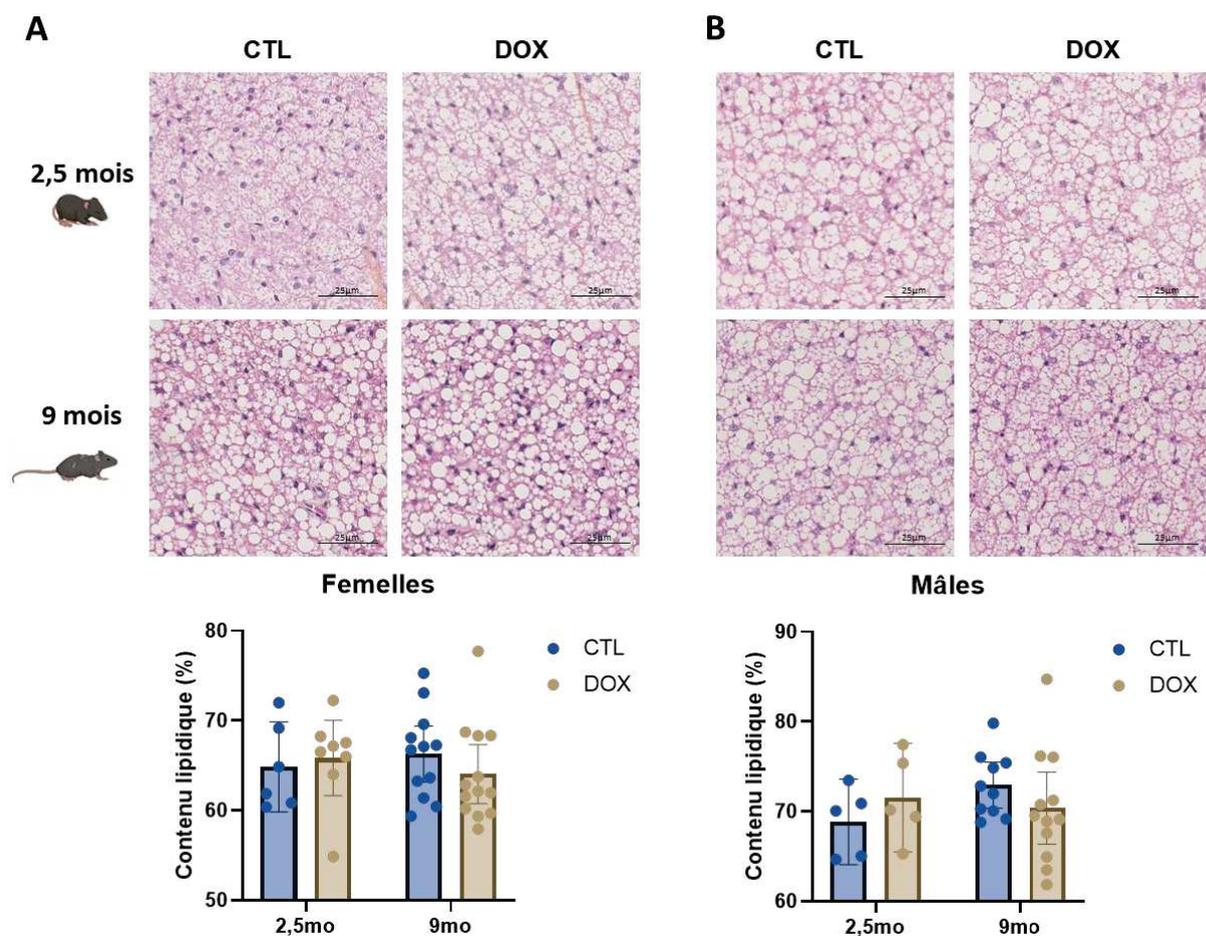


Figure 35 | Histologie du tissu adipeux brun (BAT)

Quantification du contenu lipidique du tissu adipeux brun des femelles (A) et des mâles (B) à 2,5 et 9 mois.

Dans l'ensemble, on n'observe pas de différences dans les valeurs de pourcentage de contenu lipidique moyen par individu, quel que soient le sexe et l'âge. L'induction transitoire précoce des facteurs de reprogrammation ne semble donc pas montrer d'impact majeur sur le tissu adipeux brun ni sur les processus de thermogénèse. Bien entendu, des analyses plus fines quant au contenu lipidique détaillé des adipocytes, ainsi qu'au profil transcriptomique et au méthylome du tissu adipeux brun, pourraient révéler des effets de l'induction des facteurs de reprogrammation et des signatures spécifiques.

3.2.7 Étude du tissu adipeux blanc (WAT)

Compte tenu des effets observés sur la composition corporelle et en particulier sur l'évolution après induction des facteurs de reprogrammation de la masse grasse, principalement représentée par les tissus adipeux, nous avons prêté une attention toute particulière à l'étude du tissu adipeux blanc. Le tissu adipeux blanc est un organe de stockage énergétique. Sous contrôle hormonal pancréatique, les adipocytes stockent ou libèrent le contenu de leur gouttelette lipidique afin de répondre à la demande énergétique de l'organisme. Longtemps limité à ce rôle de stockage, il est aujourd'hui admis que le tissu adipeux blanc est également un organe endocrine capable de réguler la balance énergétique grâce à la sécrétion d'hormones et de métabolites (Trayhurn and Beattie, 2001).

L'analyse des coupes histologiques de tissu adipeux blanc en coloration HES a permis de mettre en évidence une variation dans la taille médiane des adipocytes le constituant, spécifiquement chez les femelles (Figure 36). En effet, la mesure des adipocytes directement à la suite de la période d'induction des facteurs de reprogrammation, c'est-à-dire à 2,5 mois, ne révèle aucune différence de taille ni chez les femelles ni chez les mâles (Figure 36A). Ces résultats corrélerent avec les résultats de composition corporelle qui ne montrent qu'une faible différence sur la masse grasse brute juste à la fin de la période de traitement (Figure 20B, D). À 6 mois, lorsque le différentiel de composition corporelle est maximal, les adipocytes des femelles traitées présentent une surface presque 2 fois inférieure par rapport celle des contrôles (Figure 36B). Alors que chez les mâles, bien que le différentiel de composition corporelle existe également, aucune différence n'est notable quant à l'aire médiane des adipocytes. Enfin, à âges tardifs, les femelles traitées montrent toujours des adipocytes réduits par rapport aux femelles contrôles, bien que le différentiel de composition corporelle soit atténué par rapport à celui à 6 mois (Figure 36C). Chez les mâles, on ne remarque toujours aucune différence. Si on s'intéresse à l'évolution de la taille des adipocytes avec l'avancée en âge, on remarque que celle-ci concorde avec les modifications de composition corporelle précédemment décrites avec une augmentation entre 2,5 et 6 mois puis une diminution entre 6 et 9 mois. Ceci nous permet indirectement de valider notre méthode d'analyse et de mesure du tissu adipeux blanc.

La modification du profil des adipocytes chez les femelles traitées suggère deux mécanismes qui ne sont pas nécessairement contradictoires, soit une augmentation de la lipolyse soit une diminution de la lipogenèse. Autrement dit, l'induction des facteurs de reprogrammation semble impacter le stockage et/ou la consommation des lipides.

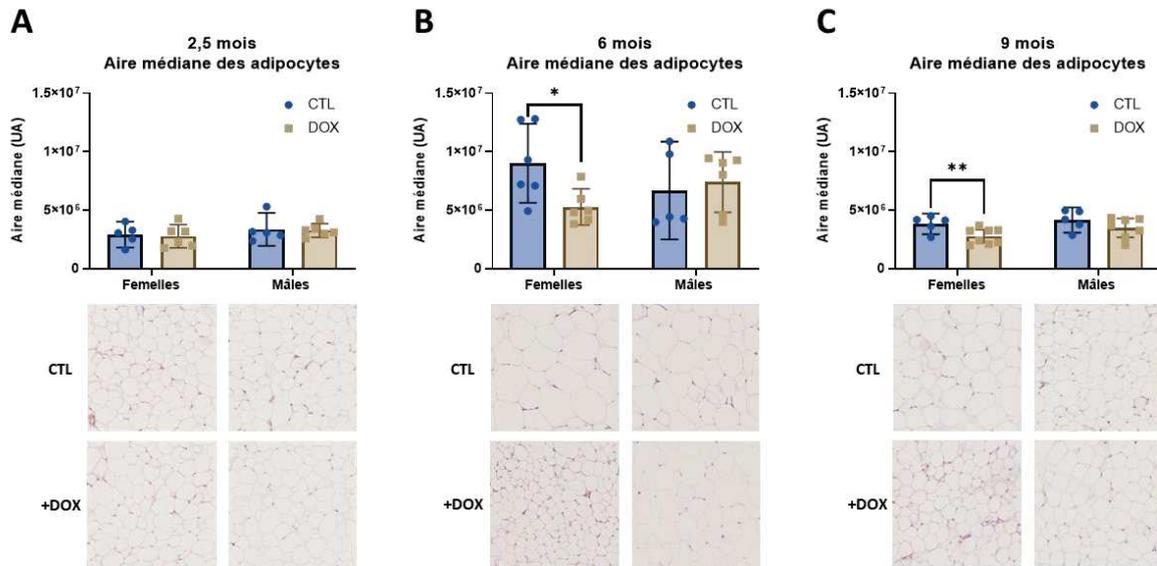


Figure 36 | Histologie du tissu adipeux blanc (WAT)

Les diagrammes en barres représentent la valeur de l'aire médiane des adipocytes pour chaque individu, mesurée dans ImageJ à 2,5 mois (A), 6 mois (B) et 9 mois (C). Les coupes en HES illustrent les résultats présentés.

Nous avons donc exploré la piste des lipides circulants et quantifié les niveaux de lipides et de lipoprotéines dans le plasma des animaux prélevés à 2,5, 6 et 9 mois (Figure 37). Chez les femelles traitées, directement à la suite de la période d'induction, on remarque par comparaison aux contrôles une diminution des acides gras libres (*non esterified fatty acid* NEFA) qui se maintient à 6 mois (Figure 37A). À 6 mois, on note également une diminution du taux de cholestérol total sans variation des taux de LDL et HDL, ainsi qu'une diminution des triglycérides sanguins. Le cholestérol et les triglycérides, lorsque leurs taux sont élevés, représentent l'un des facteurs de risque les plus importants vis-à-vis des maladies cardiovasculaires. De plus, les acides gras libres constituent une source métabolique importante pour de nombreux tissus. La diminution de leurs taux circulants associée à une diminution des taux de leur forme de stockage adipocytaire, les triglycérides, et à une réduction du volume des adipocytes et de la masse grasse semble indiquer que, chez les femelles traitées à la doxycycline, une transition métabolique s'est opérée à 6 mois et tend vers une diminution du stockage lipidique. Chez les mâles, on observe une augmentation transitoire du cholestérol et des lipoprotéines de haute densité (HDL) à la suite de l'induction de l'expression des facteurs de reprogrammation (Figure 37B). Le HDL

est considéré comme le « bon cholestérol » permettant de capter le cholestérol sanguin en excès et de le transporter vers le foie pour son élimination *via* la bile. Ces modifications du bilan lipidique ne persistent pas à 6 et à 9 mois, âges auxquels les bilans sont similaires chez les mâles traités et les mâles contrôles.

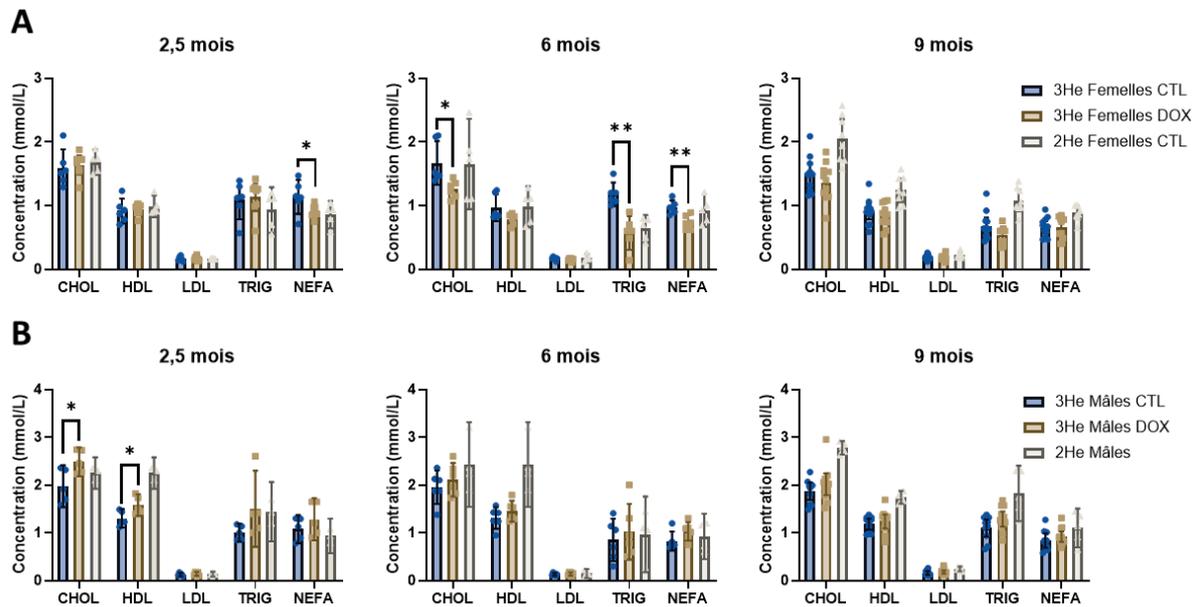


Figure 37 | Dosage des lipides plasmatiques

Quantification des niveaux protéiques de cholestérol, lipoprotéines de basse (LDL) et de haute (HDL) densité, des triglycérides et des acides gras libres (NEFA) dans le plasma des animaux femelles (A) et mâles (B) à 2,5 mois, 6 mois et 9 mois.

Afin d'essayer d'analyser plus en détails la transition indéniable s'opérant au niveau du tissu adipeux blanc, nous avons mis en place une étude des niveaux d'expression d'un ensemble de gènes présélectionnés par nos soins. Parmi les gènes choisis, on retrouve, entre autres, des gènes liés à la pluripotency, des gènes liés aux voies de la sénescence et de l'inflammation, des gènes du métabolisme cellulaire, des gènes des voies de l'autophagie et des voies de réponses cellulaires aux stress, ainsi que des adipokines (Voir détail en Tableau 8). Cette expérience a été réalisée à l'aide du système Biomark™ et de leurs circuits fluidiques intégrés (IFCs) permettant de réaliser des PCR quantitatives en microfluidique sur un grand nombre d'échantillons et contre un large panel de cibles géniques.

La Figure 38 illustre les résultats obtenus sous forme de classification non hiérarchisée des échantillons et des cibles. Les résultats ont été analysés selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La couleur bleue indique une valeur inférieure à 1, traduisant une diminution de l'expression d'un gène donné par rapport à la valeur moyenne des échantillons contrôles dont l'intensité est relative à celle de la couleur. Par opposition, la couleur rouge indique une valeur supérieure à 1 traduisant une augmentation de l'expression relative

du gène. Ces graphiques proposent une représentation visuelle globale des résultats mais ne reposent sur aucune analyse statistique et ne permettent donc pas d'interprétation précise. Globalement, on observe qu'à deux mois, les profils sont relativement similaires pour les deux sexes entre les individus contrôles et traités, hormis une fraction qui ressort en rouge vif sur le haut de la classification qui correspond aux facteurs de reprogrammation fortement exprimés chez les individus induits par la doxycycline. A 6 mois, les observations sont semblables, peu de différentiel pour les deux sexes entre les individus traités et les contrôles (Figure 38B). D'ailleurs, les figures à 2,5 mois et à 6 mois se ressemblent beaucoup. En revanche, aux âges tardifs, ici à 9 mois, on remarque un profil d'expression différentiel très net chez les femelles traitées par rapport aux contrôles avec dans l'ensemble une surexpression des gènes ciblés (Figure 38C). Ce différentiel ne se retrouve pas chez les mâles chez qui le profil est assez similaire pour tous les individus âgés, traités ou non.

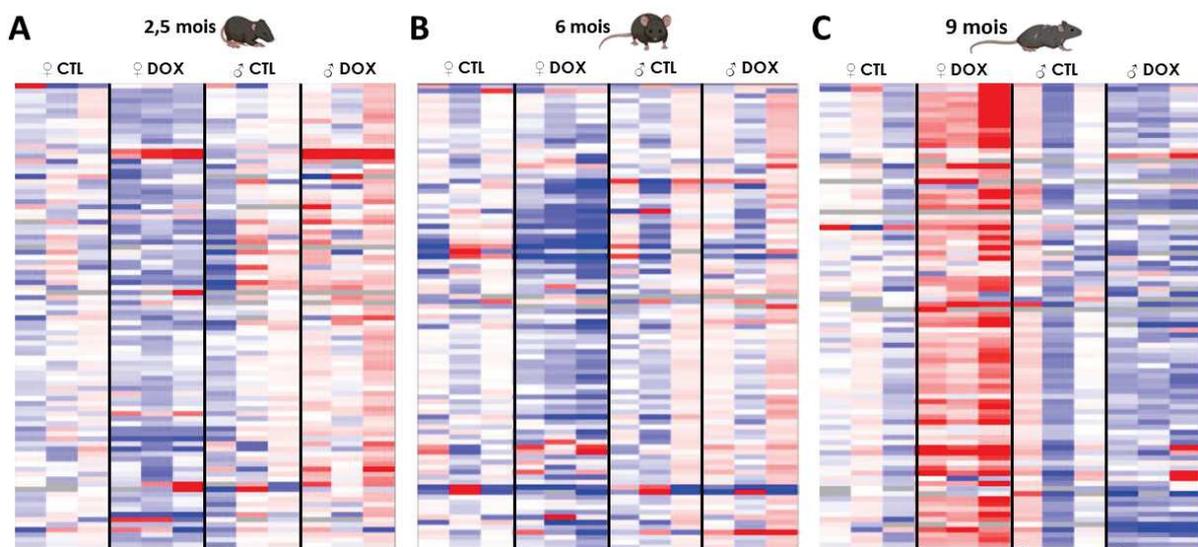


Figure 38 | Profil transcriptomique du tissu adipeux blanc

Classification non hiérarchisée des niveaux d'expression de 95 gènes présélectionnés dont les résultats ont été obtenus par RT-qPCR en microfluidique à partir des échantillons de tissu adipeux blanc prélevés à 2,5 mois (A), 6 mois (B) et 9 mois (C).

Nous allons revenir plus en détails sur les profils d'expression des gènes liés à la sénescence, à savoir ici p16, p19Arf, p21 et p53. Dans le tissu adipeux blanc, nous n'observons aucune modification des niveaux d'expression de ces gènes chez les deux sexes, que ce soit directement à la suite de l'induction des facteurs de reprogrammation (Figure 39A, D) ou à 6 mois (Figure 39B, E). A 9 mois, alors que chez les mâles, les profils restent constants, chez les femelles, on observe une augmentation significative des quantités de transcrits associés à p21 et p53. La surexpression de p21 et p53, indépendamment de p16,

pourrait suggérer une activation du cycle cellulaire et/ou des voies de réparation plutôt qu'une augmentation de la sénescence. Ces résultats ont été confirmés par l'absence de différentiel de l'intensité de coloration lors de tests de l'activité SA- β -Galactosidase sur des prélèvements frais de tissus adipeux blancs immergés dans la solution de coloration.

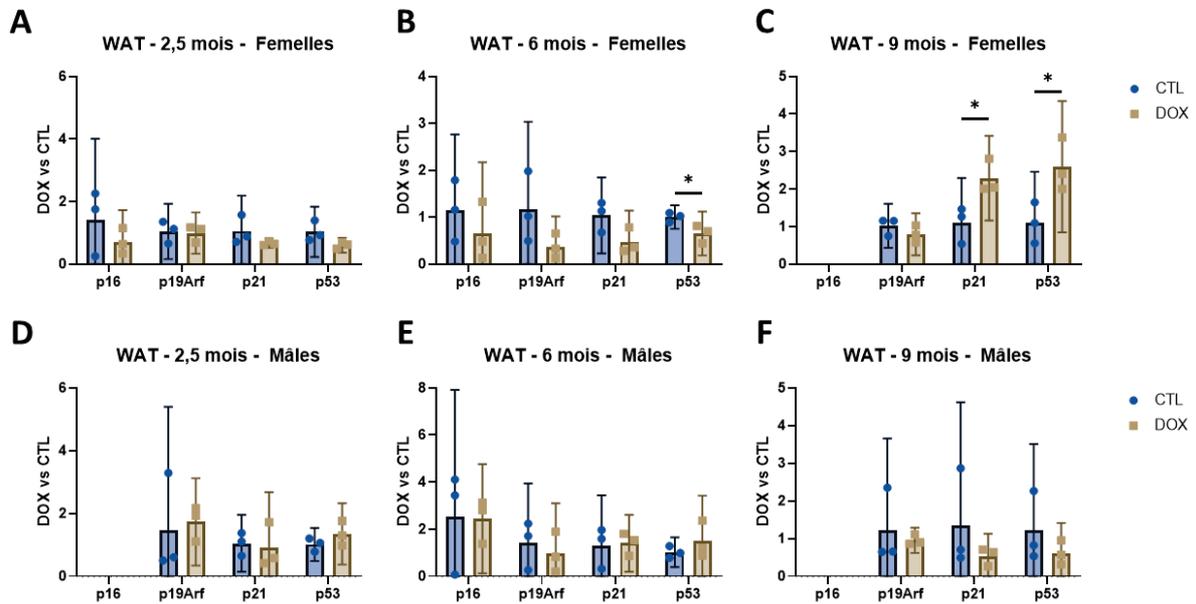


Figure 39 | Niveaux d'expression relatifs de gènes associés à la sénescence dans le tissu adipeux blanc (WAT)
 Analyses par RT-qPCR en microfluidique de gènes liés à la sénescence : p16 – p19Arf – p21 et p53. Les données ont été obtenues à partir des extractions de tissu adipeux blanc à 2,5 mois (A, D), 6 mois (B, E) et 9 mois (C, F).

Parmi les gènes criblés, nous avons sélectionné des gènes relatifs au métabolisme cellulaire dont la respiration mitochondriale avec NADPH Dhase, SDHA, CytC oxydase et ATP synthase, la β -oxydation des acides gras avec mCAD et CPT2, la thermogénèse avec UCP1, et enfin la voie de signalisation de PGC-1 α impliquée dans la biogénèse mitochondriale avec PGC-1 α lui-même, Tfam, NRF1, NRF2 et SOD2 ainsi qu'un transporteur des acides gras CD36. De plus, le gène d'une protéine constitutive de la membrane mitochondriale TOMM20 a également été étudié. Ici, nous ne présenterons que les données détaillées pour les individus femelles. Cependant une analyse similaire a été réalisée pour les échantillons mâles mais n'a révélé aucun différentiel sur l'ensemble de ces marqueurs quel que soit l'âge.

À 2,5 mois, soit directement à la suite de l'induction des facteurs de reprogrammation, on n'observe pas de modification globale du profil métabolique du tissu adipeux blanc chez les femelles, à l'exception de Tfam et NRF1 qui sont légèrement régulés à la baisse avec le traitement à la doxycycline (Figure 40A). La situation est similaire à 6 mois avec peu d'impact sur les gènes du métabolisme, à l'exception cette

fois de NRF1 et NRF2, de nouveau régulés à la baisse (Figure 40B). En revanche à 9 mois, on observe une transition métabolique majeure avec une activation de la quasi-totalité des gènes étudiés (Figure 40C). Ces résultats suggèrent une activation métabolique du tissu adipeux blanc chez les femelles aux âges tardifs, avec la stimulation de nombreuses voies métaboliques dont la chaîne de transport des électrons, la biogénèse mitochondriale ainsi que le métabolisme des lipides.

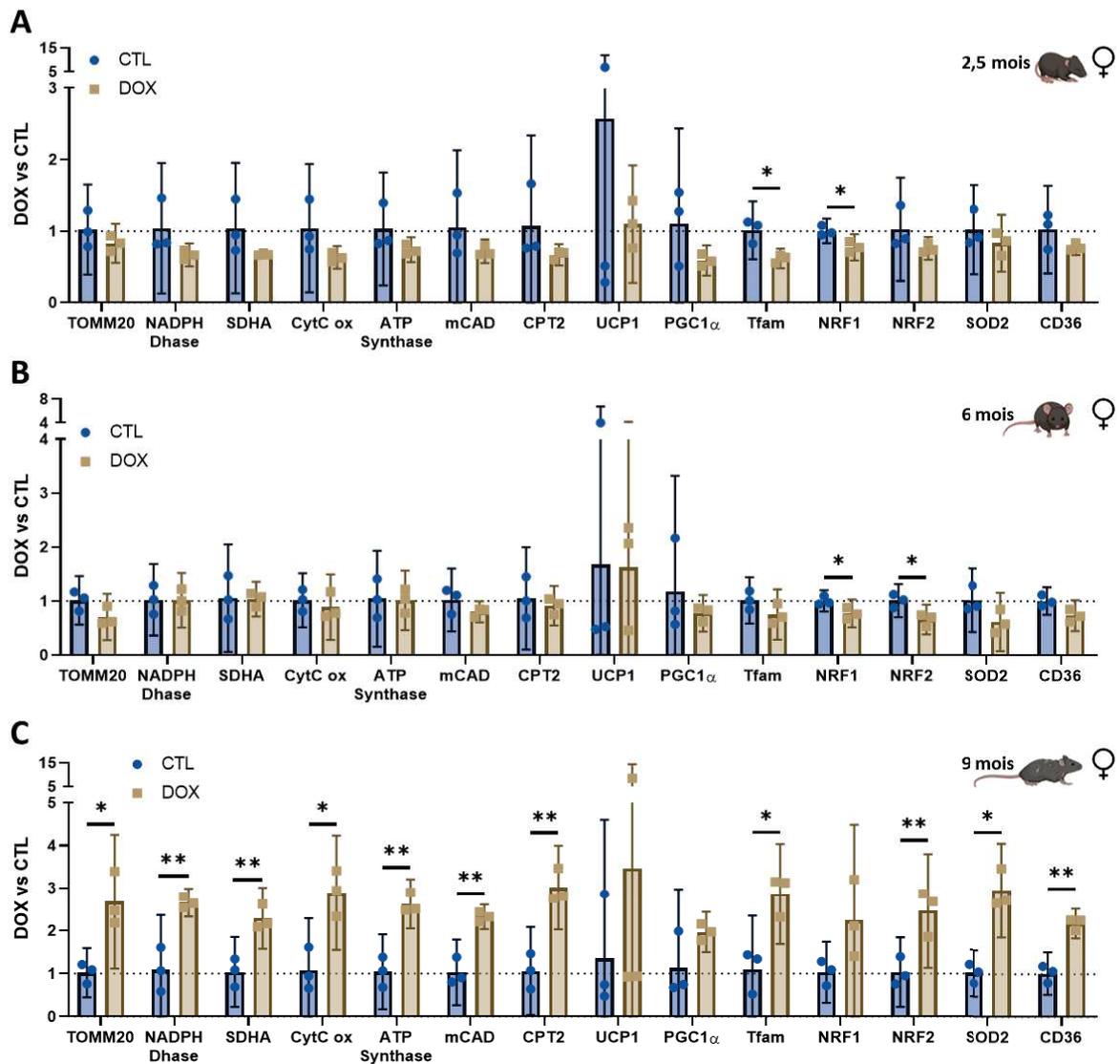


Figure 40 | Niveaux d'expression de gènes associés au métabolisme cellulaire dans le WAT des femelles

Analyses par RT-qPCR en microfluidique de gènes liés aux mitochondries (TOMM20), à la chaîne respiratoire mitochondriale (NADPH Dhase, SDHA, CytC ox, ATP synthase), à la β -oxydation des acides gras (mCAD, CPT2), à la thermogénèse (UCP1), et à la voie de signalisation liée à PGC1 α (PGC1 α , Tfam, NRF1, NRF2, SOD2) ainsi que le transporteur des acides gras CD36. Les données ont été obtenues à partir des extractions de tissu adipeux blanc chez les femelles à 2,5 mois (A), 6 mois (B) et 9 mois (C).

La quantification du ratio d'ADN mitochondrial par rapport à l'ADN nucléaire n'a révélé aucune différence, indépendamment du sexe et de l'âge (Figure 41). Ceci suggère que l'induction des facteurs de reprogrammation n'a pas d'impact sur la quantité de mitochondries présentes dans le tissu adipeux blanc des individus. Ainsi les changements métaboliques observés quant aux effecteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale, ne sont pas dus à une augmentation du nombre de mitochondries mais bien à une stimulation du régime métabolique de celles-ci.

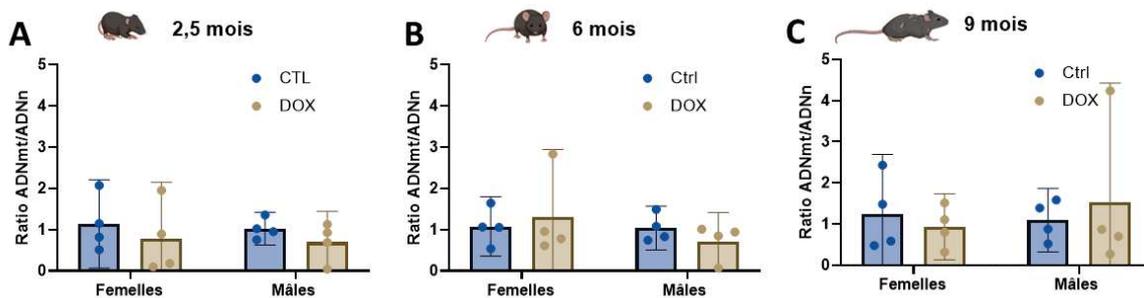


Figure 41 | Quantification du contenu mitochondrial dans le tissu adipeux blanc

Quantification par qPCR du ratio d'ADN mitochondrial par rapport à l'ADN nucléaire dans le tissu adipeux blanc des femelles et des mâles à 2,5 mois (A), 6 mois (B) et 9 mois (C).

Nous avons également exploré certains mécanismes dont les implications dans les phénomènes de vieillissement et de longévité sont largement décrites. Parmi eux, l'autophagie qui est essentielle au maintien de l'homéostasie cellulaire et à l'élimination des dommages cellulaires (Galluzzi et al., 2017). Ainsi, nous avons analysé les niveaux d'expression des transcrits de cinq protéines relatives à l'autophagie : ATG3, ATG5, ATG6, ATG7 et ATG8, aussi connue sous le nom de LC3 (Figure 42). L'analyse du tissu adipeux blanc des femelles à 3 mois n'a révélé aucun différentiel entre les conditions contrôle et traitée (Figure 42A). A 6 mois, les niveaux d'expression d'ATG3, 6 et 7 sont significativement diminués dans les échantillons traités par rapport aux contrôles (Figure 42B). Enfin aux âges tardifs, on observe une surexpression globale d'ATG3, 5, 7 et 8 dans les conditions traitées par rapport aux contrôles (Figure 42C). Ce dernier résultat suggère une stimulation globale des mécanismes autophagiques aux âges tardifs chez les femelles, qui pourrait permettre une diminution des dommages intracellulaires s'accumulant au cours du vieillissement. On peut émettre l'hypothèse que l'augmentation de ces acteurs à 6 mois dans les échantillons contrôles corresponde à l'activation des voies de maintien de l'homéostasie face à une augmentation précoce des dommages cellulaires, phénomène qui serait retardé aux âges tardifs pour les échantillons traités. Cette hypothèse semble être confirmée par l'analyse individuelle non normalisée des niveaux d'expression des transcrits aux

différents âges. Une analyse plus approfondie est en cours pour déterminer plus précisément les cinétiques d'expression. Les données obtenues dans les échantillons de tissu adipeux blanc mâle ne sont pas présentées ici, mais ont été analysées et ne présentent aucun différentiel pour ces mêmes gènes à tous les âges. Une fois de plus, ceci semble indiquer que la signature d'une reprogrammation transitoire précoce dans le tissu adipeux blanc est spécifique du sexe.

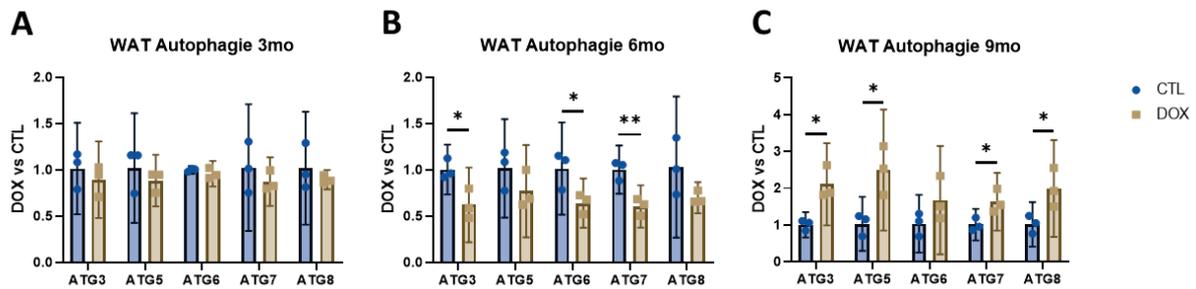


Figure 42 | Niveaux d'expression de gènes associés à l'autophagie dans le WAT des femelles

Analyses par RT-qPCR en microfluidique de gènes liés à l'autophagie : ATG3, ATG5, ATG6, ATG7 et ATG8. Les données ont été obtenues à partir des extractions de tissu adipeux blanc chez les femelles à 2,5 mois (A), 6 mois (B) et 9 mois (C).

Parmi les mécanismes impliqués dans les processus de vieillissement, nous nous sommes également intéressés au mécanisme de la réponse au stress. Ainsi nous avons étudié les niveaux d'expression relatifs de différents effecteurs de cette voie, tels que SOD1, GPX2, certaines protéines de la famille FOX (FOXO1 et 3), de la famille des sirtuines (SIRT1 et 6) et de l'histone désacétylase HDAC6 (Figure 43). Les résultats révèlent de nouveau que le tissu adipeux blanc des femelles est principalement impacté aux âges tardifs. Ainsi, à 9 mois, une surexpression de SOD1 et GPX2 est notable (Figure 43C). Ces résultats suggèrent une stimulation de la réponse au stress oxydant, permettant ainsi, couplée à la stimulation autophagique, une amélioration des systèmes de protection et de maintien de l'homéostasie cellulaire et donc potentiellement une amélioration de la physiologie cellulaire.

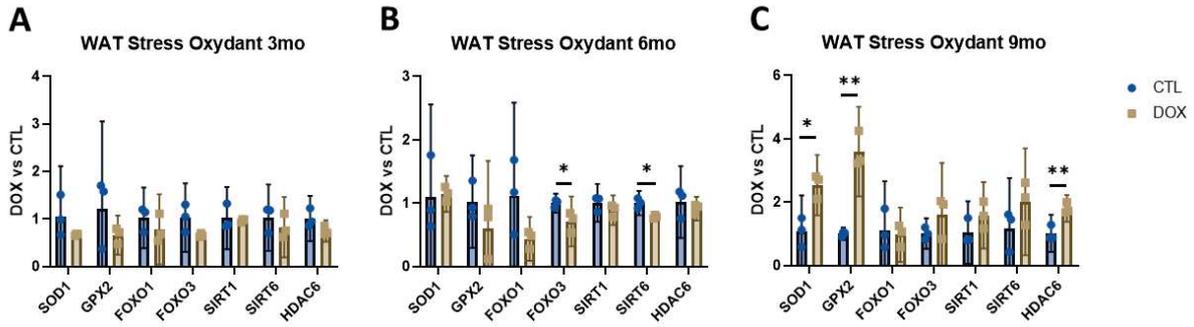


Figure 43 | Niveaux d'expression de gènes associés à la réponse au stress oxydant dans le WAT des femelles
 Analyses par RT-qPCR en microfluidique de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant : la superoxyde dismutase (SOD1), la glutathion peroxydase (GPX2), la famille des protéines FOX (FOXO1, FOXO3), des sirtuines (SIRT1, SIRT6) et des histone désacétylase (HDAC6). Les données ont été obtenues à partir des extractions de tissu adipeux blanc chez les femelles à 2,5 mois (A), 6 mois (B) et 9 mois (C).

Parmi les gènes cibles, nous avons également sélectionné GDF11 pour ses propriétés comme facteur de jouvence (Egerman and Glass, 2019). Étonnamment, nous avons détecté une forte expression de l'ARNm de GDF11 dans les échantillons de tissu adipeux blanc à 9 mois des femelles traitées alors que celui-ci était indétectable dans les échantillons contrôles (Figure 44A). Katsimpardi et al. ont démontré récemment que des injections systémiques de GDF11 induisaient un phénotype similaire à celui induit par la restriction calorique grâce à la sécrétion d'adiponectine (Katsimpardi et al., 2020). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la sécrétion des adipokines par le tissu adipeux et en particulier à l'adiponectine. Cependant, les dosages dans les prélèvements de plasma des individus femelles, que ce soit à 2,5, 6 ou 9 mois, n'ont révélé aucune différence significative entre les conditions traitées et contrôles (Figure 44B). La tendance, bien que non significative, indiquait même plutôt une diminution des taux d'adiponectine circulante aux âges tardifs. Les résultats obtenus par dosage protéique ont été confirmés par les transcrits dont les niveaux d'expression relatifs ne varient pas à 2,5 et 6 mois (Figure 44C). Enfin, de façon surprenante, des variations ont été remarquées sur une autre adipokine, la leptine. En effet, à 2,5 mois une nette augmentation, de 2 à 3 fois, des transcrits de la leptine a été observée chez les femelles traitées. A 6 mois en revanche, on observe une tendance inverse, à la limite de la significativité, avec une diminution de plus de moitié du nombre de transcrits de la leptine. La leptine est généralement considérée comme l'hormone de la satiété. Son augmentation à la suite de l'induction des facteurs de reprogrammation semble cohérente avec la modification du comportement alimentaire précédemment décrite (Figure 22). D'un point de vue métabolique, la leptine induit une lipolyse et inhibe la lipogénèse permettant ainsi une réduction de la masse grasse (Harris, 2014), ce qui est également conforme avec nos observations sur la composition corporelle. Enfin, la tendance vers une

diminution de la leptine pourrait *a contrario* permettre la stabilisation de la masse grasse à 6 mois, participant ainsi à la prévention de la perte de poids observée chez les contrôles aux âges tardifs.

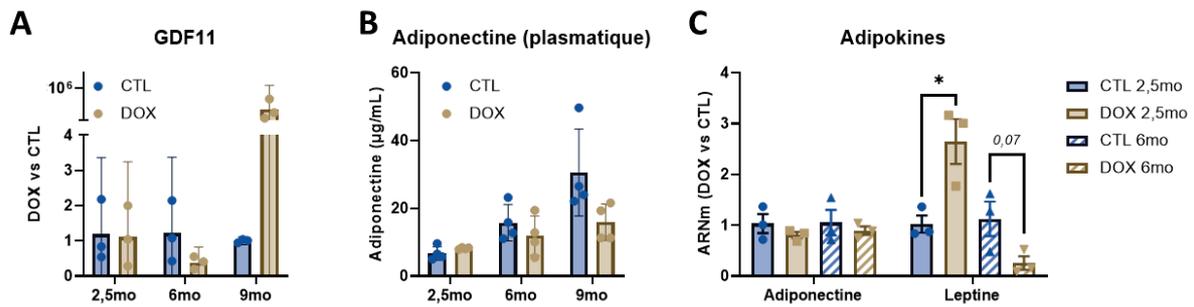


Figure 44 | Profil sécrétoire du tissu adipeux blanc des femelles

- A. Analyse par RT-qPCR en microfluidique des niveaux d'expression des ARNm associés à GDF11.
 B. Quantification par méthode immuno-enzymatique ELISA de l'adiponectine dans le plasma.
 C. Analyse par RT-qPCR en microfluidique des niveaux d'expression des ARNm associés à deux adipocytokines, l'adiponectine et la leptine, dans le tissu adipeux blanc.

3.2.8 Étude du tissu musculaire strié squelettique

L'étude de la composition corporelle a également révélé des modifications importantes quant à la masse maigre, principalement constituée par la masse musculaire. Ces modifications se sont avérées avoir un impact positif sur les capacités fonctionnelles des animaux. Nous sommes donc allés voir au niveau tissulaire les impacts de notre protocole de reprogrammation transitoire précoce.

L'analyse des coupes de tibialis prélevés à 9 mois, colorés en hématoxyline éosine (HE), n'a pas permis de révéler d'anomalie tissulaire majeure. Nous avons exploré les niveaux de fibrose tissulaire dans le muscle grâce à une coloration au rouge sirius, et ils se sont également révélés identiques chez les individus traités et contrôles quel que soit le sexe, de même que la surface des sections de muscle (Figure 45). Une analyse plus approfondie des fibres musculaires est en cours. En effet, à l'aide d'un marquage immunofluorescent contre la laminine, principal constituant de la lame basale entourant les fibres, nous avons obtenu des images permettant la quantification et la mesure de l'ensemble des fibres musculaires constituant le muscle. Bien qu'ayant été semi-automatisée, l'analyse de ces images requiert un temps conséquent qui n'a pas permis d'obtenir l'ensemble des résultats à ce jour.

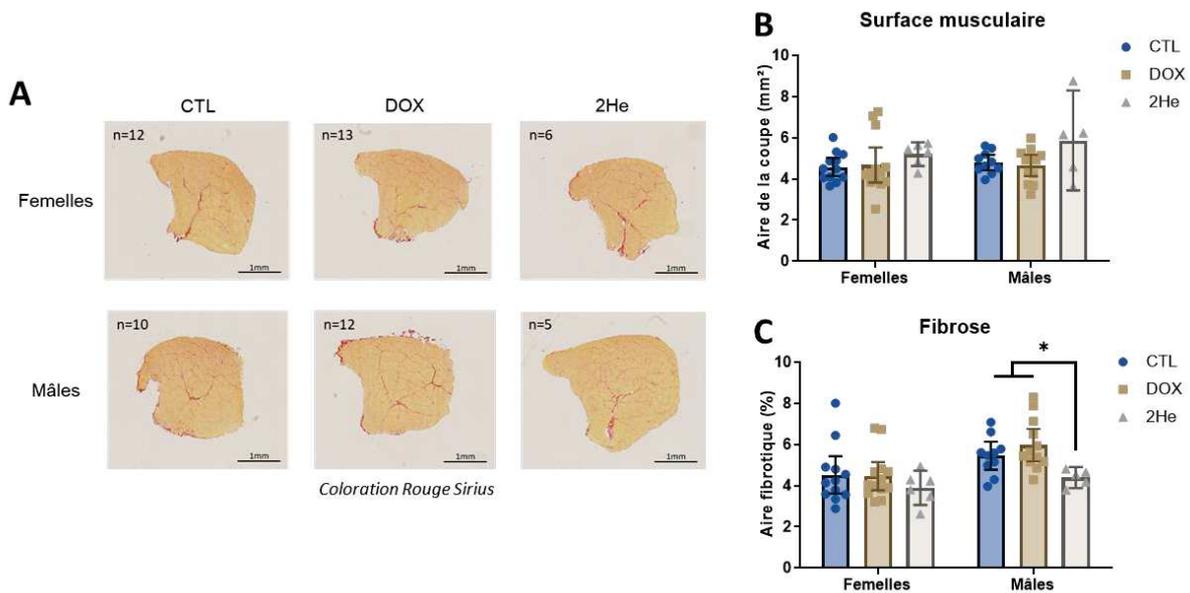


Figure 45 | Histologie des niveaux de fibrose à 9 mois dans le tissu musculaire strié squelettique

- A. Images représentatives des coupes histologiques de tibialis à 9 mois en coloration Rouge Sirius permettant de mettre en évidence les fibres de collagènes afin d'évaluer les niveaux de fibrose tissulaire.
- B. Diagramme en barres des mesures de surface des coupes de tibialis prélevés sur nos animaux progéniteurs reprogrammables à 9 mois.
- C. Diagramme en barres de la quantification de l'aire fibrotique rapportée à la surface de la coupe sur nos animaux progéniteurs reprogrammables à 9 mois.

Comme pour le tissu adipeux blanc, nous avons réalisé une étude transcriptomique partielle sur nos échantillons musculaires aux trois âges avec le même panel de gènes décrit précédemment (Figure 46). Et de même, il s'agit d'une proposition de représentation graphique afin d'avoir une vue d'ensemble des résultats mais celle-ci reste visuelle et n'a pas été soumise à une analyse statistique. Dans l'ensemble, les profils à 2,5 mois, que ce soit chez les mâles ou chez les femelles, sont très similaires entre les individus contrôles et traités (Figure 46A). En revanche à 6 mois, le profil des individus traités est fortement singulier par rapport aux contrôles. Dans l'ensemble, une grande majorité des gènes étudiés sont surexprimés chez les individus traités à la doxycycline, sauf un mâle qui semble ne pas répondre de la même façon (Figure 46B). Enfin aux âges tardifs, on observe toujours un profil de surexpression globale chez les mâles traités à la doxycycline alors que chez les femelles, bien que le profil se distingue toujours des individus contrôles, on est plutôt sur une inhibition globale des gènes étudiés (Figure 46C).

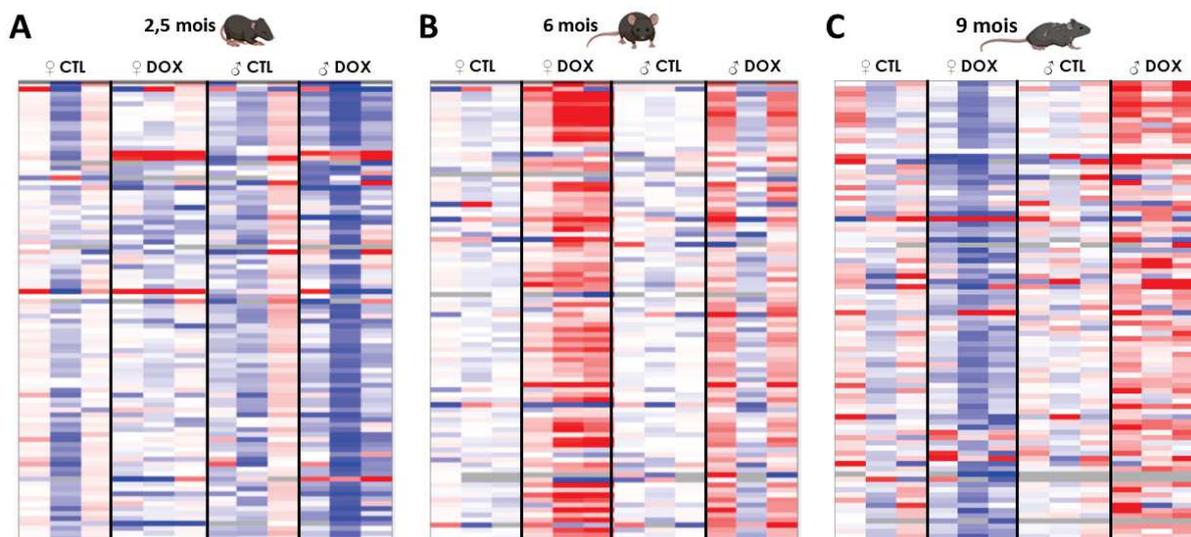


Figure 46 | Profil transcriptomique du tissu musculaire strié squelettique

Classification non hiérarchisée des niveaux d'expression de 95 gènes présélectionnés dont les résultats ont été obtenus par RT-qPCR en microfluidique à partir des échantillons de quadriceps prélevés à 2,5 mois (A), 6 mois (B) et 9 mois (C).

Nous allons revenir plus en détails sur certains ensembles thématiques de gènes comme nous l'avons fait précédemment pour le tissu adipeux blanc. Ici, nous choisissons de présenter les résultats sur les deux sexes qui présentent des signatures singulières intéressantes.

L'analyse des gènes du métabolisme comprend, comme précédemment, des indicateurs de l'activité respiratoire mitochondriale (TOMM20, NADPH Dase, SDHA, CytC ox, ATP synthase), du catabolisme des acides gras (mCAD, CPT2, CD36), de la thermogénèse (UCP1) et de la voie de signalisation liée à PGC-1 α (PGC-1 α , Tfam, NRF1, NRF2, SOD2). Chez les femelles, aucun différentiel sur l'ensemble de ces gènes n'est observé dans le tissu musculaire directement après l'induction des facteurs de reprogrammation, correspondant à un âge de 2,5 mois (Figure 47A). En revanche, à 6 mois, on observe un fort différentiel vers une surexpression de la quasi-totalité des gènes étudiés dans les conditions traitées par rapport aux contrôles (Figure 47B). On peut noter que dans le tissu musculaire des femelles, cette stimulation du métabolisme respiratoire et lipidique apparaît plus précocement par rapport à nos observations dans le tissu adipeux blanc, suggérant ainsi des dynamiques tissu spécifiques. Enfin, toujours dans le tissu musculaire des femelles mais aux âges tardifs, cette activation globale du métabolisme semble s'être atténuée pour revenir à un niveau basal, comparable à celui des individus contrôles (Figure 47C).

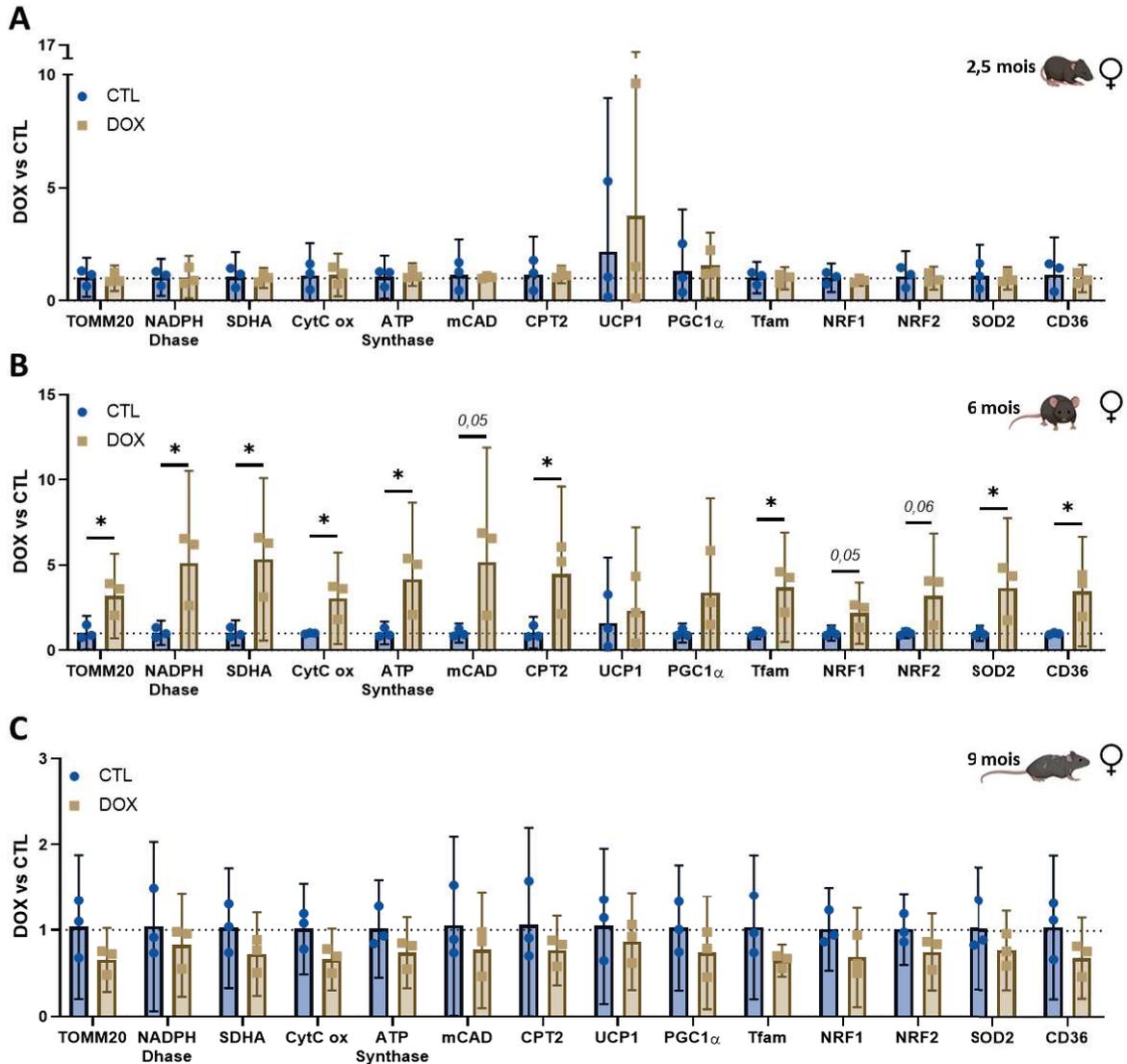


Figure 47 | Niveaux d'expression de gènes associés au métabolisme cellulaire dans le muscle des femelles
 Analyses par RT-qPCR en microfluidique de gènes liés aux mitochondries (TOMM20), à la chaîne respiratoire mitochondriale (NADPH Dhase, SDHA, CytC ox, ATP synthase), à la β -oxydation des acides gras (mCAD, CPT2), à la thermogénèse (UCP1), et à la voie de signalisation liée à PGC1 α (PGC1 α , Tfam, NRF1, NRF2, SOD2) ainsi que le transporteur des acides gras CD36. Les données ont été obtenues à partir des extractions de tissu musculaire chez les femelles à 2,5 mois (A), 6 mois (B) et 9 mois (C).

Chez les mâles, la dynamique semble décalée par rapport aux femelles. A la fin de la période d'induction, aucun différentiel n'est observable entre les échantillons traités et contrôles (Figure 48A). Cependant, on observe chez les individus traités une tendance non significative vers une stimulation globale du métabolisme cellulaire musculaire à 6 mois (Figure 48B). On remarque que sur les trois individus DOX analysés, l'un d'entre eux semble se comporter de façon similaire aux contrôles et ne pas répondre à la doxycycline comme les deux autres. Pour confirmer ou infirmer cette tendance, il serait pertinent d'augmenter le nombre d'échantillons, renforçant ainsi l'analyse statistique. Enfin,

contrairement aux femelles, chez les mâles cette tendance semble se maintenir *a minima* partiellement aux âges tardifs, pour lesquels on observe une surexpression significative des effecteurs de la respiration mitochondriale SDHA, CytC ox et ATP synthase, ainsi qu'une tendance à la limite de la significativité pour certains membres de la voie PGC-1 α dont PGC-1 α lui-même, Tfam et NRF1 (Figure 48C).

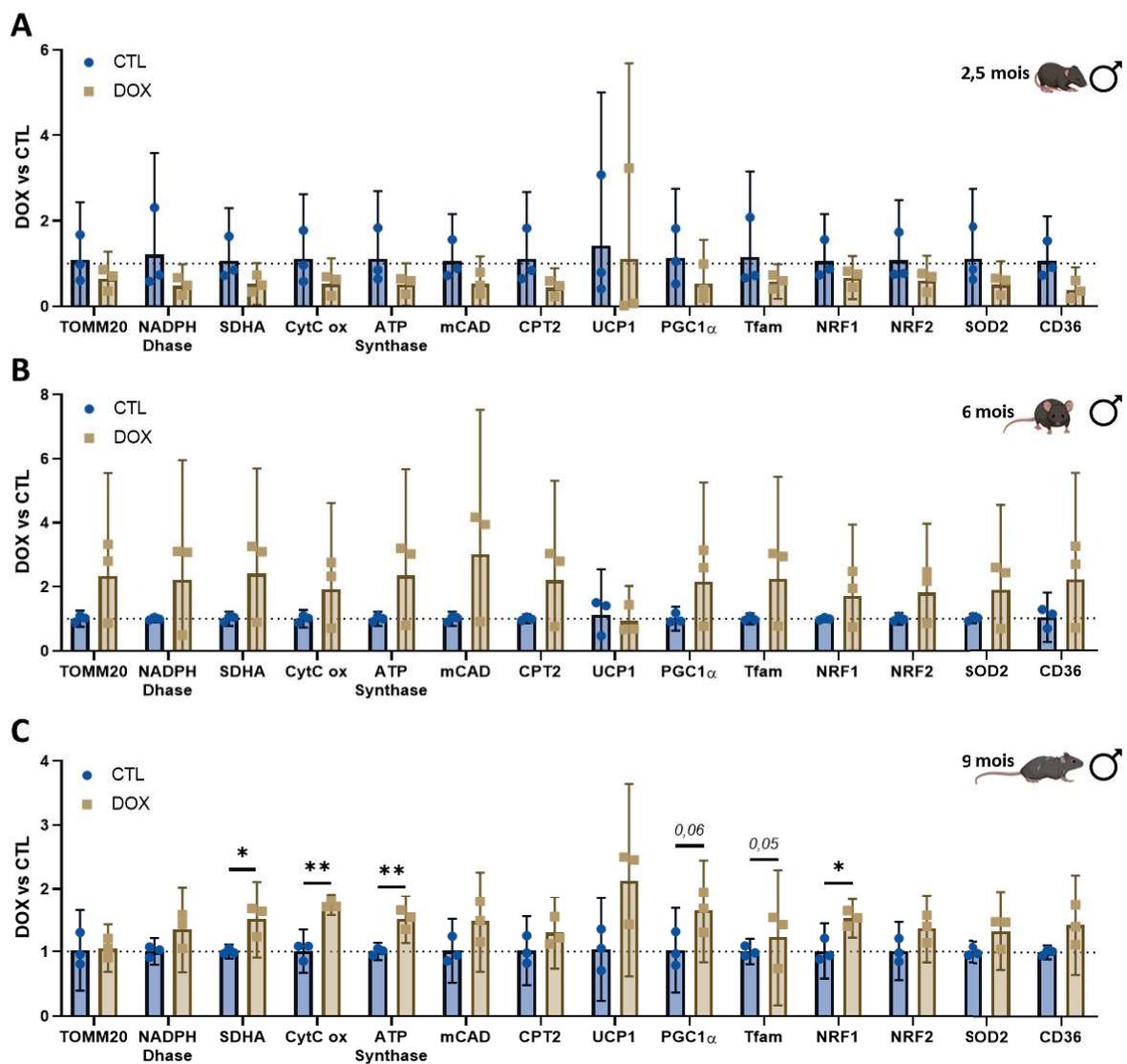


Figure 48 | Niveaux d'expression de gènes associés au métabolisme cellulaire dans le muscle des mâles

Analyses par RT-qPCR en microfluidique de gènes liés aux mitochondries (TOMM20), à la chaîne respiratoire mitochondriale (NADPH Dhase, SDHA, CytC ox, ATP synthase), à la β -oxydation des acides gras (mCAD, CPT2), à la thermogénèse (UCP1), et à la voie de signalisation liée à PGC1 α (PGC1 α , Tfam, NRF1, NRF2, SOD2) ainsi que le transporteur des acides gras CD36. Les données ont été obtenues à partir des extractions de tissu musculaire chez les mâles à 2,5 mois (A), 6 mois (B) et 9 mois (C).

Concernant les profils d'expression génique relatifs à l'autophagie, les analyses ont confirmé chez les femelles une activation exclusivement à 6 mois de quatre des cinq effecteurs sélectionnés, avec le dernier à la limite de la significativité (Figure 49A, B, C). Chez les mâles, cette activation est plus modérée et plus tardive, puisqu'elle concerne principalement la surexpression d'ATG3 et 5 aux âges tardifs (Figure 49D, E, F). Ces résultats confirment la chronologie décrite pour le panel métabolisme, à savoir pas d'effets immédiats à la suite de la période d'induction des facteurs de reprogrammation puis une activation plus précoce dans le tissu musculaire chez les femelles visible dès 6 mois et révélée plus tardivement chez les mâles à 9 mois.

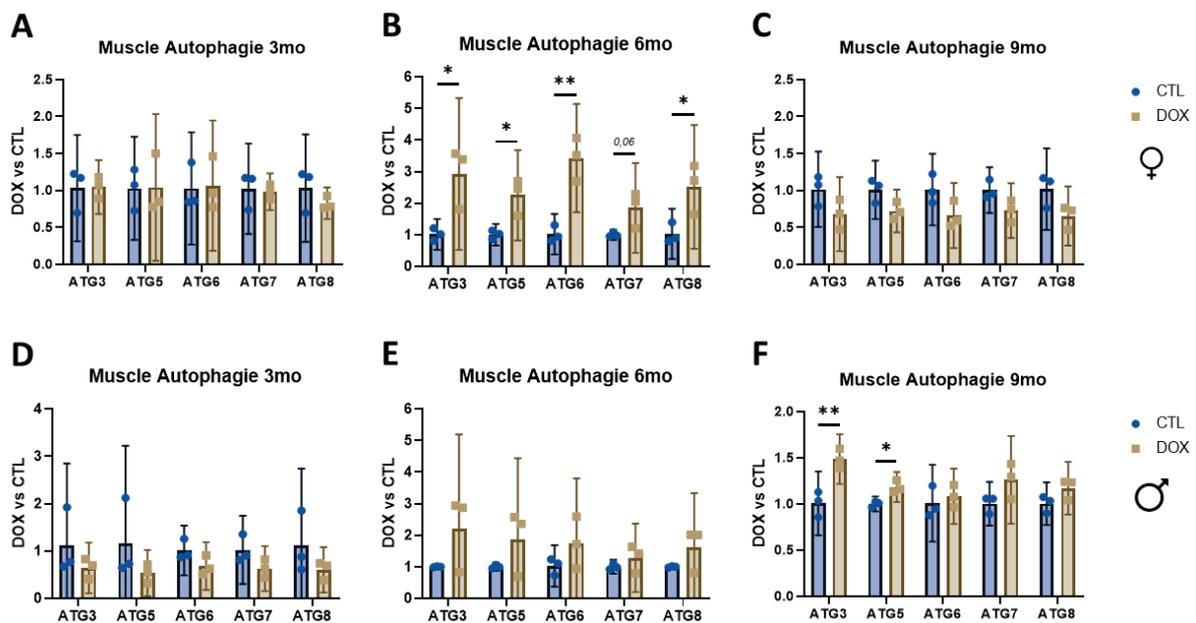


Figure 49 | Niveaux d'expression de gènes associés à l'autophagie dans le muscle

Analyses par RT-qPCR en microfluidique de gènes liés à l'autophagie : ATG3, ATG5, ATG6, ATG7 et ATG8. Les données ont été obtenues à partir des extractions de tissu musculaire chez les femelles et les mâles respectivement à 2,5 mois (A/D), 6 mois (B/E) et 9 mois (C/F).

Enfin, concernant la réponse au stress oxydant, on observe une surexpression significative de SOD1, SIRT1, SIRT6 et HDAC6 chez les femelles traitées par rapport aux contrôles à 6 mois qui n'est présente ni à 2,5 mois ni à 9 mois (Figure 50A, B, C). En revanche chez les mâles, quel que soit leur âge, il ne semble pas y avoir d'effet de la reprogrammation transitoire précoce sur cet ensemble de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (Figure 50D, E, F).

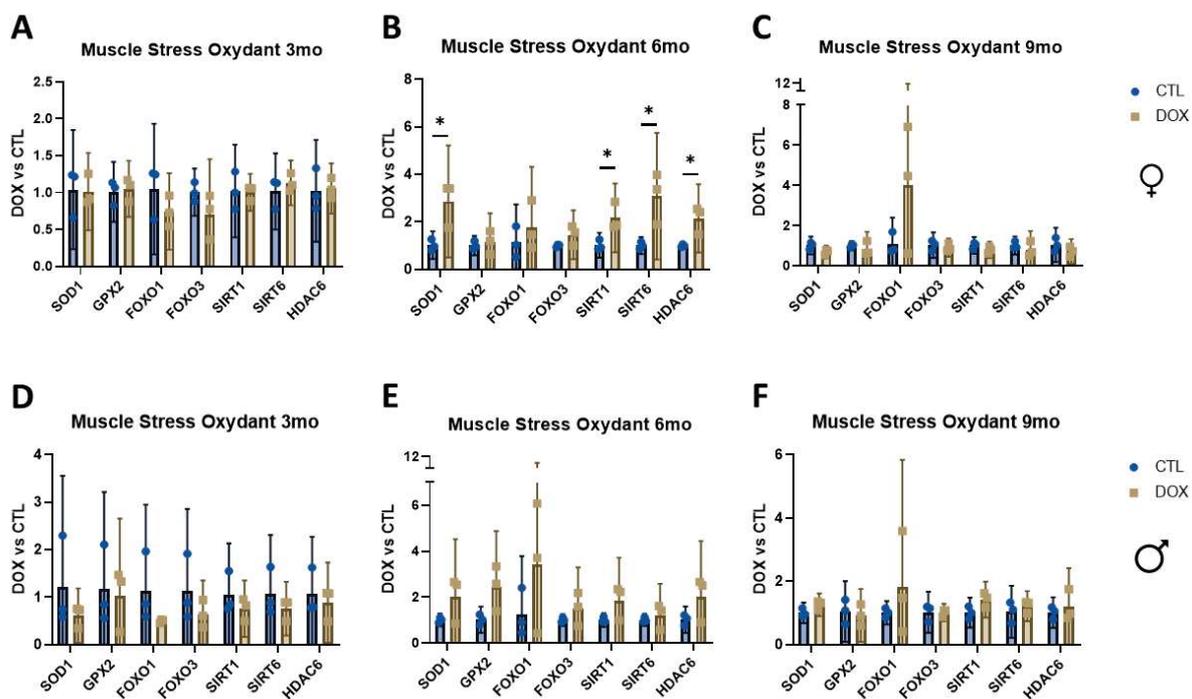


Figure 50 | Niveaux d'expression de gènes associés à la réponse au stress oxydant dans le muscle

Analyses par RT-qPCR en microfluidique de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant : la superoxyde dismutase (SOD1), la glutathion peroxydase (GPX2), la famille des protéines FOX (FOXO1, FOXO3), des sirtuines (SIRT1, SIRT6) et des histone désacétylase (HDAC6). Les données ont été obtenues à partir des extractions de tissu musculaire chez les femelles et les mâles respectivement à 2,5 mois (A/D), 6 mois (B/E) et 9 mois (C/F).

Le muscle squelettique adulte possède un fort potentiel régénérateur. Il contient une niche de cellules souches multipotentes : les cellules satellites. Ces cellules sont à l'état quiescent en périphérie des fibres musculaires lorsque le muscle est à l'état sain, mais en cas de stimuli environnementaux et/ou physiologiques, elles sont capables de migrer au centre des fibres et de s'y différencier en cellules musculaires fonctionnelles afin de régénérer les fibres. Lorsqu'elles sont à l'état quiescent, les cellules satellites expriment deux facteurs permettant de les identifier : PAX3 et PAX7, et dont l'expression diminue lorsqu'elles entrent en processus de différenciation (Relaix et al., 2005). Afin de tenter de quantifier indirectement la population de cellules souches au sein du tissu musculaire, nous nous sommes intéressés à la quantification des transcrits relatifs à PAX7 (Figure 51). Ainsi nous avons pu observer que, quel que soient l'âge et le sexe, il ne semble pas y avoir de différence significative dans l'expression relative des transcrits de PAX7. Ces résultats suggèrent qu'il n'y aurait pas de modification du pool de cellules souches au sein du tissu musculaire suite à une reprogrammation transitoire précoce. Cependant, il s'agit là d'une mesure indirecte de la population souche musculaire. Il serait pertinent de confronter ces résultats avec l'analyse et la quantification de cette même population souche sur les lames histologiques que nous avons pu obtenir.

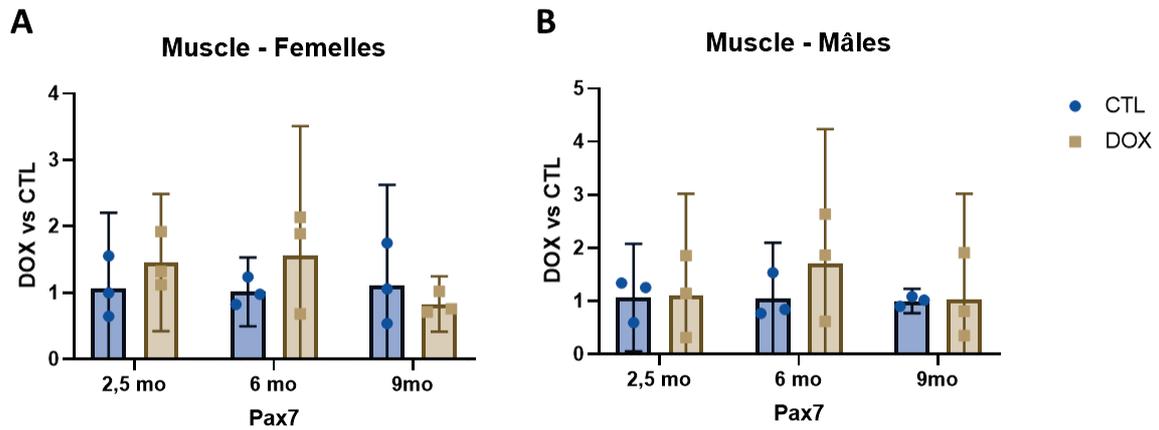


Figure 51 | Niveaux d'expression d'un marqueur des cellules souches musculaires

Analyses par RT-qPCR en microfluidique du gène *Pax7* pour *paired box protein 7*, un marqueur caractéristique des cellules satellites. Les données ont été obtenues à partir des extractions de tissu musculaire chez les femelles (A) et les mâles (B) à 2,5 mois, 6 mois et 9 mois.

Dans l'ensemble, bien que l'analyse histologique du tissu musculaire n'ait pas révélé de différence ultrastructurale importante, les résultats du profil transcriptomique partiel révèlent l'activation du métabolisme respiratoire global et du catabolisme des acides gras avec des dynamiques spécifiques au sexe. En effet, chez les femelles, le tissu musculaire semble majoritairement stimulé transitoirement aux alentours de 6 mois alors que chez les mâles, bien que la tendance semble s'initier à 6 mois, elle se révèle et se maintient aux âges tardifs.

4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

En appliquant le principe d'une reprogrammation transitoire *in vivo* selon un protocole précoce unique, nous avons pu confirmer la pertinence de cette approche. En effet, une induction partielle et transitoire des facteurs de reprogrammation OSKM réalisée à 2 mois chez des animaux hétérozygotes progéria, permet un allongement de 10 semaines de l'espérance de vie au troisième quartile. De plus, de nombreuses observations indiquent que l'état de santé global est amélioré, avec notamment une préservation des structures tissulaires impactant positivement leurs fonctionnalités. Ces résultats ont permis de rédiger la publication présentée en 3.1, qui a ensuite été discutée dans la section 3.1.3. Dans ce chapitre, nous ne reviendrons pas sur les conclusions abordées dans cet article. Néanmoins, la découverte d'un effet mémoire lié à une reprogrammation transitoire précoce unique nous a permis d'établir un ensemble d'hypothèses sous-jacentes (Figure 18). Une partie de mes travaux de thèse a consisté à explorer la piste d'un mécanisme métabolique suite à une reprogrammation transitoire précoce unique dont les résultats, présentés précédemment, seront discutés dans ce chapitre.

4.1 REPROGRAMMATION TRANSITOIRE PRECOCE ET TRANSITION METABOLIQUE

Ainsi pour tenter d'expliquer les effets à long terme d'une reprogrammation transitoire précoce unique, nous avons exploré la piste d'une reprogrammation métabolique. En effet, il a été décrit *in vitro* que, lors d'une reprogrammation complète de cellules somatiques en iPSCs, une reprogrammation métabolique s'opère, allant d'un métabolisme principalement basé sur la phosphorylation oxydative vers un métabolisme glucidique plus rapide pour répondre aux besoins énergétiques croissants des cellules pluripotentes. L'analyse du métabolisme *in vivo* suite à notre protocole de reprogrammation transitoire précoce, a révélé une modification importante de la composition corporelle des animaux avec une réduction de la proportion de masse grasse au profit de la masse maigre. Cette transition s'accompagne d'une modification de la prise alimentaire en termes de quantités individuelles moyennes, qui pourrait s'expliquer par une augmentation de la sécrétion de leptine par le tissu adipeux blanc, aussi appelée hormone de la satiété. Nous avons également pu mettre en évidence un changement du métabolisme respiratoire global, avec notamment une augmentation du ratio d'échange respiratoire indiquant une transition d'une source de substrats mixtes, lipidiques et glucidiques, vers une préférence majoritairement glucidique. Une transition métabolique globale a également pu être décrite au niveau transcriptomique dans le tissu adipeux blanc, en particulier chez les femelles à 9 mois, avec une surexpression de nombreux facteurs relatifs aux métabolismes mitochondriaux et lipidiques, sans pour

autant noter de modifications de la quantité de mitochondries. Ces résultats suggèrent que notre protocole d'induction transitoire précoce des facteurs de reprogrammation permettrait de stimuler les capacités mitochondriales ainsi que les capacités métaboliques globales du tissu adipeux blanc, dont les conséquences peuvent s'observer à l'échelle de l'organisme. Les niveaux réduits de certaines lipoprotéines chez les femelles à 6 mois laissent à penser qu'un mécanisme tendant à réduire le stockage des lipides se met en place. De plus, nos résultats ont mis en évidence l'implication de mécanismes de maintien de la physiologie cellulaire tels que l'autophagie ou la réponse au stress oxydant, qui pourraient également participer à l'amélioration du maintien des fonctions à l'échelle tissulaire.

Au niveau musculaire, bien que des effets importants aient pu être observés sur la composition corporelle et la masse maigre, et ce notamment chez les mâles, les premières analyses histologiques n'ont pas montré de modifications de l'ultrastructure globale ni de la fibrose musculaire. Ce dernier point n'est pas nécessairement surprenant étant donné que nous ne sommes pas dans un contexte de blessure induisant un remodelage important du tissu musculaire, mais dans un contexte de vieillissement. L'analyse plus fine des fibres musculaires aux âges tardifs, à savoir la détermination de leur nombre et de leur répartition de taille, n'est pas encore terminée et pourrait révéler des effets propres à l'induction des facteurs de reprogrammation. En effet, l'analyse transcriptomique partielle du tissu musculaire a indiqué une importante transition métabolique chez les animaux à 6 mois pour les femelles et également initiée chez les mâles, bien que confirmée plus tardivement dans les échantillons à 9 mois. On peut supposer que cette transition métabolique pourrait s'accompagner d'un remaniement de la distribution du type de fibres musculaires. Il existe deux types de fibres musculaires, les fibres de type I dites oxydatives à contraction lente, riches en mitochondries et permettant un effort peu puissant mais prolongé, et les fibres de type II dites glycolytiques à contraction rapide, plus pauvres en mitochondries mais riches en glycogène, permettant un effort puissant mais rapidement fatigables. Au cours du vieillissement, outre la perte globale de masse musculaire associée à une diminution du nombre de fibres, on observe aussi une diminution du diamètre des fibres de type II, conduisant ainsi à une transition du type de fibres musculaires de rapides (type II) vers lentes (type I) (Miljkovic et al., 2015). D'un point de vue mécanistique, différentes voies de signalisation ont pu être identifiées dans les mécanismes de protection des fibres musculaires contre le vieillissement, et notamment les voies liées à PGC-1 α , de l'autophagie et liées à la famille des protéines FOX (Wang and Pessin, 2013). Il s'avère que dans nos échantillons nous avons justement mis en évidence que ces voies étaient impactées par notre protocole de reprogrammation transitoire précoce, ce qui renforce l'hypothèse d'un remodelage du typage des fibres musculaires.

Certaines analyses complémentaires restent à être effectuées sur les échantillons déjà collectés. Nous avons projeté de réaliser l'analyse du méthylome à 2,5 mois et 9 mois sur les échantillons d'ADN,

extraits à partir du tissu adipeux blanc (WAT) et du muscle de nos animaux. Les échantillons ont déjà été envoyés pour séquençage et nous avons reçu les résultats qui seront prochainement analysés. Ainsi cette étude nous permettra de faire le lien avec les résultats de notre première publication et de confirmer une signature épigénétique dans ces deux tissus également. De plus, nous avons également prévu de réaliser un projet de séquençage de l'ARN du WAT et du muscle, à 2,5 mois, 6 mois et 9 mois, afin de compléter notre étude transcriptomique et ainsi tenter d'identifier plus largement certains des mécanismes mis en jeu. L'ensemble de ces résultats seront amenés à être compilés avec ceux déjà obtenus afin de rédiger une seconde publication au premier semestre 2022.

Un des aspects du métabolisme au sens large du terme que nous n'avons pas eu l'opportunité d'explorer jusqu'alors, est le microbiote intestinal. En effet, des implications entre microbiote intestinal et métabolisme énergétique de l'hôte ont pu être mises en évidence (Delzenne and Cani, 2008). Il serait donc intéressant d'aller voir dans quelle mesure la transition métabolique observée chez nos animaux, suite à une reprogrammation transitoire, impacte la composition et la fonctionnalité du microbiote intestinal vis-à-vis des processus énergétiques de l'hôte et dans un contexte global de vieillissement. Cependant, dans le modèle murin que nous utilisons actuellement, ces expériences seraient délicates à mener du fait de l'utilisation de la doxycycline, un antibiotique antibactérien, pour induire l'expression des facteurs de reprogrammation. Ainsi, l'administration de doxycycline seule, c'est-à-dire indépendamment de l'expression des facteurs de reprogrammation, pourrait induire des modifications du microbiote intestinal ce qui compromettrait la pertinence des analyses.

4.4 REPROGRAMMATION TRANSITOIRE PRECOCE ET CELLULES SOUCHES

Parmi les hypothèses que nous avons mentionnées précédemment pour tenter d'expliquer les effets à long terme d'une reprogrammation transitoire précoce (Figure 18), l'une d'elles reposait sur les cellules souches. Nous avons tenté d'explorer cette voie dans le muscle avec le marquage Pax7 des coupes de tibialis. Cependant, la difficulté de l'analyse des lames ne nous a pas encore permis d'obtenir de résultats concluants. Néanmoins, nous disposons de l'ensemble des prélèvements musculaires aux trois âges, nous permettant un suivi des populations souches résidentes dans le muscle. L'analyse du profil transcriptomique de ces échantillons par RT-qPCR n'a pas permis de mettre en évidence une modification de l'expression relative de PAX7 suite à une reprogrammation transitoire précoce, quel que soient le sexe ou l'âge. Cependant, une étude récemment publiée a donné des résultats soutenant cette hypothèse, démontrant qu'une reprogrammation partielle spécifiquement dans les fibres

musculaire induit un remodelage de la niche des cellules souches et améliore la régénération dans un contexte de blessure induite (Wang et al., 2021). Des expérimentations complémentaires pourraient donc être menées au niveau musculaire afin d'évaluer les capacités régénératrices musculaires en réponse à une blessure, mais nécessiteraient de générer une nouvelle cohorte.

De plus, nous disposons aujourd'hui au laboratoire d'un échantillonnage de nombreux tissus à différents âges après induction, à la fois inclus en paraffine et cryopréservés, nous permettant d'explorer avec divers marqueurs, qu'ils soient histologiques, génomiques ou protéiques, les populations souches résidentes dans de nombreux organes. Ces données nous permettraient dans un premier temps de quantifier ces populations souches afin de déterminer si une reprogrammation transitoire précoce impacte le nombre de cellules souches résidentes dans les tissus. Cependant, il faudrait prévoir de nouveaux lots expérimentaux afin de déterminer l'impact sur le potentiel et la fonctionnalité de ces cellules souches. Par exemple, nous avons envisagé de collecter les kératinocytes de l'épiderme dorsal et de les quantifier par FACS à l'aide d'un marquage p53 caractéristique des cellules souches épidermiques (Abbas et al., 2011). De plus, *in vitro*, nous aurions pu tester le potentiel de clonogénicité de ces kératinocytes, c'est-à-dire évaluer la capacité des cellules uniques à former des colonies en un temps donné. L'étude de la distribution en taille et en nombre des colonies est indicatrice des capacités prolifératives et d'autorenouvellement des cellules souches cutanées. Malheureusement, il ne nous a pas été techniquement possible de réaliser ces expériences en parallèle de nos sessions de prélèvements, dont le programme était dense et requérait déjà un nombre conséquent de manipulateurs.

Enfin, toujours dans l'idée d'évaluer l'impact d'une reprogrammation transitoire précoce sur les cellules souches, nous avons pu mettre en place une collaboration avec l'équipe du Pr Françoise Porteu de l'institut parisien Gustave Roussy, dont les travaux explorent le vieillissement du tissu hématopoïétique. Ainsi, des membres de l'équipe, la doctorante Anne Stolz et le post-doctorant François Hermetet, sont venus participer aux euthanasies des groupes expérimentaux à 2,5 et 6 mois et ont pu réaliser des prélèvements de moelle osseuse d'individus progériques traités et non traités, ainsi que d'individus sauvages non progériques. À partir de ces prélèvements, ils ont isolé les progéniteurs myéloïdes Lin⁻ dont ils ont prévu le séquençage des ARN, et l'analyse du contenu des différents compartiments. De plus, ils ont pu initier des expériences de transplantation et de reconstitution des cellules sanguines. Une première analyse aura lieu à 6 semaines post transplantation et le protocole restera en cours pour une analyse plus tardive à 4-5 mois. L'ensemble de ces résultats constituera une étude préliminaire et sera à confirmer, notamment en augmentant le nombre d'individus par groupe afin de confirmer un potentiel effet bénéfique de la reprogrammation transitoire sur le tissu hématopoïétique.

4.5 REPROGRAMMATION TRANSITOIRE PRECOCE ET SENESCENCE

Une autre des hypothèses envisagées pour expliquer les effets à long terme d'une reprogrammation transitoire précoce repose sur l'apprentissage de la sénescence. Elle suppose que l'induction des facteurs de reprogrammation constituerait un stress générant un pic de sénescence. Celui-ci serait alors reconnu par le système immunitaire, hautement compétent aux âges précoces, qui « apprendrait » à reconnaître et éliminer les cellules sénescents et serait alors plus à même de gérer les pics de sénescence au cours du vieillissement. Ainsi à des âges tardifs, les niveaux de sénescence seraient globalement diminués entraînant ainsi un rajeunissement de l'organisme. Une étude récemment publiée a d'ailleurs utilisé un concept similaire, mettant en évidence qu'une vaccination à l'aide d'un sénolytique permettait de réduire le nombre de cellules sénescents et participait ainsi à l'amélioration du phénotype du vieillissement et même à l'amélioration de la longévité chez des souris progériques (Suda et al., 2021).

Nous avons exploré cette piste expérimentalement, notamment par la mesure des transcrits relatifs aux gènes associés à la sénescence tels que p16, p19Arf, p21, p53. Dans l'ensemble, quels que soient l'origine tissulaire, l'âge et le sexe, nous n'avons pas constaté de différentiel quant à ces paramètres. Dans notre modèle et selon notre protocole de reprogrammation transitoire précoce, nous n'avons pas observé de pic de sénescence à la suite de l'induction des facteurs de reprogrammation. De plus, Quentin Alle avait pu, lors de sa thèse, quantifier au niveau protéique ces marqueurs aux âges tardifs dans différents tissus et leurs variations s'étaient avérées quasi inexistantes. Enfin, l'analyse du profil inflammatoire circulant, contenant des cytokines décrites comme participant au phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP), n'a pas révélé de réelle augmentation de ces effecteurs suite à l'induction des facteurs, ni de prévention de l'augmentation de leurs niveaux protéiques aux âges tardifs. Bien entendu, des expériences complémentaires pourraient être menées afin de confirmer ou d'infirmer ces résultats, mais jusqu'alors la piste de la sénescence pour expliquer l'effet distal n'a pas été très concluante.

Il pourrait ainsi être intéressant d'explorer plus en détails la dynamique des modifications induites par l'expression des facteurs de reprogrammation pendant les seize jours que dure le protocole. En effet, dans notre étude, nous avons travaillé sur des prélèvements à la fin des seize jours d'induction à la doxycycline mais il se peut qu'il y ait des phénomènes transitoires, tels qu'un pic de sénescence, qui se mettent en place précocement lors des premiers jours d'induction des facteurs de reprogrammation et à côté desquels nous serions passés avec notre analyse à seize jours. Cependant, la mise en place d'une cinétique sur seize jours dans un modèle animal est compliquée techniquement. En effet, il est difficile d'envisager sacrifier des animaux tous les jours pendant seize jours et travailler sur la totalité des organes sans savoir précisément ce que l'on cherche à voir. Dans un premier temps, nous avons donc

mis en place une méthode non invasive ne nécessitant pas le sacrifice systématique des animaux. Ainsi, sur une de nos cohortes, nous avons réalisé des prélèvements sanguins réguliers, à raison d'un tous les quatre jours (J0 – J4 – J8 – J12 – J16), qui nous permettront déjà d'évaluer si d'un point vue systémique notre protocole de reprogrammation transitoire précoce présente une dynamique singulière pendant la période d'induction même.

4.6 CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES INEXPLOREES

Bien qu'au cours de nos différentes études, nous ayons exploré un vaste ensemble de caractéristiques phénotypiques et ce, dans différents organes au cours du vieillissement, certains aspects pourtant primordiaux n'ont pas été étudiés.

4.6.1 Reprogrammation et vieillissement du système nerveux central

En particulier, nous n'avons pas exploré un système pourtant impacté de façon critique par le vieillissement : le système nerveux central. Il s'avère que dans le modèle de vieillissement accéléré que nous utilisons, à savoir le modèle Progeria, aucune atteinte du système nerveux central et des fonctions cérébrales n'a été décrite avec l'avancée en âge. Ainsi lorsque nous avons prélevé nos animaux à âges tardifs, bien que ceux-ci présentent la morphologie d'un individu âgé, leurs fonctions cognitives sont préservées et donc équivalentes à celles d'un individu sauvage du même âge. Bien que le système nerveux des Progeria ne vieillisse pas de façon prématurée, cela n'empêche probablement pas que notre protocole de reprogrammation transitoire précoce puisse avoir un effet direct sur celui-ci, sous réserve que la doxycycline traverse la barrière hémato-encéphalique. Et même si l'induction ne pouvait avoir lieu directement dans les cellules cérébrales, il se peut que leurs fonctions soient impactées par un effet systémique lié à l'induction dans d'autres organes. Parmi les organes que nous avons prélevés, nous avons systématiquement récupéré les cerveaux de nos animaux. Cependant, compte tenu de la problématique décrite, nous n'avons pas priorisé cet organe dans nos études. Il serait d'ailleurs envisageable de lancer une telle étude dans un modèle reprogrammable différent, qui serait croisé avec un modèle de vieillissement ou un modèle pathologique affectant le système nerveux central comme il en existe de nombreux aujourd'hui assez bien caractérisés pour l'étude de la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson par exemple.

4.6.2 Reprogrammation et vieillissement du système reproductif

De plus, bien que n'ayant pas d'impact direct sur l'espérance de vie, un autre système biologique subit d'importantes modifications fonctionnelles au cours du temps et notamment chez la femelle : le système reproductif. En effet, la baisse de la fertilité avec l'avancée en âge constitue dans nos sociétés modernes actuelles un enjeu de santé publique, où l'âge moyen du premier accouchement recule progressivement chaque année. Lors de la gestion courante de nos colonies, nous avons pu constater une altération de la fertilité chez nos individus progériques en comparaison avec nos autres lignées. Les portées sont plus petites et nous devons renouveler nos géniteurs plus fréquemment. Ainsi, dans ce contexte, l'étude de l'impact d'une reprogrammation transitoire précoce sur la fertilité des individus progériques serait pertinente. Étant donné que l'induction des facteurs de reprogrammation selon notre protocole a lieu au début de la période de maturité sexuelle des individus, on pourrait envisager de suivre les cycles menstruels des femelles, de réaliser des spermogrammes chez les mâles, d'effectuer le prélèvement des organes génitaux à différents âges post reprogrammation, ou encore de suivre la productivité de divers accouplements, soit entre un individu reprogrammé mâle et une femelle non reprogrammée et inversement, soit entre deux individus reprogrammés, par rapport à des couples progériques contrôles.

4.7 UNE REPROGRAMMATION TRANSITOIRE UNIQUE MAIS TARDIVE

Une question qui est revenue très fréquemment lors des différentes communications relatives à ces travaux est : qu'en est-il si on applique ce même protocole de reprogrammation transitoire mais à des âges plus tardifs ? En effet, il est raisonnable de se questionner quant à la pertinence d'un protocole précoce si on se place dans le spectre d'une translation clinique chez l'Homme. Pourquoi prendre le risque d'intervenir aussi précocement si une intervention plus tardive s'avérerait également bénéfique, voire même plus efficace ?

Nous avons décidé de mener l'expérience et pour répondre à ces questions, nous avons mis en place un nouveau protocole d'induction toujours transitoire et unique, mais cette fois-ci tardive. Ainsi nous avons généré une nouvelle cohorte d'individus progériques reprogrammables, que nous avons amenés à l'âge de 6 mois. Cet âge correspond, dans nos conditions d'élevage et d'hébergement, au début de la période de déclin de l'état de santé des animaux progériques hétérozygotes, notamment caractérisée par l'initiation de leur perte de poids. Nous avons donc décidé d'appliquer notre protocole d'induction des facteurs de reprogrammation à cet âge sur un même schéma que notre protocole précoce, c'est-à-dire pour une période de seize jours de traitement à la doxycycline à 0,5 mg/mL dans l'eau de boisson

des animaux. Nous avons lancé dans un premier temps une étude de longévité, au cours de laquelle nous suivons l'évolution de la masse corporelle des animaux. Nous avons décidé de sacrifier quelques individus lorsqu'ils atteindront l'âge de 8 mois, comme pour nos protocoles précédents, afin de faire une première évaluation des effets tissulaires de ce protocole de reprogrammation transitoire tardive. Cette étude a été initiée à la fin de l'été 2021 et est donc actuellement toujours en cours.

Cependant, il se peut également que cette induction tardive se révèle inefficace voire néfaste. En effet, on peut supposer que de façon similaire à ce qui a été décrit pour les phénomènes hormétiques, l'induction d'un stress, tel que celui que peut représenter la surexpression des facteurs de reprogrammation, serait dommageable sur un organisme vieillissant dont les mécanismes de réponse aux stress sont déjà altérés par l'avancée en âge. De plus, comme cela a été décrit *in vitro*, la reprogrammation 4F est inefficace sur des cellules âgées impactées par la sénescence. On peut facilement imaginer que ce soit le cas *in vivo* également et bien que nous n'induisions pas une reprogrammation totale, le vieillissement de l'organisme pourrait interférer avec l'efficacité de la reprogrammation et contrecarrer ses bienfaits. Dans ce cas, il faudrait envisager une reprogrammation six facteurs, OSKMNL, *in vivo* mais cela présuppose l'obtention d'un nouveau modèle murin transgénique complexe dont nous ne disposons pas actuellement au laboratoire et très délicat à établir.

4.8 LES LIMITES DE NOTRE MODELE MURIN

Le modèle progérique reprogrammable que nous utilisons au laboratoire, et qui est finalement similaire à celui qu'Ocampo et al. avaient utilisé dans leurs travaux (Ocampo et al., 2016), est aujourd'hui relativement bien caractérisé. Nos résultats sont venus confirmer pour la première fois depuis leur étude, qu'une reprogrammation transitoire, quel que soit le protocole d'induction défini, a des effets bénéfiques sur la longévité des animaux et leur l'état de santé global et constitue donc une stratégie anti-âge pertinente. Ce qui fait défaut à l'ensemble de ces résultats, est la réelle compréhension des mécanismes tissulaires, cellulaires et moléculaires sous-jacents. Or, ce sont précisément ces mécanismes qui sont indispensables pour envisager une translation clinique chez l'Homme. En effet, il est difficilement envisageable d'induire l'expression de facteurs potentiellement tératogènes directement chez l'Homme, même si des études récentes s'efforcent de trouver des méthodes de distribution biologique plus sécurisées. La finalité de nos travaux est d'identifier des mécanismes mis en place par la reprogrammation transitoire, afin de les mimer à l'aide d'autres effecteurs pour reproduire leurs effets et les appliquer en clinique chez l'Homme. La principale difficulté que nous rencontrons avec

notre modèle, est qu'il induit une reprogrammation globale de l'ensemble des cellules de l'organisme. Dans ce contexte, il est difficile d'identifier la dynamique des effets observés, et ainsi de statuer sur la causalité du mécanisme mis en jeu. Prenons l'exemple du tissu adipeux blanc, dans nos conditions, nous avons observé une modification globale de la composition corporelle qui se met en place dès la fin de la période d'induction des facteurs de reprogrammation et se maintient tout au long de la vie de nos animaux. Mais nous ignorons si cette modification de la composition corporelle est suffisante pour induire, à elle seule, les effets anti-âges observés, si elle y participe partiellement ou si ce n'est qu'une conséquence d'un autre mécanisme mis en place. Il est d'ailleurs très probable que l'effet anti-âge global observé soit la résultante d'une combinaison de mécanismes différents mis en place dans les différents organes et dont les effets locaux participent à l'amélioration globale de l'équilibre de l'organisme, et soient combinés à de potentiels effets systémiques des tissus les uns sur les autres. De plus, comme nous avons pu commencer à l'observer avec notre étude des tissus adipeux et musculaire, il n'est pas impossible que ces mécanismes soient sexe-dépendants et que la dynamique temporelle varie d'un organe à l'autre. Dans ces conditions, il paraît compliqué de réussir à dénouer la mécanistique sous-jacente à moins de mettre en évidence un mécanisme global.

Certains laboratoires, dont le laboratoire d'Ocampo en Suisse, ont d'ailleurs fait le choix de travailler sur des modèles d'induction des facteurs de reprogrammation tissu-spécifique, comme mentionné sur la page web de son laboratoire (<https://www.ocampolab.com/>). C'est-à-dire qu'ils ont développés des modèles murins transgéniques permettant d'induire l'expression des facteurs de reprogrammation uniquement dans un tissu donné, ou à l'inverse dans l'ensemble de l'organisme à l'exception d'un tissu particulier. Ainsi, ces modèles leur permettent d'étudier les implications spécifiques d'un organe donné dans les processus de rajeunissement suite à une reprogrammation partielle.

5 CONCLUSION GENERALE

Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence les intérêts d'une reprogrammation transitoire précoce comme stratégie pour prévenir et/ou ralentir le vieillissement dans un modèle murin *in vivo*. Ainsi, nous avons montré que l'expression des facteurs de reprogrammation induite au début de l'âge adulte pendant seize jours permet non seulement une amélioration de la longévité sur les âges tardifs, mais surtout de leur état de santé global (Figure 52). En effet, nous avons pu observer une modification de la composition corporelle, initiée dès la période d'induction et maintenue tout au long de la vie des animaux avec une diminution de la proportion de masse grasse au profit de la masse maigre. Cette modification phénotypique se traduit même au niveau fonctionnel par une amélioration des capacités motrices. De plus, à des âges tardifs, les animaux présentent un état de santé globalement amélioré avec une intégrité tissulaire préservée, une réduction des lésions fibrotiques ainsi qu'une meilleure protection contre la progression de certaines pathologies ostéoarticulaires liées à l'âge. Ces effets bénéfiques que nous observons à long terme suite à une reprogrammation transitoire précoce, suggèrent la mise en place de mécanismes pérennes, qui perdurent bien au-delà de l'expression des facteurs OSKM. Nous avons émis l'hypothèse que cet effet mémoire pourrait reposer sur un mécanisme de nature épigénétique. Et nous avons, en effet, pu observer un fort différentiel des niveaux de méthylation dans différents organes aux âges tardifs.

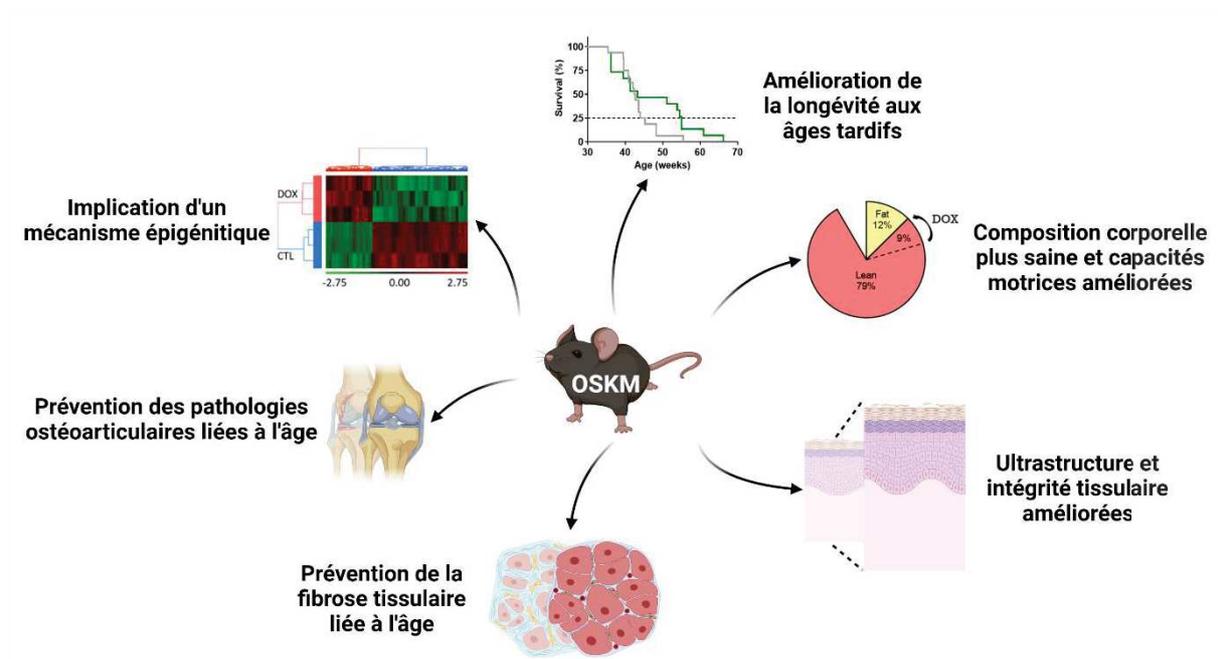


Figure 52 | Résumé graphique : impact d'une reprogrammation transitoire précoce sur le vieillissement

Pour l'instant l'analyse des niveaux de méthylation plus précoces est encore en cours, ce qui ne nous permet pas de conclure définitivement quant aux implications d'un mécanisme épigénétique sur le phénotype observé suite à une reprogrammation transitoire précoce.

Le métabolisme joue un rôle essentiel dans le processus de reprogrammation totale *in vitro*, qui s'accompagne d'une transition métabolique de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse. Nous avons donc exploré *in vivo* les aspects métaboliques d'une reprogrammation transitoire précoce à l'échelle de l'organisme, puis en nous concentrant principalement sur les tissus adipeux blanc et musculaire (Figure 53). Nous avons pu observer qu'une telle reprogrammation provoque des changements du comportement alimentaire des animaux ainsi que de leur métabolisme respiratoire global. On observe également un remodelage important du tissu adipeux blanc chez les femelles, qui s'accompagne d'une activation métabolique de l'activité mitochondriale et lipidique des adipocytes aux âges tardifs. Une activation métabolique équivalente du tissu musculaire s'observe plus précocement chez les individus femelles et semble être également présente chez les mâles aux âges tardifs. Néanmoins, il semble que cette transition métabolique n'impacte pas similairement l'ensemble des organes et soit spécifique des tissus adipeux et musculaire. Ces résultats confortent l'idée d'une réponse tissu spécifique à une reprogrammation transitoire précoce et complexifie l'identification des mécanismes sous-jacents à l'effet global sur l'état de santé des animaux, dont la compréhension reste pourtant indispensable pour envisager une translation clinique chez l'Homme.

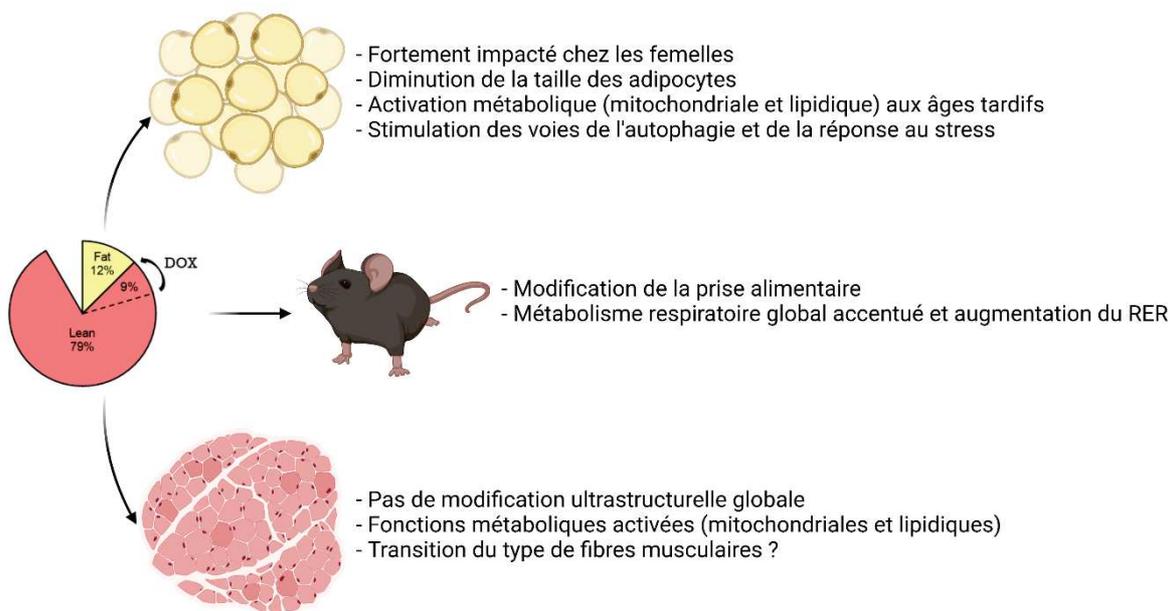


Figure 53 | Résumé graphique : reprogrammation transitoire précoce et métabolisme des tissus adipeux et musculaire

La reprogrammation transitoire comme outil dans la lutte contre le vieillissement semble néanmoins être au cœur de l'actualité scientifique, aussi bien dans les laboratoires académiques comme en témoigne le nombre grandissant de publications sur cette thématique, que dans le monde des biotechs. En effet, 2021 fut l'année de levées de fonds impressionnantes pour la création de start-up spécialisées dans le domaine dont Altos Labs, NewLimit, Turn Biotechnologies ou Retro Biosciences, qui viennent rejoindre celles déjà créées comme Calico, AgeX Therapeutics ou encore Shift Biosciences. La recherche sur les applications de la reprogrammation comme stratégie anti-âge a un bel avenir, ce qui promet certainement de nouvelles découvertes scientifiques dans les années à venir.

6 MATERIELS ET METHODES

6.1 MODELES ANIMAUX

6.1.1 Conception, élevage et génotypage des modèles animaux

Les animaux sont élevés et hébergés au sein du Plateau Central d'Élevage et d'Archivage (PCEA) du réseau des animaleries de Montpellier (RAM) sous un statut sanitaire SOPF (Specific and Opportunistic Pathogen Free). Les croisements en bigamie y sont également réalisés. Les animaux sont génotypés à partir de biopsies réalisées au niveau des phalanges lors du marquage des animaux. Les biopsies sont transmises à la société Transnetyx® pour génotypage automatisé par PCR selon la technique TaqMan. Les sondes utilisées sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau 3 | Séquences pour le génotypage des modèles animaux par PCR TaqMan

	Primers	Reporters
Progeria		
<i>Lmna3-mut</i>	(-F) AAGGCTGCCGGTGGAG (-R) GTGACACTGGAGGCAGAAGAG	(1) AGATGGATCCGCCCACC (2) AGATGGATCCACCCACC
4F		
<i>Col1a1-1 WT</i>	(-F) GCCATCCCAACAATACATCACATCT (-R) CCAGGATCCATGGGCAACA	(1) CCATGCTGCAGACCTG
<i>TRE-2 Tg</i>	(-F) GAAAGTCGAGCTCGGTACCC (-R) GCTTATATAGGCCTCCCACCGTA	(1) CACGCCTACCTCGACCC
rtTA		
<i>ROSA WT</i>	(-F) TTCCCTCGTGATCTGCAACTC (-R) CTTAAGCCTGCCCAGAAGACT	(1) CCGCCCATCTTCTAGAAAG
<i>rtTAM2</i>	(-F) ACAGTACGAAACCCTGGAAAATCAG (-R) GCGGACAGAGCGTACAGT	(1) TCAGCAAGGCTTCTCC

Dans le cadre de ce projet, les animaux sont ensuite regroupés au sevrage par lot de quatre à six animaux par cage, puis transférés à l'animalerie de l'INRAE sur le plateau d'analyse du métabolisme musculaire (METAMUS) lorsqu'ils sont âgés d'environ six semaines. Ils bénéficient alors d'une adaptation d'au minimum dix jours avant le début des expérimentations. A leur arrivée, les animaux subissent un second marquage par un système de fente aux oreilles afin de permettre une identification rapide et sans contention des animaux.

Les animaux sont élevés en cages collectives à couvercle filtrant, disposant de nourriture Safe A04 *ad libitum* et de biberons d'eau. Les cages disposent d'enrichissement de type ouate pour la confection des nids ainsi que de tubes suspendus. Le change des cages (litière, nid, eau et nourriture) est effectué une

fois par semaine. Quand cela est nécessaire suite à des bagarres et/ou des comportements dominateurs, certains mâles peuvent être isolés en cages individuelles.

6.1.1.1 La lignée PROGERIA, phénotype de vieillissement accéléré

La lignée murine dite Progeria récapitule le syndrome humain d'Hutchinson-Gilford, aussi appelé Progeria. Ce modèle transgénique a été développé par C. Lopez-Otin (Osorio et al., 2011b) qui nous l'a également transmis (MGI : 5295747). Les animaux sont porteurs d'une mutation ponctuelle G609G sur le gène LMNA, conduisant à la production d'une forme tronquée de la protéine Lamine A (Figure 14). Cette protéine joue un rôle dans l'architecture de la lamina nucléaire et sa forme tronquée empêche la constitution d'une enveloppe nucléaire normale. Au niveau phénotypique, les animaux présentent un vieillissement accéléré, avec une espérance de vie moyenne réduite à 3,5 mois à l'état homozygote mutant, 8 mois à l'état hétérozygote, contre environ 2 ans pour un individu sauvage. Ce vieillissement prématuré se traduit également par une perte de poids précoce chez les animaux, qui sont fréquemment sujets à d'importantes déformations osseuses de type lordose, ainsi qu'à des atteintes cardiovasculaires.

En élevage, cette lignée est maintenue à l'état hétérozygote à savoir $Lmna^{G609G/+}$ sur fond C57BL6.

6.1.1.2 La lignée 4F rtTA, inductible pour les facteurs de reprogrammation

La lignée murine dite 4F rtTA permettant de réaliser l'induction transitoire des facteurs de reprogrammation *in vivo* a été développée par R. Jaenish (Carey et al., 2010) et achetée au Jackson Laboratory (Stock N°011004). La cassette polycistronique d'expression des quatre facteurs de reprogrammation est insérée dans le locus Col1A1, sous contrôle de l'opéron tet du transactivateur rtTA (*reverse tetracycline-controlled transactivator*), lui-même inséré dans le locus Rosa26.

Le transactivateur rtTA est constitutivement exprimé mais il ne peut pas interagir avec l'opéron tet directement. La présence de la doxycycline, analogue de la tétracycline (tet), est nécessaire à l'interaction du transactivateur avec l'opéron tet, conduisant à l'activation de l'expression de la cassette OSKM. L'induction à la doxycycline est réalisable *in vivo* via l'eau de boisson des animaux ou *in vitro* via le milieu de culture, après extraction et mise en culture des cellules d'intérêt (Papadakis et al., 2004).

En élevage, cette lignée est maintenue à l'état double homozygote, à savoir $R26^{rtTA/rtTA} Col1A1^{4F2A/4F2A}$.

6.1.1.3 La lignée Progeria 4F rtTA

Des croisements entre les deux lignées précédemment décrites permettent d'obtenir les animaux constituant nos lots expérimentaux. 50% des animaux issus de ces croisements sont des animaux

progériques inductibles pour les quatre facteurs de reprogrammation, dits triples hétérozygotes, à savoir $Lmna^{G609G/+}$ $R26^{rtTA/+}$ $Col1A1^{4F2A/+}$. Les 50% restants sont non progériques inductibles, dits doubles hétérozygotes à savoir $(Lmna^{+/+})$ $R26^{rtTA/+}$ $Col1A1^{4F2A/+}$.

6.1.2 Induction de la reprogrammation transitoire *in vivo*

L'activation des facteurs de reprogrammation se fait par administration de doxycycline dans l'eau de boisson des animaux. Pour notre protocole, les animaux sont traités à la doxycycline à 0,5 mg/mL pendant seize jours à partir de leurs deux mois. Les biberons sont renouvelés deux fois par semaine. Nous utilisons des biberons opaques noirs afin de prévenir la dégradation de la doxycycline à la lumière.

Des aliquots de doxycycline à 6 mg/mL sont conservés à -20°C. Cette solution stock est préparée à partir de doxycycline hyclate (D9891, Sigma) dissoute dans de l'eau Volvic® pour éviter tout problème de précipitation, lié à la dureté de l'eau de ville. A chaque préparation de biberons, l'aliquot est décongelé au bain marie puis dilué avec de l'eau de ville, jusqu'à obtenir une solution à 0,5 mg/mL qui est ensuite répartie dans les différents biberons.

6.1.3 Etude du profil métabolique *in vivo*

6.1.3.1 Composition corporelle

Une mesure non invasive de la composition corporelle globale des animaux est réalisée par IRM à l'aide d'un EchoMRI-700 (EchoMRI™-700 Echo Medical Systems, Houston, TX, USA). Il s'agit d'un système RMN, qui permet de contraster les tissus mous par l'analyse du temps de relaxation des protons d'hydrogène. Avant mesure, l'appareil est calibré à l'aide d'une canule d'huile. Cette analyse donne une mesure globale de la composition corporelle, à savoir masses maigre, grasse et eau libre, mais ne donne pas d'indication sur la localisation et la répartition des différents composants.

Les animaux sont individuellement pesés puis placés dans un tube en polycarbonate dans lequel ils sont immobilisés par contention. Le tube est ensuite introduit dans l'EchoMRI™ pour la mesure, puis l'animal est remis dans sa cage avec ses congénères. La mesure est rapide, indolore et ne nécessite pas d'anesthésie du sujet.

6.1.3.2 *Mesure de la prise alimentaire*

Les animaux étant élevés en cages collectives, la mesure de la prise alimentaire a été estimée individuellement selon le nombre d'animaux présents par cage. Ainsi, la nourriture était pesée avant et après chaque ajout ou renouvellement de nourriture tous les trois à quatre jours. On calcule par cage le différentiel entre la quantité de nourriture initialement déposée et la quantité de nourriture après n jours. Cette valeur est ensuite divisée par le nombre de jours écoulés et le nombre d'individus présents dans la cage afin d'estimer la prise alimentaire individuelle quotidienne moyenne.

6.1.3.3 *Homéostasie du glucose*

6.1.3.3.1 Glycémie post-prandiale

La glycémie a été mesurée sur les animaux à l'état nourri en fin de période nocturne à heure fixe. La mesure se fait à l'aide d'un glucomètre à bandelette (*One touch*). Une entaille est réalisée à l'extrémité de la queue de l'animal, créant ainsi un léger saignement, suffisant pour la mesure (une goutte d'environ 5 microlitres). Une hémostase est immédiatement réalisée après mesure par pression avec une compresse et l'animal est remis dans sa cage. Le change des cages est réalisé le lendemain afin d'éliminer toute présence de sang dans les cages.

6.1.3.3.2 Test de résistance à l'insuline

Les animaux sont mis à jeun en fin de période nocturne durant 6h. Une solution d'insuline est injectée par voie intrapéritonéale à hauteur de 0,75 UI/kg de poids corporel. Des mesures de glycémie sont ensuite réalisées comme décrit précédemment à T0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 et 180 minutes après injection. L'état de l'animal est surveillé tout au long de l'expérience. Si sa glycémie chute en dessous de 50 mg/dL et que l'animal n'est plus réactif, une solution de glucose à 20% est injectée en IP d'urgence à hauteur de 2 g/kg de poids corporel afin de faire remonter la glycémie de l'animal. A la fin de l'expérience, de la nourriture est remise dans l'ensemble des cages. Un change des cages est réalisé le lendemain afin d'éliminer toute présence de sang dans les cages.

6.1.3.3.3 Test de tolérance au glucose

Les animaux sont mis à jeun la veille au soir pour une durée de 12 h. Le jour J, une solution de glucose à 20% est administrée par voie orale grâce à une sonde de gavage, à hauteur de 2 g/kg de poids corporel. Des mesures de glycémie sont réalisées comme décrit précédemment à T0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 et 180 minutes après gavage. A la fin de l'expérience, de la nourriture est remise dans l'ensemble des cages. Le change des cages est réalisé le lendemain afin d'éliminer toute présence de sang dans les cages.

6.1.3.4 Tests fonctionnels

Avant le début des expérimentations, les animaux ont été habitués à l'utilisation de l'ensemble des appareils avec au moins une séance d'entraînement.

6.1.3.4.1 Griptest et force d'agrippement



Figure 54 | Griptest vertical

Ce test permet la mesure de la force maximale des pattes antérieures. L'appareil (Bio-GS3, BioSeb) est positionné verticalement avec un dispositif d'agrippement sous forme de barre. Cette disposition est différente du test conventionnel réalisé horizontalement, cependant elle permet de se placer dans des conditions où les effets de la gravité sont minimisés, permettant ainsi de réduire la variabilité du test (Takeshita et al., 2017).

L'animal est tenu par la queue et positionné au-dessus du dispositif afin que celui-ci s'y agrippe de ses deux pattes avant. Dès lors que l'animal est correctement agrippé, toujours maintenu par la base de la queue, il est progressivement tiré vers le haut, toujours à la verticale. Le dispositif mesure la force de préhension maximale appliquée sur la barre juste avant que l'animal ne la lâche. Chaque individu répète le test 3 fois, avec une minute de repos entre chaque répétition.

6.1.3.4.2 Rotarod et coordination

Pour mesurer leur coordination motrice, les animaux ont été soumis à un test sur un dispositif rotarod, équipé de capteurs de chute et de chronomètres automatisés (47650 Rota-Rod, Ugo Basile). Le dispositif est programmé en mode rampe, c'est-à-dire avec une accélération progressive de la vitesse de rotation du cylindre allant de 5 rpm à 40 rpm en 300 secondes. Les animaux sont placés un par un sur le tube cannelé (3 cm de diamètre) du dispositif, dans la direction opposée au sens de rotation, c'est-à-dire de façon à ce qu'ils soient dans le sens de marche. La rotation du cylindre est ensuite activée et le chronomètre se déclenche automatiquement lorsque la vitesse initiale est atteinte. Lorsque l'animal n'arrive plus à marcher suffisamment rapidement pour se maintenir en équilibre sur le cylindre, il se laisse glisser et atterri doucement dans un réceptacle en inox. Le poids de l'animal lorsqu'il tombe dans le réceptacle enclenche l'arrêt de son chronomètre. Le dispositif continue de fonctionner (rotation et minuterie) tant que tous les animaux ne sont pas tombés dans leurs réceptacles respectifs.

Les animaux sont soumis à trois séquences test successives, chacune durant au maximum 10 minutes (5 min de mode rampe puis 5 min à vitesse constante maximale). Elles sont entrecoupées de pauses d'au

minimum vingt minutes pendant lesquelles les animaux sont remis au repos dans leurs cages respectives avec leurs congénères.

6.1.3.5 Analyse du métabolisme respiratoire : cages métaboliques

Le métabolisme respiratoire des animaux (consommation de dioxygène, production de dioxyde de carbone) est mesuré à l'aide de cages métaboliques (CLAMS, Columbus Instruments).

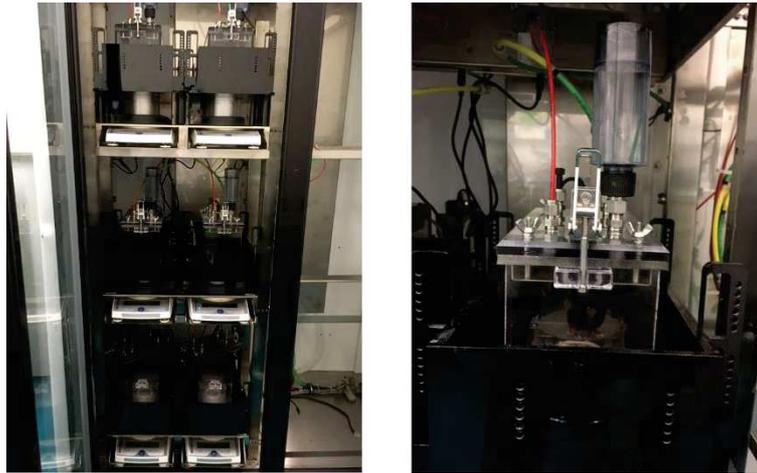


Figure 55 | Illustration des cages à métabolisme (CLAMS, Columbus Instruments)

La veille de la mesure, les animaux sont placés dans le dispositif en cages individuelles sans litière pour une période d'acclimatation de 24 h, avec nourriture et eau à volonté. La nourriture est placée directement dans le fond de la cage. L'enceinte hermétique est réglée à une température de 22 °C avec un cycle jour/nuit de 12 h. La mesure des échanges gazeux sera réalisée dans les 24 h suivantes puis les animaux seront remis en cages collectives avec leurs congénères. Les animaux sont isolés pour une durée totale de 48 h mais gardent le contact visuel deux à deux dans le dispositif. Les animaux sont quotidiennement observés pendant le protocole avec notamment une pesée quotidienne. La prise alimentaire pendant les 24 h de mesures est également suivie, avec une pesée avant/après pour mesurer la quantité de nourriture ingérée par chaque individu.

6.1.3.6 Suivi de la température corporelle interne

En parallèle des autres expérimentations, la température corporelle interne des animaux a été mesurée toutes les quinze semaines. La prise de mesure est réalisée à l'aide d'une sonde rectale préalablement désinfectée à l'alcool et enduite de vaseline stérile.

6.1.4 Etude du profil métabolique sur tissus

6.1.4.1 Euthanasies et prélèvements

Lorsqu'ils atteignent l'âge de neuf mois, les animaux sont sacrifiés et leurs tissus prélevés. Après pesée et photographie de leur état général, les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane. Le sang total est ensuite ponctionné au niveau du sinus mandibulaire dans des tubes préalablement héparinés. A la fin de prélèvement sanguin, une dislocation cervicale est effectuée.

Les animaux sont ensuite disséqués afin de récupérer les organes suivants : tissus adipeux blanc (WAT) et brun (BAT), pancréas, foie, muscles (quadriceps, gastrocnemius et tibialis), reins, rate, cerveau et cœur. Chaque prélèvement est individuellement pesé et photographié. Des prélèvements de tissus adipeux blanc, brun, foie et cœur sont directement placés dans des cassettes d'histologie et immergés dans une solution de paraformaldéhyde à 4% pour fixation. Les tibialis sont quant à eux cryoconservés dans du gel OCT et l'ensemble est refroidi dans un bain d'isopentane posé sur de la carboglace afin de permettre la solidification du gel. Pour l'ensemble des tissus prélevés, des morceaux sont également congelés immédiatement par immersion dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

En parallèle de la dissection, les échantillons de sang sont centrifugés à 1000 xg pendant 10 min et le surnageant est récupéré. Le plasma ainsi isolé est ensuite conservé à -20°C jusqu'à analyse.

6.1.4.2 Histologie

6.1.4.2.1 Histologie en paraffine

Les prélèvements sont fixés dès dissection par immersion dans une solution de PFA 4% pendant quatre heures pour les tissus mous (BAT, WAT, pancréas) et jusqu'à 24 h pour le cœur. Les échantillons dans leur cassette sont ensuite rincés trois fois au PBS 1X puis conservés dans de l'éthanol à 70% à 4°C.

Les cassettes sont transmises rapidement au Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier (RHEM) pour que soient réalisés inclusions, blocs, coupes et colorations. A réception, les échantillons sont inclus en bloc de paraffine puis coupés au microtome dans le plan le plus large de l'échantillon. Les coupes de 3 µm d'épaisseur sont disposées en série sur des lames puis diverses colorations sont effectuées.

Dans le cadre de ce projet, des colorations Hématoxyline, Eosine, Safran (HES) ont été réalisées sur les coupes de BAT, WAT et pancréas. Un marquage immunohistochimique du glucagon a également été réalisé sur les coupes de pancréas afin de mettre en évidence les îlots de Langerhans.

Les lames sont ensuite scannées sur la plateforme Montpellier Ressource Imagerie (MRI) de l'institut des Neurosciences de Montpellier (INM, CHU Saint-Eloi) sur le scanneur de lame Nanozoomer (Hamamatsu). Les lames numériques sont ensuite mises à notre disposition.

6.1.4.2.2 Histologie en cryotomie

Les échantillons cryoconservés en blocs de gel OCT sont stockés à -80°C. Les blocs sont ensuite détaillés à l'aide d'un cryostat (Leica, Biosystem). Dans un premier temps, les blocs sont dégrossis par des coupes de 40 µm d'épaisseur jusqu'à atteindre une extrémité du prélèvement. Dans le cas du tibialis, le bloc est encore détaillé sur environ 1 mm (25 coupes à 40 µm) afin d'atteindre un plan de coupe suffisant large, avec un nombre de fibres musculaires suffisant pour la quantification. Enfin, des coupes de 10 µm d'épaisseur sont réalisées en série et récupérées sur lames Superfrost Plus préalablement annotées. A la fin des coupes, le plan de section du bloc est recouvert d'un peu de gel OCT afin de protéger l'échantillon et le bloc est remis au congélateur à -80°C. Les lames sont laissées à l'air libre quelques heures pour séchage puis conservées à -20°C avant marquage.

❖ *Colorations classiques*

Les lames préalablement préparées et conservées à -20 °C, sont séchées à température ambiante environ 15 à 20 min. Elles ont ensuite subi deux colorations dites classiques, une première coloration Hématoxyline Eosine (protocole détaillé en Tableau 4) et une seconde Rouge Sirius (protocole détaillé en Tableau 5).

Tableau 4 | Protocole coloration Hématoxyline Eosine

Etapas		Temps
#1	Bain d'hématoxyline de Mayer's	5 min
#2	Rinçage à l'eau courante	5 min
#3	Bain d'éosine alcoolique à 1%	1 min
#4	Rinçage à l'eau	-
#5	Bain d'alcool 80%	2 min
#6	Bain d'alcool 90%	5 min
#7	Bain d'alcool 100%	2 x 2 min
#8	Bain de xylène	2 x 2 min
#9	Montage avec résine Pertex Microm	-
#10	Séchage	1 nuit

Tableau 5 | Protocole coloration Rouge Sirius

Etapas		Temps
#1	Bain de PFA 4%	10 min
#2	Rinçage à l'eau distillée	-
#3	Bain de Rouge Sirius 0.1%	1 h
#4	Rinçage à l'eau acide	2 x
#5	Egoutter et laisser sécher les lames	-
#6	Bain d'éthanol 100%	2 x 2 min
#7	Bain de xylène	2 x 2 min
#8	Montage avec résine Pertex Microm	-
#9	Séchage	1 nuit

Une fois montées et séchées, les lames peuvent être observées au microscope optique et/ou scannées au Nanozoomer (Plateforme MRI, INM). Les lames peuvent ensuite être stockées à température ambiante.

❖ *Immunomarquages en fluorescence*

Afin de pouvoir procéder à l'analyse des fibres musculaires ainsi que des cellules satellites (cellules souches musculaires), les coupes ont été co-marquées pour la laminine et pax7 selon le protocole détaillé en Tableau 6.

Anticorps primaires : anticorps polyclonaux de lapin anti-laminine (Sigma-Aldrich #L9393), anticorps monoclonaux de souris anti-PAX7 (Santa Cruz #sc-81648).

Anticorps secondaires : anticorps polyclonaux de chèvre anti Ig-G de lapin Alexa Fluor 488, anticorps polyclonaux de chèvre anti Ig-G de souris Alexa Fluor 568.

Tableau 6 | Protocole immunomarquage Laminine-Pax7-Hoechst

Etapes		Solution	Temps
#1	Perméabilisation	Triton 1%, Sérum de cheval 10%	1 h à 37°C
#2	Marquage primaire Laminine	Laminine 1/200 PBS BSA 1%	1 h à 37°C
#3	Rinçage	PBS 1X	3 x 5 min sous agitation
#4	Marquage secondaire	Anti-lapin vert 1/1000	1 h à 37°C
#5	Rinçage	PBS 1X	3 x 5 min sous agitation
#6	Marquage primaire Pax7	Pax7 1/50 PBS BSA 1%	1 nuit à 4°C
#7	Rinçage	PBS 1X	3 x 5 min sous agitation
#8	Marquage secondaire	Anti-souris rouge 1/1000	1 h à 37°C
#9	Rinçage	PBS 1X	3 x 5 min sous agitation
#10	Marquage Hoechst	Hoechst 1/1000 dans PBS 1X	30 sec
#11	Montage	Milieu montage aqueux PermaFluor™	-

Une fois les lamelles immobilisées par le milieu de montage, elles sont rapidement numérisées sur la plateforme Montpellier Ressource Imagerie (MRI) de l'institut des Neurosciences de Montpellier (INM, CHU Saint-Eloi) sur le scanneur de lame AxioScan (Zeiss).

6.1.4.2.3 Analyses d'images

Après récupération des versions numériques, les lames peuvent être visualisées sur les logiciels NDP.view ou ZEN pour les marquages respectivement en lumière blanche ou en fluorescence. Après identification de la ou des zones à analyser, des fichiers images TIFF peuvent être extraits à partir de ces deux logiciels puis analysés à l'aide du logiciel ImageJ.

Pour l'analyse du tissu adipeux blanc en HES, la taille des adipocytes a été mesurée de façon automatisée à l'aide de l'extension Adiposoft (Galarraga et al., 2012).

Pour l'analyse du tissu adipeux brun en HES, la quantification relative du contenu lipidique a été obtenue par analyse binaire des images en mesurant la surface occupée par les pixels blancs et les pixels noirs.

Pour l'analyse du pancréas, les îlots de Langerhans ont été comptés et mesurés individuellement et manuellement sur ImageJ. Leurs nombre et surface ont ensuite été rapportés à la surface de la coupe.

Pour la quantification de la fibrose à partir des coupes de muscles colorées en Rouge Sirius, l'analyse est réalisée de façon automatisée à l'aide de l'extension MRI Fibrosis Tool. Brièvement, après déconvolution des couleurs, un seuil automatique permet de déterminer et sélectionner la ou les zone(s)

fibrotiques et d'en mesurer l'aire. Cette aire est ensuite comparée à l'aire globale de la section afin de déterminer l'aire fibrotique relative.

Pour l'analyse des fibres musculaires, la quantification de leur nombre et de leur taille s'est faite de façon semi-automatisée à l'aide d'un programme développé en interne par l'équipe DMeM de l'INRAE.

6.1.4.3 Extractions tissulaires

Au prélèvement, les différents organes prélevés sont congelés par immersion dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C.

Nous avons utilisé deux types de protocoles pour l'extraction simultanée des ARNs, ADN, et protéines sur un même échantillon. Le premier consiste en un broyage mécanique des tissus encore congelés dans du TRIzol™ suivi d'une tri-extraction en série des ARNs, ADN et protéines selon les recommandations du fournisseur. Nous avons également testé un kit commercial (All-In-One DNA/RNA/Protein Miniprep Kit, BioBasic), auquel cas les échantillons ont été broyés mécaniquement dans le tampon de lyse fourni avec le kit. Pour ce broyage mécanique, nous avons utilisé un appareil FastPrep en procédant à des cycles de broyage de 40 secondes à 6,5 m/s répétés 2 à 4 fois selon la résistance du tissu, avec un intervalle de 5min entre chaque cycle pour éviter la surchauffe de l'échantillon.

Une fois extraits, les ARN, ADN et protéines ont été dosés respectivement par Nanodrop pour les acides nucléiques et par méthode colorimétrique BCA pour les protéines, puis conservés à -80°C pour les ARN ou -20°C pour les ADN et protéines dans les tampons adaptés.

6.1.4.4 Analyses transcriptomiques

6.1.4.4.1 RT-qPCR

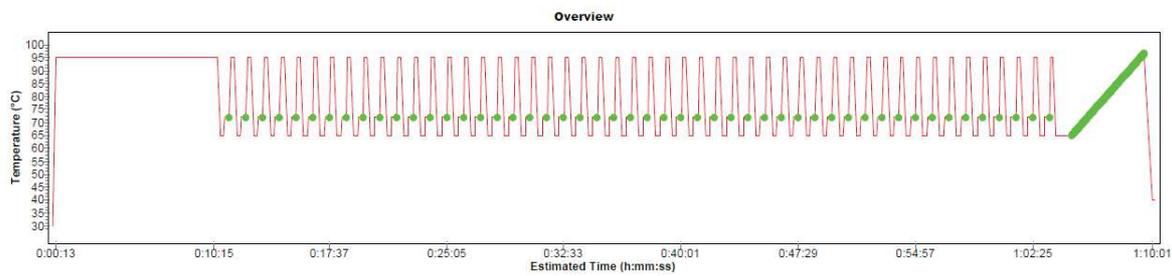
Après extraction, dosage et contrôle de la qualité des ARN, une étape de rétrotranscription en ADNc est réalisée à l'aide du kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1672, Thermo Scientific) avec traitement préalable à la DNase afin d'éliminer les éventuels contaminants d'ADN génomique.

Les ADNc obtenus, temporairement stockés à -80°C, servent ensuite de matrice pour la qPCR. Les réactions de PCR sont réalisées en plaques 384 puits avec 5 ng de RT pour un volume réactionnel de 10 µL par puits. Le master mix du kit PowerUp™ SYBR™ Green (#A25741, Applied Biosystems) est mélangé aux couples de primers sens et antisens à 200 nM final. La distribution du mix réactionnel et des ADNc se fait à l'aide d'un automate de pipetage (epMotion® 507, Eppendorf) à raison de 2 µL d'ADNc pour 8 µL de mix par puits. Après distribution, la plaque est scellée à l'aide d'un film adhésif et centrifugée brièvement. La réaction de PCR est réalisée aussitôt dans un LightCycler 480 (Roche)

selon le programme suivant (Tableau 7) et les valeurs de Ct (cycle de seuil) sont extraites et analysées selon la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tableau 7 | Programme d'amplification de nos qPCR

	Etape	Température	Durée	Vitesse d'augmentation
Pré-incubation	1	95 °C	10 min	4,8 °C/s
Amplification (50 cycles)	2.1	95 °C	10 s	4,8 °C/s
	2.2	65°C	15 s	2,5 °C/s
	2.3	72 °C	15 s	4,8 °C/s
Courbe de fusion	3.1	95 °C	5 s	4,8 °C/s
	3.2	65 °C	1 min	2,5 °C/s
	3.3	97 °C	-	0,11 °C/s
Refroidissement	4.	40°C	10 s	2 °C/s



6.1.4.4.2 Dynamic Array IFC – Biomark™

Les analyses ont été réalisées successivement par deux plateformes : la plateforme Genotoul Génome & Transcriptome (GeT) (<https://get.genotoul.fr/>) puis la plateforme Genotypage et Séquençage en Auvergne (Gentyane) (<https://gentyane.clermont.inrae.fr/>).

Les ADNc rétrotranscrits ainsi que les couples d'amorces pour l'amplification ont été transmis aux plateformes qui se sont chargées de la lecture de la puce IFCs Dynamic Arrays dans le Biomark™ HD Reader après une étape de préamplification des échantillons. Cette technique en microfluidique commercialisée par la société Fluidigm® permet l'analyse en PCR compétitive de 95 échantillons sur 96 marqueurs en un seul passage. Les résultats bruts nous ont ensuite été transmis pour analyse par nos soins.

Tableau 8 | Liste des séquences des primers pour la qPCR

Gène	Primer Forward	Primer Reverse
18S	GTAACCCGTTGAACCCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
ACC1	GTTCTGTTGGACAACGCCTTCAC	GGAGTCACAGAAGCAGCCCATT
ACC2	AGAAGCGAGCACTGCAAGGTTG	GGAAGATGGACTCCACCTGGTT
ACOX1	GCCATTCGATACAGTGCTGTGAG	CCGAGAAAGTGGAAAGGCATAGG
Adiponectine	TGTTCTCTTAATCCTGCCCA	CCAACCTGCACAAGTTCCTT
AKT1	ATGAACGACGTAGCCATTGTG	GCTACAGAGAAATTGTTGAGGGG
AKT2	ACGTGGTGAATACATCAAGACC	CGCTTTTGAGGGTTGATTCTT
APC	CTTGTGGCCAGTTAAAATCTGA	CGCTTTTGAGGGTTGATTCTT
ATF6	GTCCAAAGCGAAGAGCTGTCTG	AGAGATGCCTCCTCTGATTGGC
ATG3	ACACGGTGAAGGGAAAGGC	TGGTGGACTAAGTGATCTCCAG
ATG5	TGTGCTTCGAGATGTGTGGTT	GTCAAATAGCTGACTCTTGCCAA
ATG6	ATGGAGGGGTCTAAGGCGTC	TCCTCTCTGAGTTAGCCTCT
ATG7	GTTCCGCCCTTTAATAGTGC	TGAACTCCAACGTCAAGCGG
ATG8	GACCGCTGTAAGGAGGTGC	CTTGACCAACTCGCTCATGTTA
ATP Synthase	GCCCGGGTAGCTCTGACTGGTTTG	GTCGGTGGCTAGGGTGGGCTGGTA
BAX	AGGATGCGTCCACCAAGAAGCT	TCCGTGTCCACGTGAGCAATCA
BCL2	CCTGTGGATGACTGAGTACCTG	AGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG
BCL-XL	GCCACCTATCTGAATGACCACC	AGGAACCAGCGGTTGAAGCGC
CCND1	GCGTACCCTGACACCAATCTC	CTCCTCTTCGCACTTCTGCTC
CD11c	TGCCAGGATGACCTTAGTGTCG	CAGAGTGACTGTGGTTCCGTAG
CD19	GGAGGCAATGTTGTGCTGC	ACAATCACTAGCAAGATGCC
CD34	AAGGCTGGGTGAAGACCCTTA	TGAATGGCCGTTTCTGGAAGT
CD36	GGACATTGAGATTCTTTCTCTG	GCAAAGGCATTGGCTGGAAGAAC
CDK4	ATGGCTGCCACTCGATATGAA	TCCTCCATTAGGAACCTCACAC
CHOP	GGAGGTCCTGTCCTCAGATGAA	GTCCTCTGTGAGCCAAGCTAG
c-MYC	ACCACCAGCAGCGACTCTGA	TGCCTCTTCCACAGACACC
COL1A1	CCTCAGGGTATTGCTGGACAAC	CAGAAGGACCTTGTGGCCAGG
COL3A1	GACCAAAAGGTGATGCTGGACAG	CAAGACCTCGTGCTCCAGTTAG
COX2	GCGACATACTCAAGCAGGAGCA	AGTGGTAACCGCTCAGGTGTTG
CPT2	GGCCAGGGCTTTGACCGACT	TGCCAAAGCCATCAGGGACCAC
CytC ox	ACCACAGCACTGGTTTTGGA	TAATGGTCGCCATCTGAGGA
DGAT1	GGTCCGTGTTTGTCTGGCAT	CCACTGACCTTCTCCCTGTAG
E2F1	CTCGACTCCTCGCAGATCG	GATCCAGCCTCCGTTTCACC
EP300	TTCAGCCAAGCGGCCTAAA	CGCCACCATTGGTTAGTCCC
F4/80	CGTGTTGTTGGTGGCACTGTGA	CCACATCAGTGTTCCAGGAGAC
FASN	CACAGTGCTCAAAGGACATGCC	CACCAGGTGTAGTGCTTCTCTC
FOXO1	CTACGAGTGGATGGTGAAGAGC	CCAGTTCCTTATTCTGCACTCG
FOXO3	CTGGGGGAACCTGTCTATG	TCATTCTGAACGCGCATGAAG
G0S2	GCTAGTGAAGCTATACGTGCTGG	GGACTGCTGTTACACGCTTCC
G6PC	AGGTCGTGGCTGGAGTCTTGTC	GTAGCAGGTAGAATCCAAGCGC
GAPDH	GGCAAATTCAACGGCACAGT	GTCTCGCTCCTGGAAGATGG
GDF11	CTGCGCCTAGAGAGCATCAAG	TCTCGGTGGTAGCGTGGTA

Gène	Primer Forward	Primer Reverse
GPX2	GTGTGATGTCAATGGGCAGAA	ACGTTTGATGTCAGGCTCGAT
HDAC6	TCCACCGGCCAAGATTCTTC	CAGCACACTTCTTTCCACCAC
HIF1	ACCTTCATCGAAACTCCAAAG	CTGTTAGGCTGGGAAAAGTTAGG
HMGA1	GGTCGGGAGTCAGAAAGAGC	ATTCTTGCTTCCCTTTGGTCG
HMGA2	GAGCCCTCTCCTAAGAGACCC	TTGGCCGTTTTTCTCCAATGG
HMGCR	GCTCGTCTACAGAAACTCCACG	GCTTCAGCAGTGCTTTCTCCGT
IFNγ	CAGCAACAGCAAGGCCAAAAAGG	TTTCCGCTTCTGAGGCTGGAT
IGF1	CTGGACCAGAGACCTTTTGC	GGACGGGGACTTCTGAGTCTT
IL1RA	TGTGCCTGTCTTGTGCCAAGTC	GCCTTTCTCAGAGCGGATGAAG
IL6	TGATGCACTTGCAGAAAACA	ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC
IL6RA	CCTGAGACTCAAGCAGAAATGG	AGAAGGAAGGTCGGCTTCAGT
INSR	ATGGGCTTCGGGAGAGGAT	GGATGTCCATACCAGGGCAC
KLF4	GCACACCTGCGAACTCACAC	CCGTCCCAGTCACAGTGGTAA
Leptine	GAGACCCCTGTCTCGGTTT	CTGCGTGTGTGAAATGTCATTG
mCAD	GATCGCAATGGGTGCTTTTGATAGAA	AGCTGATTGGCAATGTCTCCAGCAA
MYH11	AAGCTGCGGCTAGAGGTCA	CCCTCCCTTTGATGGCTGAG
NADPH Dhase	TTCCTCTGGATTACCCCTCA	CATGAGGAGCGGAGTATTT
NANOG	CAGGTGTTTGAGGGTAGCT	CGGTTTCATCATGGTACAGTC
NRF1	CCCCGAGGACACTTCTTATGATG	GGCCGTTTCCGTTTCTTCCCTGTT
NRF2	CCGCTACACCGACTACGATT	ACCTTCATACCAACCCAAG
Oct4a	GGCTTCAGACTTCGCCTTCT	TGGAAGCTTAGCCAGGTTCCG
p16	AACTCTTTCGGTTCGTACCCC	GCGTGCTTGAGCTGAAGCTA
p19Arf	CGTGAACATGTTGTTGAGGC	GCAGAAGAGCTGCTACGTGA
p21	CGGTGTCAGAGTCTAGGGGA	ATCACCAGGATTGGACATGG
p53	GTCACAGCATGACGGAGG	TCTTCCAGATGCTCGGGATAC
p63	TACTGCCCCGACCCTTACAT	GCTGAGGAACTCGCTTGTCTG
PARP1	GGCAGCCTGATGTTGAGGT	GCGTACTCCGCTAAAAAGTCAC
PAX7	TCTCCAAGATTCTGTGCCGAT	CGGGGTTCTCTCTTATACTCC
PERK	CCGATGTCAGTGACAACAGCTG	AAGACAACGCCAAAGCCACCAC
PGC1α	CCGATCACCATATTCCAGGTC	GTGTGCGGTGTCTGTAGTGG
PGK1	ATGTCGCTTTCCAACAAGCTG	GCTCCATTGTCCAAGCAGAAT
PI3K	GTTGTCTGTCAATCGGTGACTGT	GAAGTGCAGTGACCTTTCAAGC
PKLR	CGAAAAGCCAGTGATGTGGTGG	GATGCCATCGCTCACTTCTAGG
SDHA	GAAAGGCGGGCAGGCTCATC	CACCACGGCACTCCCCATTTT
SERPINE1	TTCAGCCCTTGCTTGCCCTC	ACACTTTTACTCCGAAGTCGGT
SIRT1	GCTGACGACTTCGACGACG	TCGGTCAACAGGAGGTTGTCT
SIRT6	ATGTCGGTGAATTATGCAGCA	GCTGGAGGACTGCCACATTA
SOD1	GGTGAACCAGTTGTGTTGTCAGG	ATGAGGTCTGCACTGGTACAG
SOD2	ATCTGTAAGCGACCTTGCTC	GCCTGCACTGAAGTTCAATG
Sox2	GCGGAGTGAAACTTTTTGTCC	CGGGAAGCGTGTACTTATCCTT
sXBP1	CTGAGTCCGAATCAGGTGCAG	GTCCATGGGAAGATGTTCTGG
Tfam	GCTCTACACGCCCTGGTTTCTGG	TCGCTGTAGTGCTGCTGCTCCTG
TGFB1	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	GCCTTAGTTTGACAGGATCTG
TGFB2R	CCGCTGCATATCGTCTGTG	AGTGGATGGATGGTCTATTACA
Timp3	CTTCTGCAACTCCGACATCGT	GGGGCATCTTACTGAAGCCTC

Gène	Primer Forward	Primer Reverse
TNFα	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
TOMM20	GCCCTCTTCATCGGGTACTG	ACCAAGCTGTATCTCTTCAAGGA
UCP1	CACCTTCCCGCTGGACTGTC	TTGCCAGGGTGGTGATGGTCC
Wisp1	CAGCACCCTAGAGGAAACGA	CTGGGCACATATCTTACAGCATT
WNT11	GCTGGCACTGTCCAAGACTC	CTCCCGTGTACCTCTCTCCA
WNT16	CAGGGCAACTGGATGTGGTT	CTAGGCAGCAGGTACGGTT
WNT4	AGACGTGCGAGAACTCAAAG	GGAAGTGGTATTGGCACTCCT
WNT7a	GGCTTCTCTTCGGTGGTAGC	TGAAACTGACTCTGCCAGG
XBP1	TGGACTCTGACTGTTGCCTC	TAGACCTCTGGGAGTTCCTCCA
αSMA	TGCTGACAGAGGCACCACTGAA	CAGTTGTACGTCCAGAGGCATAG

6.1.4.5 Quantification de l'ADN mitochondrial

Après extraction, dosage et contrôle de la qualité des ADN, la quantification relative de l'ADN mitochondrial a été réalisée par PCR selon la méthode précédemment décrite (Quiros et al., 2017). Cette méthode permet de déterminer le nombre de copies d'ADN mitochondrial (ADNmt) relatif au nombre de copies d'ADN nucléaire (ADNn). Les séquences des primers utilisés sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 9).

Tableau 9 | Séquences des primers pour l'analyse du ratio ADNmt/ADNn

Gène cible		Primer Forward	Primer Reverse
16S rRNA	mtDNA	CCGCAAGGGAAAGATGAAAGAC	TCGTTTGGTTTCGGGGTTTC
ND1	mtDNA	CTAGCAGAAACAAACCGGGC	CCGGCTGCGTATTCTACGTT
HK2	nDNA	GCCAGCCTCTCCTGATTTTGTGT	GGGAACACAAAAGACCTCTTCTGG

6.1.4.6 Analyse du méthylome

Après extraction, dosage et contrôle de la qualité des ADN génomiques (ADNg), ces derniers ont été envoyés à la plateforme Génomique Life & Brain GmbH pour dresser leur profil de méthylation. Brièvement, les ADNg ont été modifiés par conversion au bisulfite, puis les niveaux de méthylation ont été mesurés sur une puce « Illumina Infinium Mouse Methylation arrays » selon les instructions du fournisseur. Cette nouvelle méthode cible quantitativement plus de 280'000 sites CpGs parmi le génome murin. Les analyses de méthylation et de Gene Ontology (GO) ont été effectuées à l'aide du logiciel Partek® Genomics Suite®. Nous avons utilisé la normalisation Illumina standard avec un filtre permettant d'exclure les sondes sur les chromosomes sexuels ainsi que les sondes de faible qualité (estimation basée sur la p-value). Pour chaque locus CpG, les niveaux de méthylation (β -values) classés de 0 (complètement non méthylé) à 1 (entièrement méthylé) ont été calculés et utilisés pour l'analyse du

différentiel de méthylation entre les animaux contrôles non traités (n=3) et les animaux induits à la doxycycline (n=3).

6.1.4.7 Analyses biochimiques

6.1.4.7.1 Numération de la formule sanguine

Les analyses de numération des populations cellulaires sanguines ont été réalisées sur le plateau d'histologie RHEM de l'IGMM, doté d'un analyseur d'hématologie (Vet abc Plus+, Scil). L'analyse permet d'obtenir 15 paramètres différents sur les différentes populations cellulaires sanguines, les globules blancs, plaquettes et globules rouges, résumés dans le Tableau 10. Un bilan hématologique complet requiert 10µL de sang fraîchement prélevé, traité avec de l'EDTA comme anticoagulant.

Tableau 10 | Paramètres détaillés de la numération de la formule sanguine (NFS)

<p>Globules blancs</p> <ul style="list-style-type: none"> • Concentration totale • Lymphocytes (concentration et proportion) • Monocytes (concentration et proportion) • Granulocytes (concentration et proportion) • Polynucléaires éosinophiles (concentration et proportion) 	<p>Globules rouges</p> <ul style="list-style-type: none"> • Concentration totale • Concentration, concentration globulaire moyenne (CGMH) et teneur corpusculaire moyenne (TCMH) en hémoglobine • Hématocrite • Volume globulaire moyen • Indice de distribution des globules rouges
<p>Plaquettes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Concentration • Volume plaquettaire moyen 	

6.1.4.7.2 Dosage des lipides plasmatiques

Les dosages de cinq lipides plasmatiques (cholestérol, HDL, LDL, triglycérides, acide gras libres) ont été réalisés par le service Phénotypage de la plateforme Genotoul Anexplo de Toulouse (<https://anexplo.genotoul.fr/>).

6.1.4.7.3 Dosages protéiques des cytokines plasmatiques

Un panel de trente-et-unes cytokines plasmatiques a été dosé dans les échantillons par la société EveTechnology basée au Canada (<https://www.evetechologies.com/product/mouse-cytokine-array-chemokine-array-31-plex/>).

Tableau 11 | Liste détaillée des 31 cytokines plasmatiques dosées

Eotaxin	G-CSF	GM-CSF	IFN γ	IL-1 α	IL-1 β	IL-2
IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-9	IL-10
IL-12p40	IL-12p70	IL-13	IL-15	IL-17A	IP-10	KC
LIF	LIX	MCP-1	M-CSF	MIG	MIP-1 α	MIP-1 β
MIP-2	RANTES	TNF α	VEGF-A			

6.1.4.8 Analyses statistiques

Pour tous les graphiques (sauf indication contraire), les données sont représentées comme la moyenne de la série avec l'intervalle de confiance à 95%. Pour les expériences *in vivo* et histologiques, n représente le nombre d'animaux utilisés. Pour les expériences *in vitro*, n représente le nombre d'individus à partir desquels les cellules ont été extraites.

Les analyses statistiques ont été majoritairement réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9. Pour les comparaisons de deux groupes, un t-test non pairé (*in vivo*) a été utilisé. Une valeur de p-value inférieure ou égale à 0.05 a été considérée comme significative.

6.1.4.9 Illustrations

Les Figure 2, Figure 4, Figure 5, Figure 6, Figure 7, Figure 8, Figure 9, Figure 11, Figure 12, Figure 13, Figure 18, Figure 23, Figure 25, Figure 27, Figure 52, et Figure 53 ont été réalisées à l'aide du logiciel BioRender (<https://biorender.com/>). Les figures de hiérarchisations (*heat map*) (Figure 31, Figure 38, et Figure 46) ont été obtenues à l'aide l'outils *Interactive Clustered Heat Map Builder* accessible en ligne (<https://build.ngchm.net/NGCHM-web-builder/>) (Ryan et al., 2020). L'ensemble des autres figures ont été générées grâce au logiciel GraphPad Prism 9.

7 BIBLIOGRAPHIE

- Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., Ors, I., Graña, O., Megías, D., Domínguez, O., Martínez, D., et al. (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* 502, 340–345.
- Abbas, O., Richards, J.E., Yaar, R., and Mahalingam, M. (2011). Stem cell markers (cytokeratin 15, cytokeratin 19 and p63) in in situ and invasive cutaneous epithelial lesions. *Mod Pathol* 24, 90–97.
- Acimovic, I., Vilotic, A., Pesl, M., Lacampagne, A., Dvorak, P., Rotrekl, V., and Meli, A.C. (2014). Human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as research and therapeutic tools. *Biomed Res Int* 2014, 512831.
- Acimovic, I., Refaat, M.M., Moreau, A., Salykin, A., Reiken, S., Sleiman, Y., Souidi, M., Příbyl, J., Kajava, A.V., Richard, S., et al. (2018). Post-Translational Modifications and Diastolic Calcium Leak Associated to the Novel RyR2-D3638A Mutation Lead to CPVT in Patient-Specific hiPSC-Derived Cardiomyocytes. *J Clin Med* 7.
- Agarwal, S., Loh, Y.-H., McLoughlin, E.M., Huang, J., Park, I.-H., Miller, J.D., Huo, H., Okuka, M., Dos Reis, R.M., Loewer, S., et al. (2010). Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients. *Nature* 464, 292–296.
- Alili, L., Diekmann, J., Giesen, M., Holtkötter, O., and Brenneisen, P. (2014). A drug-induced accelerated senescence (DIAS) is a possibility to study aging in time lapse. *Age (Dordr)* 36, 9658.
- Alkahest, Inc. (2020). A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Assess the Safety and Tolerability of GRF6021 Infusions in Subjects With Parkinson’s Disease and Cognitive Impairment (clinicaltrials.gov).
- Alkahest, Inc. (2021). A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Assess the Safety and Tolerability of Pulsed GRF6019 Infusions in Subjects With Severe Alzheimer’s Disease (clinicaltrials.gov).
- Alle, Q., Le Borgne, E., Milhavet, O., and Lemaitre, J.-M. (2021a). Reprogramming: Emerging Strategies to Rejuvenate Aging Cells and Tissues. *Int J Mol Sci* 22, 3990.
- Alle, Q., Le Borgne, E., Bensadoun, P., Lemey, C., Béchir, N., Gabanou, M., Estermann, F., Bertrand-Gaday, C., Pessemesse, L., Toupet, K., et al. (2021b). A single short reprogramming early in life improves fitness and increases lifespan in old age.
- Alman, B., and Baht, G. (2021). Parabiosis: Assessing the Effects of Circulating Cells and Factors on the Skeleton. *Methods Mol Biol* 2230, 105–113.
- Aman, Y., Qiu, Y., Tao, J., and Fang, E.F. (2018). Therapeutic potential of boosting NAD⁺ in aging and age-related diseases. *Translational Medicine of Aging* 2, 30–37.
- Andrzejewski, S., Gravel, S.-P., Pollak, M., and St-Pierre, J. (2014). Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer Metab* 2, 12.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Juhr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., et al. (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8, 376–388.
- de Araújo, A.L., Silva, L.C.R., Fernandes, J.R., and Benard, G. (2013). Preventing or reversing immunosenescence: can exercise be an immunotherapy? *Immunotherapy* 5, 879–893.
- Armour, S.M., Baur, J.A., Hsieh, S.N., Land-Bracha, A., Thomas, S.M., and Sinclair, D.A. (2009). Inhibition of mammalian S6 kinase by resveratrol suppresses autophagy. *Aging (Albany NY)* 1, 515–528.
- Ashapkin, V.V., Kutueva, L.I., Kurchashova, S.Y., and Kireev, I.I. (2019). Are There Common Mechanisms Between the Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and Natural Aging? *Front Genet* 10, 455.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17, 126–140.

- Bai, P., Cantó, C., Oudart, H., Brunyánszki, A., Cen, Y., Thomas, C., Yamamoto, H., Huber, A., Kiss, B., Houtkooper, R.H., et al. (2011). PARP-1 Inhibition Increases Mitochondrial Metabolism through SIRT1 Activation. *Cell Metabolism* 13, 461–468.
- Bajaj, V., Gadi, N., Spihlman, A.P., Wu, S.C., Choi, C.H., and Moulton, V.R. (2021). Aging, Immunity, and COVID-19: How Age Influences the Host Immune Response to Coronavirus Infections? *Front Physiol* 11, 571416.
- Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232–236.
- Baker, D.J., Childs, B.G., Durik, M., Wijers, M.E., Sieben, C.J., Zhong, J., Saltness, R.A., Jeganathan, K.B., Verzosa, G.C., Pezeshki, A., et al. (2016). Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184–189.
- Baker, L.D., Barsness, S.M., Borson, S., Merriam, G.R., Friedman, S.D., Craft, S., and Vitiello, M.V. (2012). Effects of Growth Hormone–Releasing Hormone on Cognitive Function in Adults With Mild Cognitive Impairment and Healthy Older Adults. *Arch Neurol* 69, 1420–1429.
- Banito, A., Rashid, S.T., Acosta, J.C., Li, S., Pereira, C.F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J.C., Azuara, V., Walsh, M., et al. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes & Development* 23, 2134–2139.
- Bárcena, C., Valdés-Mas, R., Mayoral, P., Garabaya, C., Durand, S., Rodríguez, F., Fernández-García, M.T., Salazar, N., Nogacka, A.M., Garatachea, N., et al. (2019). Healthspan and lifespan extension by fecal microbiota transplantation into progeroid mice. *Nat Med* 25, 1234–1242.
- Barry, J., Hyllner, J., Stacey, G., Taylor, C.J., and Turner, M. (2015). Setting Up a Haplobank: Issues and Solutions. *Curr Stem Cell Rep* 1, 110–117.
- Barzilai, N., Huffman, D.M., Muzumdar, R.H., and Bartke, A. (2012). The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* 61, 1315–1322.
- Batista, L.F.Z., Pech, M.F., Zhong, F.L., Nguyen, H.N., Xie, K.T., Zaug, A.J., Crary, S.M., Choi, J., Sebastiano, V., Cherry, A., et al. (2011). Telomere shortening and loss of self-renewal in dyskeratosis congenita induced pluripotent stem cells. *Nature* 474, 399–402.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., et al. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444, 337–342.
- Ben M'Barek, K., and Monville, C. (2019). Cell Therapy for Retinal Dystrophies: From Cell Suspension Formulation to Complex Retinal Tissue Bioengineering. *Stem Cells Int* 2019, 4568979.
- Ben M'Barek, K., Bertin, S., Brazhnikova, E., Jaillard, C., Habeler, W., Plancheron, A., Fovet, C.-M., Demilly, J., Jarraya, M., Bejanariu, A., et al. (2020). Clinical-grade production and safe delivery of human ESC derived RPE sheets in primates and rodents. *Biomaterials* 230, 119603.
- Benayoun, B.A., Pollina, E.A., and Brunet, A. (2015). Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 593–610.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (W H Freeman).
- Berge, U., Kristensen, P., and Rattan, S.I.S. (2008). Hormetic modulation of differentiation of normal human epidermal keratinocytes undergoing replicative senescence in vitro. *Exp Gerontol* 43, 658–662.
- Bernardes de Jesus, B., Vera, E., Schneeberger, K., Tejera, A.M., Ayuso, E., Bosch, F., and Blasco, M.A. (2012). Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med* 4, 691–704.
- Bernet, J.D., Doles, J.D., Hall, J.K., Kelly Tanaka, K., Carter, T.A., and Olwin, B.B. (2014). p38 MAPK signaling underlies a cell-autonomous loss of stem cell self-renewal in skeletal muscle of aged mice. *Nat Med* 20, 265–271.
- Bernstein, B.E., Meissner, A., and Lander, E.S. (2007). The Mammalian Epigenome. *Cell* 128, 669–681.

- Biagi, E., Franceschi, C., Rampelli, S., Severgnini, M., Ostan, R., Turrioni, S., Consolandi, C., Quercia, S., Scurti, M., Monti, D., et al. (2016). Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Current Biology* 26, 1480–1485.
- Birbrair, A., Zhang, T., Files, D.C., Mannava, S., Smith, T., Wang, Z.-M., Messi, M.L., Mintz, A., and Delbono, O. (2014). Type-1 pericytes accumulate after tissue injury and produce collagen in an organ-dependent manner. *Stem Cell Res Ther* 5, 122.
- Black, J.O. (2016). Xeroderma Pigmentosum. *Head Neck Pathol* 10, 139–144.
- Blackburn, E.H., Greider, C.W., and Szostak, J.W. (2006). Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 12, 1133–1138.
- Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M.E., Sánchez, F.J., Sinsheimer, J.S., Horvath, S., and Vilain, E. (2011). Epigenetic predictor of age. *PLoS One* 6, e14821.
- Boehme, M., Guzzetta, K.E., Bastiaanssen, T.F.S., van de Wouw, M., Moloney, G.M., Gual-Grau, A., Spichak, S., Olavarría-Ramírez, L., Fitzgerald, P., Morillas, E., et al. (2021). Microbiota from young mice counteracts selective age-associated behavioral deficits. *Nat Aging* 1, 666–676.
- Bollati, V., Schwartz, J., Wright, R., Litonjua, A., Tarantini, L., Suh, H., Sparrow, D., Vokonas, P., and Baccarelli, A. (2009). Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 130, 234–239.
- Booth, F.W., and Lees, S.J. (2007). Fundamental questions about genes, inactivity, and chronic diseases. *Physiological Genomics* 28, 146–157.
- Booth, L.N., and Brunet, A. (2016). The Aging Epigenome. *Mol Cell* 62, 728–744.
- Booth, J., Moseley, G.L., Schiltenswolf, M., Cashin, A., Davies, M., and Hübscher, M. (2017). Exercise for chronic musculoskeletal pain: A biopsychosocial approach. *Musculoskeletal Care* 15, 413–421.
- Borghesan, M., Hoogaars, W.M.H., Varela-Eirin, M., Talma, N., and Demaria, M. (2020). A Senescence-Centric View of Aging: Implications for Longevity and Disease. *Trends in Cell Biology* S0962892420301434.
- Bortoli, S., Renault, V., Eveno, E., Auffray, C., Butler-Browne, G., and Piétu, G. (2003). Gene expression profiling of human satellite cells during muscular aging using cDNA arrays. *Gene* 321, 145–154.
- Boskey, A.L., and Imbert, L. (2017). Bone quality changes associated with aging and disease: a review. *Ann N Y Acad Sci* 1410, 93–106.
- Boularaoui, S.M., Abdel-Raouf, K.M.A., Alwahab, N.S.A., Kondash, M.E., Truskey, G.A., Teo, J.C.M., and Christoforou, N. (2018). Efficient transdifferentiation of human dermal fibroblasts into skeletal muscle. *J Tissue Eng Regen Med* 12, e918–e936.
- Boveris, A., and Navarro, A. (2008). Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med* 44, 224–229.
- Bowl, M.R., and Dawson, S.J. (2019). Age-Related Hearing Loss. *Cold Spring Harb Perspect Med* 9, a033217.
- Brack, A.S., Bildsoe, H., and Hughes, S.M. (2005). Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *Journal of Cell Science* 118, 4813–4821.
- Brack, A.S., Conboy, M.J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C.J., Keller, C., and Rando, T.A. (2007). Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. *Science* 317, 807–810.
- Brandhorst, S., Choi, I.Y., Wei, M., Cheng, C.W., Sedrakyan, S., Navarrete, G., Dubeau, L., Yap, L.P., Park, R., Vinciguerra, M., et al. (2015). A Periodic Diet that Mimics Fasting Promotes Multi-System Regeneration, Enhanced Cognitive Performance, and Healthspan. *Cell Metab* 22, 86–99.
- Breton, J., Tennoune, N., Lucas, N., Francois, M., Legrand, R., Jacquemot, J., Goichon, A., Guérin, C., Peltier, J., Pestel-Caron, M., et al. (2016). Gut Commensal E. coli Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-Induced Bacterial Growth. *Cell Metabolism* 23, 324–334.
- Briggs, R., and King, T.J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 38, 455–463.

- Brons, I.G.M., Smithers, L.E., Trotter, M.W.B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448, 191–195.
- Brooks, M.J., Chen, H.Y., Kelley, R.A., Mondal, A.K., Nagashima, K., De Val, N., Li, T., Chaitankar, V., and Swaroop, A. (2019). Improved Retinal Organoid Differentiation by Modulating Signaling Pathways Revealed by Comparative Transcriptome Analyses with Development In Vivo. *Stem Cell Reports* 13, 891–905.
- Buqué, A., Bloy, N., Perez-Lanzón, M., Iribarren, K., Humeau, J., Pol, J.G., Levesque, S., Mondragon, L., Yamazaki, T., Sato, A., et al. (2020). Immunoprophylactic and immunotherapeutic control of hormone receptor-positive breast cancer. *Nat Commun* 11, 3819.
- de Cabo, R., and Mattson, M.P. (2019). Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. *New England Journal of Medicine* 381, 2541–2551.
- Cabreiro, F., and Gems, D. (2013). Worms need microbes too: microbiota, health and aging in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Molecular Medicine* 5, 1300–1310.
- Cacchiarelli, D., Trapnell, C., Ziller, M.J., Soumillon, M., Cesana, M., Karnik, R., Donaghey, J., Smith, Z.D., Ratanasirintrao, S., Zhang, X., et al. (2015). Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell* 162, 412–424.
- Cadiñanos, J., Varela, I., López-Otín, C., and Freije, J. (2006). From Immature Lamin to Premature Aging: Molecular Pathways and Therapeutic Opportunities. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 4, 1732–1735.
- Cahill, G.F. (2006). Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr* 26, 1–22.
- Cahill, G.F., Herrera, M.G., Morgan, A.P., Soeldner, J.S., Steinke, J., Levy, P.L., Reichard, G.A., and Kipnis, D.M. (1966). Hormone-fuel interrelationships during fasting. *J Clin Invest* 45, 1751–1769.
- Caiazzo, M., Giannelli, S., Valente, P., Lignani, G., Carissimo, A., Sessa, A., Colasante, G., Bartolomeo, R., Massimino, L., Ferroni, S., et al. (2015). Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors. *Stem Cell Reports* 4, 25–36.
- Calabrese, E.J., and Baldwin, L.A. (2000). The effects of gamma rays on longevity. *Biogerontology* 1, 309–319.
- Campbell, J.P., and Turner, J.E. (2018). Debunking the Myth of Exercise-Induced Immune Suppression: Redefining the Impact of Exercise on Immunological Health Across the Lifespan. *Front Immunol* 9, 648.
- Carey, B.W., Markoulaki, S., Beard, C., Hanna, J., and Jaenisch, R. (2010). Single-gene transgenic mouse strains for reprogramming adult somatic cells. *Nature Methods* 7, 56–59.
- Carlson, M.E., Conboy, M.J., Hsu, M., Barchas, L., Jeong, J., Agrawal, A., Mikels, A.J., Agrawal, S., Schaffer, D.V., and Conboy, I.M. (2009). Relative roles of TGF- β 1 and Wnt in the systemic regulation and aging of satellite cell responses. *Aging Cell* 8, 676–689.
- Carro, E., Trejo, J.L., Gerber, A., Loetscher, H., Torrado, J., Metzger, F., and Torres-Aleman, I. (2006). Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiol Aging* 27, 1250–1257.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., and Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132, 885–896.
- Castellano, J.M., Palner, M., Li, S.-B., Freeman, G.M., Nguyen, A., Shen, B., Stan, T., Mosher, K.I., Chin, F.T., de Lecea, L., et al. (2016). In vivo assessment of behavioral recovery and circulatory exchange in the peritoneal parabiosis model. *Sci Rep* 6, 29015.
- Castellano, J.M., Mosher, K.I., Abbey, R.J., McBride, A.A., James, M.L., Berdnik, D., Shen, J.C., Zou, B., Xie, X.S., Tingle, M., et al. (2017). Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature* 544, 488–492.
- Cathomas, F., Murrugh, J.W., Nestler, E.J., Han, M.-H., and Russo, S.J. (2019). Neurobiology of Resilience: Interface Between Mind and Body. *Biol Psychiatry* 86, 410–420.
- Cauley, J.A., Robbins, J., Chen, Z., Cummings, S.R., Jackson, R.D., LaCroix, A.Z., LeBoff, M., Lewis, C.E., McGowan, J., Neuner, J., et al. (2003). Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women’s Health Initiative randomized trial. *JAMA* 290, 1729–1738.

- Chaix, A., Zarrinpar, A., and Panda, S. (2016). The circadian coordination of cell biology. *J Cell Biol* 215, 15–25.
- Chaleckis, R., Murakami, I., Takada, J., Kondoh, H., and Yanagida, M. (2016). Individual variability in human blood metabolites identifies age-related differences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 4252–4259.
- Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N.E., Ding, S., Feng, W., et al. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 22, 78–83.
- Chen, T., Shen, L., Yu, J., Wan, H., Guo, A., Chen, J., Long, Y., Zhao, J., and Pei, G. (2011). Rapamycin and other longevity-promoting compounds enhance the generation of mouse induced pluripotent stem cells. *Aging Cell* 10, 908–911.
- Chen, W., Jongkamonwiwat, N., Abbas, L., Eshtan, S.J., Johnson, S.L., Kuhn, S., Milo, M., Thurlow, J.K., Andrews, P.W., Marcotti, W., et al. (2012). Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. *Nature* 490, 278–282.
- Cheung, H.-H., Liu, X., Canterel-Thouennon, L., Li, L., Edmonson, C., and Rennert, O.M. (2014). Telomerase Protects Werner Syndrome Lineage-Specific Stem Cells from Premature Aging. *Stem Cell Reports* 2, 534–546.
- Chiche, A., Le Roux, I., von Joest, M., Sakai, H., Aguin, S.B., Cazin, C., Salam, R., Fiette, L., Alegria, O., Flamant, P., et al. (2017). Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. *Cell Stem Cell* 20, 407–414.e4.
- Choong, M.L., Yong, Y.P., Tan, A.C.L., Luo, B., and Lodish, H.F. (2004). LIX: a chemokine with a role in hematopoietic stem cells maintenance. *Cytokine* 25, 239–245.
- Choy, E.H.S., and Panayi, G.S. (2001). Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* 344, 907–916.
- Chung, Y.G., Eum, J.H., Lee, J.E., Shim, S.H., Sepilian, V., Hong, S.W., Lee, Y., Treff, N.R., Choi, Y.H., Kimbrel, E.A., et al. (2014). Human Somatic Cell Nuclear Transfer Using Adult Cells. *Cell Stem Cell* 14, 777–780.
- Chung, Y.G., Matoba, S., Liu, Y., Eum, J.H., Lu, F., Jiang, W., Lee, J.E., Sepilian, V., Cha, K.Y., Lee, D.R., et al. (2015). Histone Demethylase Expression Enhances Human Somatic Cell Nuclear Transfer Efficiency and Promotes Derivation of Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 17, 758–766.
- Collins, C.A., Zammit, P.S., Ruiz, A.P., Morgan, J.E., and Partridge, T.A. (2007). A Population of Myogenic Stem Cells That Survives Skeletal Muscle Aging. *STEM CELLS* 25, 885–894.
- Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Cruzen, C., Simmons, H.A., Kemnitz, J.W., et al. (2009). Caloric Restriction Delays Disease Onset and Mortality in Rhesus Monkeys. *Science* 325, 201–204.
- Colman, R.J., Beasley, T.M., Kemnitz, J.W., Johnson, S.C., Weindruch, R., and Anderson, R.M. (2014). Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun* 5, 3557.
- Conboy, I.M., Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L., and Rando, T.A. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433, 760–764.
- Cook, S.J., Stuart, K., Gilley, R., and Sale, M.J. (2017). Control of cell death and mitochondrial fission by ERK1/2 MAP kinase signalling. *FEBS J* 284, 4177–4195.
- Cortés-López, M., Gruner, M.R., Cooper, D.A., Gruner, H.N., Voda, A.-I., van der Linden, A.M., and Miura, P. (2018). Global accumulation of circRNAs during aging in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* 19, 8.
- Cosgrove, B.D., Gilbert, P.M., Porpiglia, E., Mourkioti, F., Lee, S.P., Corbel, S.Y., Llewellyn, M.E., Delp, S.L., and Blau, H.M. (2014). Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles. *Nat Med* 20, 255–264.
- Costa-Mattioli, M., and Walter, P. (2020). The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science* 368, eaat5314.

- Cui, J., Yang, G., Pan, Z., Zhao, Y., Liang, X., Li, W., and Cai, L. (2017). Hormetic Response to Low-Dose Radiation: Focus on the Immune System and Its Clinical Implications. *Int J Mol Sci* 18, E280.
- Cuttler, J.M., Feinendegen, L.E., and Socol, Y. (2017). Evidence That Lifelong Low Dose Rates of Ionizing Radiation Increase Lifespan in Long- and Short-Lived Dogs. *Dose Response* 15, 1559325817692903.
- Cypser, J.R., and Johnson, T.E. (2003). Hormesis in *Caenorhabditis elegans* dauer-defective mutants. *Biogerontology* 4, 203–214.
- Darst, B.F., Koscik, R.L., Hogan, K.J., Johnson, S.C., and Engelman, C.D. (2019). Longitudinal plasma metabolomics of aging and sex. *Aging (Albany NY)* 11, 1262–1282.
- Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987–1000.
- De Los Angeles, A., Ferrari, F., Xi, R., Fujiwara, Y., Benvenisty, N., Deng, H., Hochedlinger, K., Jaenisch, R., Lee, S., Leitch, H.G., et al. (2015). Hallmarks of pluripotency. *Nature* 525, 469–478.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7, 11–20.
- Del Álamo, J.C., Lemons, D., Serrano, R., Savchenko, A., Cerignoli, F., Bodmer, R., and Mercola, M. (2016). High throughput physiological screening of iPSC-derived cardiomyocytes for drug development. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1717–1727.
- Delzenne, N.M., and Cani, P.D. (2008). Implication de la flore intestinale dans le métabolisme énergétique. *Med Sci (Paris)* 24, 505–510.
- Deng, F., Chen, M., Liu, Y., Hu, H., Xiong, Y., Xu, C., Liu, Y., Li, K., Zhuang, J., and Ge, J. (2016). Stage-specific differentiation of iPSCs toward retinal ganglion cell lineage. *Mol. Vis.* 22, 536–547.
- DeSantis, C.E., Miller, K.D., Dale, W., Mohile, S.G., Cohen, H.J., Leach, C.R., Goding Sauer, A., Jemal, A., and Siegel, R.L. (2019). Cancer statistics for adults aged 85 years and older, 2019. *CA Cancer J Clin* 69, 452–467.
- Deuse, T., Hu, X., Gravina, A., Wang, D., Tediashvili, G., De, C., Thayer, W.O., Wahl, A., Garcia, J.V., Reichenspurner, H., et al. (2019). Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat. Biotechnol.* 37, 252–258.
- Di Lullo, E., and Kriegstein, A.R. (2017). The use of brain organoids to investigate neural development and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 573–584.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363–9367.
- Dirks, A.J., and Leeuwenburgh, C. (2006). Caloric restriction in humans: potential pitfalls and health concerns. *Mech Ageing Dev* 127, 1–7.
- Doeser, M.C., Schöler, H.R., and Wu, G. (2018). Reduction of Fibrosis and Scar Formation by Partial Reprogramming In Vivo. *STEM CELLS* 36, 1216–1225.
- Dominguez, L.J., Di Bella, G., Veronese, N., and Barbagallo, M. (2021). Impact of Mediterranean Diet on Chronic Non-Communicable Diseases and Longevity. *Nutrients* 13, 2028.
- Dorman, J.B., Albinder, B., Shroyer, T., and Kenyon, C. (1995). The Age-1 and Daf-2 Genes Function in a Common Pathway to Control the Lifespan of *Caenorhabditis Elegans*. *Genetics* 141, 1399–1406.
- Duncan, T., and Valenzuela, M. (2017). Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. *Stem Cell Res Ther* 8, 111.
- Dunn, S.E., Kari, F.W., French, J., Leininger, J.R., Travlos, G., Wilson, R., and Barrett, J.C. (1997). Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. *Cancer Res* 57, 4667–4672.
- Dussiot, M., Maciel, T.T., Fricot, A., Chartier, C., Negre, O., Veiga, J., Grapton, D., Paubelle, E., Payen, E., Beuzard, Y., et al. (2014). An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in β -thalassemia. *Nat Med* 20, 398–407.

- Dye, B.R., Hill, D.R., Ferguson, M.A., Tsai, Y.-H., Nagy, M.S., Dyal, R., Wells, J.M., Mayhew, C.N., Nattiv, R., Klein, O.D., et al. (2015). In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *ELife* 4, e05098.
- Egerman, M.A., and Glass, D.J. (2019). The role of GDF11 in aging and skeletal muscle, cardiac and bone homeostasis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 54, 174–183.
- Egerman, M.A., Cadena, S.M., Gilbert, J.A., Meyer, A., Nelson, H.N., Swalley, S.E., Mallozzi, C., Jacobi, C., Jennings, L.L., Clay, I., et al. (2015). GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab* 22, 164–174.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., et al. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 11, 1305–1314.
- Elabd, C., Cousin, W., Upadhyayula, P., Chen, R.Y., Chooljian, M.S., Li, J., Kung, S., Jiang, K.P., and Conboy, I.M. (2014). Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. *Nat Commun* 5, 4082.
- Eliazer, S., Muncie, J.M., Christensen, J., Sun, X., D’Urso, R.S., Weaver, V.M., and Brack, A.S. (2019). Wnt4 from the Niche Controls the Mechano-Properties and Quiescent State of Muscle Stem Cells. *Cell Stem Cell* 25, 654-665.e4.
- Eloe-Fadrosh, E.A., and Rasko, D.A. (2013). The Human Microbiome: From Symbiosis to Pathogenesis. *Annual Review of Medicine* 64, 145–163.
- Eloe-Fadrosh, E.A., Brady, A., Crabtree, J., Drabek, E.F., Ma, B., Mahurkar, A., Ravel, J., Haverkamp, M., Fiorino, A.-M., Botelho, C., et al. (2015). Functional dynamics of the gut microbiome in elderly people during probiotic consumption. *MBio* 6, e00231-15.
- Emmelot-Vonk, M.H., Verhaar, H.J.J., Nakhai Pour, H.R., Aleman, A., Lock, T.M.T.W., Bosch, J.L.H.R., Grobbee, D.E., and van der Schouw, Y.T. (2008). Effect of testosterone supplementation on functional mobility, cognition, and other parameters in older men: a randomized controlled trial. *JAMA* 299, 39–52.
- Escobar, K.A., Cole, N.H., Mermier, C.M., and VanDusseldorp, T.A. (2019). Autophagy and aging: Maintaining the proteome through exercise and caloric restriction. *Aging Cell* 18, e12876.
- Espindola, M.S., Habel, D.M., Narayanan, R., Jones, I., Coelho, A.L., Murray, L.A., Jiang, D., Noble, P.W., and Hogaboam, C.M. (2018). Targeting of TAM Receptors Ameliorates Fibrotic Mechanisms in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 197, 1443–1456.
- Esquela, A.F., and Lee, S. e-Jin (2003). Regulation of metanephric kidney development by growth/differentiation factor 11. *Developmental Biology* 257, 356–370.
- Fedintsev, A., and Moskalev, A. (2020). Stochastic non-enzymatic modification of long-lived macromolecules - A missing hallmark of aging. *Ageing Research Reviews* 62, 101097.
- Fernández, Á.F., Sebtí, S., Wei, Y., Zou, Z., Shi, M., McMillan, K.L., He, C., Ting, T., Liu, Y., Chiang, W.-C., et al. (2018). Disruption of the beclin 1–BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice. *Nature* 558, 136–140.
- Fernandopulle, M.S., Prestil, R., Grunseich, C., Wang, C., Gan, L., and Ward, M.E. (2018). Transcription Factor-Mediated Differentiation of Human iPSCs into Neurons. *Curr Protoc Cell Biol* 79, e51.
- Florath, I., Butterbach, K., Müller, H., Bewerunge-Hudler, M., and Brenner, H. (2014). Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Hum Mol Genet* 23, 1186–1201.
- Folmes, C.D.L., Nelson, T.J., Martinez-Fernandez, A., Arrell, D.K., Lindor, J.Z., Dzeja, P.P., Ikeda, Y., Perez-Terzic, C., and Terzic, A. (2011). Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab* 14, 264–271.
- Fonager, J., Beedholm, R., Clark, B.F.C., and Rattan, S.I.S. (2002). Mild stress-induced stimulation of heat-shock protein synthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging in vitro. *Exp Gerontol* 37, 1223–1228.
- Fontana, L., Partridge, L., and Longo, V.D. (2010a). Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science* 328, 321–326.

- Fontana, L., Partridge, L., and Longo, V.D. (2010b). Dietary Restriction, Growth Factors and Aging: from yeast to humans. *Science* 328, 321–326.
- Franco, C., Brandberg, J., Lönn, L., Andersson, B., Bengtsson, B.-A., and Johannsson, G. (2005). Growth hormone treatment reduces abdominal visceral fat in postmenopausal women with abdominal obesity: a 12-month placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 1466–1474.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* 85, 348–362.
- Gagliano, O., Luni, C., Qin, W., Bertin, E., Torchio, E., Galvanin, S., Urciuolo, A., and Elvassore, N. (2019). Microfluidic reprogramming to pluripotency of human somatic cells. *Nature Protocols* 14, 722–737.
- Gaimard, M. (2015). L'évolution de la mortalité depuis le milieu du XXe siècle. *L'Europe en Formation* n° 377, 30–45.
- Galarraga, M., Campión, J., Muñoz-Barrutia, A., Boqué, N., Moreno, H., Martínez, J.A., Milagro, F., and Ortiz-de-Solórzano, C. (2012). Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of Lipid Research* 53, 2791–2796.
- Galluzzi, L., Pedro, J.M.B.-S., and Kroemer, G. (2017). Autophagie, bonne santé et longévité. *Med Sci (Paris)* 33, 246–251.
- Gan, K.J., and Südhof, T.C. (2019). Specific factors in blood from young but not old mice directly promote synapse formation and NMDA-receptor recruitment. *PNAS* 116, 12524–12533.
- Gao, S., Hou, X., Jiang, Y., Xu, Z., Cai, T., Chen, J., and Chang, G. (2017). Integrated analysis of hematopoietic differentiation outcomes and molecular characterization reveals unbiased differentiation capacity and minor transcriptional memory in HPC/HSC-iPSCs. *Stem Cell Res Ther* 8, 13.
- Gatinois, V., Desprat, R., Becker, F., Pichard, L., Bernex, F., Corsini, C., Pellestor, F., and Lemaitre, J.-M. (2019). Reprogramming of Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) from a patient suffering of a Werner syndrome resulting in iPSC line (REGUi003-A) maintaining a short telomere length. *Stem Cell Res* 39, 101515.
- Gatinois, V., Desprat, R., Becker, F., Pichard, L., Bernex, F., Isidor, B., Pellestor, F., and Lemaitre, J.-M. (2020). iPSC line derived from a Bloom syndrome patient retains an increased disease-specific sister-chromatid exchange activity. *Stem Cell Research* 43, 101696.
- GBD 2017 Diet Collaborators (2019). Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 393, 1958–1972.
- Gerhart-Hines, Z., Dominy, J.E., Blättler, S.M., Jedrychowski, M.P., Banks, A.S., Lim, J.-H., Chim, H., Gygi, S.P., and Puigserver, P. (2011). The cAMP/PKA pathway rapidly activates SIRT1 to promote fatty acid oxidation independently of changes in NAD(+). *Mol Cell* 44, 851–863.
- Ghosh, H.S., McBurney, M., and Robbins, P.D. (2010). SIRT1 Negatively Regulates the Mammalian Target of Rapamycin. *PLoS One* 5, e9199.
- Gibson, M.C., and Schultz, E. (1983). Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle & Nerve* 6, 574–580.
- Gill, D., Parry, A., Santos, F., Hernando-Herraez, I., Stubbs, T.M., Milagre, I., and Reik, W. (2021). Multi-omic rejuvenation of human cells by maturation phase transient reprogramming.
- Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X., and Seto, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363, 15–23.
- Gois Beghini, D., Iwao Horita, S., Cascabulho, C.M., Anastácio Alves, L., and Henriques-Pons, A. (2020). Induced Pluripotent Stem Cells: Hope in the Treatment of Diseases, including Muscular Dystrophies. *Int J Mol Sci* 21.
- Gomes-Osman, J., Cabral, D.F., Morris, T.P., McNerney, K., Cahalin, L.P., Rundek, T., Oliveira, A., and Pascual-Leone, A. (2018). Exercise for cognitive brain health in aging. *Neurol Clin Pract* 8, 257–265.
- González, C., Bonilla, S., Flores, A.I., Cano, E., and Liste, I. (2016). An Update on Human Stem Cell-Based Therapy in Parkinson's Disease. *Curr Stem Cell Res Ther* 11, 561–568.

- Gonzalez-Armenta, J.L., Li, N., Lee, R.-L., Lu, B., and Molina, A.J.A. (2021). Heterochronic Parabiosis: Old Blood Induces Changes in Mitochondrial Structure and Function of Young Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 76, 434–439.
- Gordan, J.D., Thompson, C.B., and Simon, M.C. (2007). HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell* 12, 108–113.
- Gordon, L.B., Brown, W.T., and Collins, F.S. (1993). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. In *GeneReviews®*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, G. Mirzaa, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- Gorgoulis, V., Adams, P.D., Alimonti, A., Bennett, D.C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., et al. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* 179, 813–827.
- Gotoh, S., Ito, I., Nagasaki, T., Yamamoto, Y., Konishi, S., Korogi, Y., Matsumoto, H., Muro, S., Hirai, T., Funato, M., et al. (2014). Generation of alveolar epithelial spheroids via isolated progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 3, 394–403.
- Gourraud, P.-A., Gilson, L., Girard, M., and Peschanski, M. (2012). The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic “haplobank” of induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells* 30, 180–186.
- Graf, T., and Enver, T. (2009). Forcing cells to change lineages. *Nature* 462, 587–594.
- Granger, D.N., and Kvietys, P.R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol* 6, 524–551.
- Greenberg, M.V.C., and Bourc’his, D. (2019). The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 590–607.
- Grewal, S.I.S., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* 8, 35–46.
- Grimm, F.A., Iwata, Y., Sirenko, O., Bittner, M., and Rusyn, I. (2015). High-Content Assay Multiplexing for Toxicity Screening in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Hepatocytes. *Assay Drug Dev Technol* 13, 529–546.
- Gruner, H., Cortés-López, M., Cooper, D.A., Bauer, M., and Miura, P. (2016). CircRNA accumulation in the aging mouse brain. *Sci Rep* 6, 38907.
- Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 10, 622–640.
- Gurdon, J.B., Elsdale, T.R., and Fischberg, M. (1958). Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 182, 64–65.
- Gustafsson, T., and Ulfhake, B. (2021). Sarcopenia: What Is the Origin of This Aging-Induced Disorder? *Front Genet* 12, 688526.
- Gutiérrez-Martínez, L., Martínez, R.G., González, S.A., Bolívar, M.A., Estupiñan, O.V., and Sarmiento, O.L. (2018). Effects of a strategy for the promotion of physical activity in students from Bogotá. *Rev Saude Publica* 52, 79.
- Habib, A., Hou, H., Mori, T., Tian, J., Zeng, J., Fan, S., Giunta, B., Sanberg, P.R., Sawmiller, D., and Tan, J. (2018). Human Umbilical Cord Blood Serum-derived α -Secretase: Functional Testing in Alzheimer’s Disease Mouse Models. *Cell Transplant* 27, 438–455.
- Hallett, P.J., Deleidi, M., Astradsson, A., Smith, G.A., Cooper, O., Osborn, T.M., Sundberg, M., Moore, M.A., Perez-Torres, E., Brownell, A.-L., et al. (2015). Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson’s disease. *Cell Stem Cell* 16, 269–274.
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J.-B., Gao, Y., et al. (2013). Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol Cell* 49, 359–367.
- Hansen, M., Rubinsztein, D.C., and Walker, D.W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 579–593.

- Hansson, J., Rafiee, M.R., Reiland, S., Polo, J.M., Gehring, J., Okawa, S., Huber, W., Hochedlinger, K., and Krijgsveld, J. (2012). Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Rep* 2, 1579–1592.
- Harman, D. (1992). Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging* 275, 257–266.
- Harmon, E.B., Apelqvist, Å.A., Smart, N.G., Gu, X., Osborne, D.H., and Kim, S.K. (2004). GDF11 modulates NGN3+ islet progenitor cell number and promotes β -cell differentiation in pancreas development. *Development* 131, 6163–6174.
- Harris, R.B.S. (2014). Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1842, 414–423.
- Hawkins, K.E., Joy, S., Delhove, J.M.K.M., Kotiadis, V.N., Fernandez, E., Fitzpatrick, L.M., Whiteford, J.R., King, P.J., Bolanos, J.P., Duchon, M.R., et al. (2016). NRF2 Orchestrates the Metabolic Shift during Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming. *Cell Rep* 14, 1883–1891.
- Hayashi, Y., Hsiao, E.C., Sami, S., Lancero, M., Schlieve, C.R., Nguyen, T., Yano, K., Nagahashi, A., Ikeya, M., Matsumoto, Y., et al. (2016). BMP-SMAD-ID promotes reprogramming to pluripotency by inhibiting p16/INK4A-dependent senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 13057–13062.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585–621.
- Hazlehurst, J.M., Woods, C., Marjot, T., Cobbold, J.F., and Tomlinson, J.W. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism - Clinical and Experimental* 65, 1096–1108.
- Heide, M., Huttner, W.B., and Mora-Bermúdez, F. (2018). Brain organoids as models to study human neocortex development and evolution. *Current Opinion in Cell Biology* 55, 8–16.
- Hekimi, S., Lapointe, J., and Wen, Y. (2011). Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol* 21, 569–576.
- Hercus, M.J., Loeschke, V., and Rattan, S.I.S. (2003). Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. *Biogerontology* 4, 149–156.
- Hickson, L.J. (2021a). Senescence, Frailty, and Mesenchymal Stem Cell Functionality in Chronic Kidney Disease: Effect of Senolytic Agents (clinicaltrials.gov).
- Hickson, L.J. (2021b). Hematopoietic Stem Cell Transplant Survivors Study (HTSS Study) (clinicaltrials.gov).
- Hipp, M.S., Kasturi, P., and Hartl, F.U. (2019). The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 421–435.
- Hoeijmakers, J.H.J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 361, 1475–1485.
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53–p21 pathway. *Nature* 460, 1132–1135.
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 14, R115.
- Horvath, S., Oshima, J., Martin, G.M., Lu, A.T., Quach, A., Cohen, H., Felton, S., Matsuyama, M., Lowe, D., Kabacik, S., et al. (2018). Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and ex vivo studies. *Aging (Albany NY)* 10, 1758–1775.
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., et al. (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 341, 651–654.
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S.G., Croteau, D.L., and Bohr, V.A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 15, 565–581.
- Hu, Z., Li, H., Jiang, H., Ren, Y., Yu, X., Qiu, J., Stablewski, A.B., Zhang, B., Buck, M.J., and Feng, J. (2020). Transient inhibition of mTOR in human pluripotent stem cells enables robust formation of mouse-human chimeric embryos. *Science Advances* 6, eaaz0298.
- Huang, L.E. (2008). Carrot and stick: HIF- α engages c-Myc in hypoxic adaptation. *Cell Death Differ* 15, 672–677.

- Huang, W.-K., Wong, S.Z.H., Pather, S.R., Nguyen, P.T.T., Zhang, F., Zhang, D.Y., Zhang, Z., Lu, L., Fang, W., Chen, L., et al. (2021). Generation of hypothalamic arcuate organoids from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 28, 1657-1670.e10.
- Huang, Y., Yan, J., Hou, J., Fu, X., Li, L., and Hou, Y. (2015). Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain. *Forensic Science International: Genetics* 17, 129–136.
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008a). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 26, 795–797.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008b). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26, 1269–1275.
- Hulot, J.-S. (2019). Modeling Cardiac Arrhythmias With Organoids*. *Journal of the American College of Cardiology* 73, 2325–2327.
- Hunt, N.D., Li, G.D., Zhu, M., Levette, A., Chachich, M.E., Spangler, E.L., Allard, J.S., Hyun, D.-H., Ingram, D.K., and de Cabo, R. (2012). Effect of calorie restriction and refeeding on skin wound healing in the rat. *AGE* 34, 1453–1458.
- Iakova, P., Awad, S.S., and Timchenko, N.A. (2003). Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest. *Cell* 113, 495–506.
- Ichida, J.K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E.Y., Chung, J.E., Egli, D., Loh, K.M., Carter, A.C., Di Giorgio, F.P., Koszka, K., et al. (2009). A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* 5, 491–503.
- Ieda, M., Fu, J.-D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B.G., and Srivastava, D. (2010). Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142, 375–386.
- Imai, S., and Guarente, L. (2014). NAD⁺ and Sirtuins in Aging and Disease. *Trends Cell Biol* 24, 464–471.
- Inagawa, K., and Ieda, M. (2013). Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiac myocytes. *J Cardiovasc Transl Res* 6, 37–45.
- Itahana, K., Campisi, J., and Dimri, G.P. (2007). Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol* 371, 21–31.
- Iwanami, A., Kaneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Yamasaki, M., Momoshima, S., Ishii, H., Ando, K., et al. (2005). Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *Journal of Neuroscience Research* 80, 182–190.
- Jaskelioff, M., Muller, F.L., Paik, J.-H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadiñanos, J., et al. (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase deficient mice. *Nature* 469, 102–106.
- Jelinkova, S., Vilotic, A., Pribyl, J., Aimond, F., Salykin, A., Acimovic, I., Pesl, M., Caluori, G., Klimovic, S., Urban, T., et al. (2020). DMD Pluripotent Stem Cell Derived Cardiac Cells Recapitulate in vitro Human Cardiac Pathophysiology. *Front Bioeng Biotechnol* 8, 535.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the Histone Code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jia, F., Wilson, K.D., Sun, N., Gupta, D.M., Huang, M., Li, Z., Panetta, N.J., Chen, Z.Y., Robbins, R.C., Kay, M.A., et al. (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 7, 197–199.
- Jiang, J.C., Jaruga, E., Repnevskaya, M.V., and Jazwinski, S.M. (2000). An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *The FASEB Journal* 14, 2135–2137.
- Jin, Z., and Jie, S. (2019). A Revolution in Reprogramming: Small Molecules. *Current Molecular Medicine* 19, 77–90.
- Jones, B.S., Lamb, L.S., Goldman, F., and Di Stasi, A. (2014). Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Frontiers in Pharmacology* 5, 254.

- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771–775.
- Kanis, J.A. (1996). Estrogens, the menopause, and osteoporosis. *Bone* 19, 185S–190S.
- Kasai, T., Suga, H., Sakakibara, M., Ozone, C., Matsumoto, R., Kano, M., Mitsumoto, K., Ogawa, K., Kodani, Y., Nagasaki, H., et al. (2020). Hypothalamic Contribution to Pituitary Functions Is Recapitulated In Vitro Using 3D-Cultured Human iPS Cells. *Cell Reports* 30, 18–24.e5.
- Katsimpardi, L., Litterman, N.K., Schein, P.A., Miller, C.M., Loffredo, F.S., Wojtkiewicz, G.R., Chen, J.W., Lee, R.T., Wagers, A.J., and Rubin, L.L. (2014). Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science* 344, 630–634.
- Katsimpardi, L., Kuperwasser, N., Camus, C., Moigneu, C., Chiche, A., Tolle, V., Li, H., Kokovay, E., and Lledo, P.-M. (2020). Systemic GDF11 stimulates the secretion of adiponectin and induces a calorie restriction-like phenotype in aged mice. *Aging Cell* 19, e13038.
- Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y.V., Menendez, S., Morera, L.B., Raya, A., Wahl, G.M., and Belmonte, J.C.I. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460, 1140–1144.
- Kenny, A.M., Kleppinger, A., Annis, K., Rathier, M., Browner, B., Judge, J.O., and McGee, D. (2010). Effects of transdermal testosterone on bone and muscle in older men with low bioavailable testosterone levels, low bone mass, and physical frailty. *J Am Geriatr Soc* 58, 1134–1143.
- Khrimian, L., Obri, A., Ramos-Brossier, M., Rousseaud, A., Moriceau, S., Nicot, A.-S., Mera, P., Kosmidis, S., Karnavas, T., Saudou, F., et al. (2017). Gpr158 mediates osteocalcin's regulation of cognition. *J Exp Med* 214, 2859–2873.
- Kida, Y.S., Kawamura, T., Wei, Z., Sogo, T., Jacinto, S., Shigeno, A., Kushige, H., Yoshihara, E., Liddle, C., Ecker, J.R., et al. (2015). ERRs Mediate a Metabolic Switch Required for Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell* 16, 547–555.
- Kilens, S., Meistermann, D., Moreno, D., Chariou, C., Gaignerie, A., Reignier, A., Lelièvre, Y., Casanova, M., Vallot, C., Nedellec, S., et al. (2018). Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells. *Nat Commun* 9, 360.
- Kim, M., and Benayoun, B.A. (2020). The microbiome: An emerging key player in aging and longevity. *Translational Medicine of Aging* 4, 103–116.
- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., et al. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472–476.
- Kim, J., Wu, H.-H., Lander, A.D., Lyons, K.M., Matzuk, M.M., and Calof, A.L. (2005). GDF11 Controls the Timing of Progenitor Cell Competence in Developing Retina. *Science* 308, 1927–1930.
- Kiss, T., Tarantini, S., Csipo, T., Balasubramanian, P., Nyúl-Tóth, Á., Yabluchanskiy, A., Wren, J.D., Garman, L., Huffman, D.M., Csiszar, A., et al. (2020). Circulating anti-geronic factors from heterochronic parabionts promote vascular rejuvenation in aged mice: transcriptional footprint of mitochondrial protection, attenuation of oxidative stress, and rescue of endothelial function by young blood. *Geroscience* 42, 727–748.
- Knupp, D., and Miura, P. (2018). CircRNA accumulation: A new hallmark of aging? *Mechanisms of Ageing and Development* 173, 71–79.
- Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Hamanaka, S., Kato-Itoh, M., Yamazaki, Y., Ibata, M., Sato, H., Lee, Y.-S., Usui, J.-I., Knisely, A.S., et al. (2010). Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 142, 787–799.
- Kobayashi, Y., Okada, Y., Itakura, G., Iwai, H., Nishimura, S., Yasuda, A., Nori, S., Hikishima, K., Konomi, T., Fujiyoshi, K., et al. (2012). Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS ONE* 7, e52787.
- Koch, C.M., and Wagner, W. (2011). Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging (Albany NY)* 3, 1018–1027.

- Koeth, R.A., Wang, Z., Levison, B.S., Buffa, J.A., Org, E., Sheehy, B.T., Britt, E.B., Fu, X., Wu, Y., Li, L., et al. (2013). Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 19, 576–585.
- Kondoh, H., Lleonart, M.E., Nakashima, Y., Yokode, M., Tanaka, M., Bernard, D., Gil, J., and Beach, D. (2007). A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxid Redox Signal* 9, 293–299.
- Kreienkamp, R., and Gonzalo, S. (2020). Metabolic Dysfunction in Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *Cells* 9, 395.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev* 24, 2463–2479.
- Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., et al. (1997). Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390, 45–51.
- Laine, J., Küntzle, G., Obata, T., Sha, M., and Noguchi, M. (2000). The protooncogene *TCL1* is an Akt kinase coactivator. *Mol Cell* 6, 395–407.
- Lakowski, B., and Hekimi, S. (1998). The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13091–13096.
- Lambert, S.A., Jolma, A., Campitelli, L.F., Das, P.K., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T.R., and Weirauch, M.T. (2018). The Human Transcription Factors. *Cell* 172, 650–665.
- Lamming, D.W., Ye, L., Katajisto, P., Goncalves, M.D., Saitoh, M., Stevens, D.M., Davis, J.G., Salmon, A.B., Richardson, A., Ahima, R.S., et al. (2012). Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* 335, 1638–1643.
- Lange, K.H.W., Andersen, J.L., Beyer, N., Isaksson, F., Larsson, B., Rasmussen, M.H., Juul, A., Bülow, J., and Kjaer, M. (2002). GH administration changes myosin heavy chain isoforms in skeletal muscle but does not augment muscle strength or hypertrophy, either alone or combined with resistance exercise training in healthy elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 513–523.
- Lapasset, L., Milhavel, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Ait-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.-M., De Vos, J., et al. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes & Development* 25, 2248–2253.
- Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274–293.
- Le Bourg, E., Minois, N., Bullens, P., and Baret, P. (2000). A mild stress due to hypergravity exposure at young age increases longevity in *Drosophila melanogaster* males. *Biogerontology* 1, 145–155.
- Learoyd, P. (2012). The history of blood transfusion prior to the 20th century. *Transfus Med* 22, 308–314.
- Lee, I.H., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D.B., Liu, J., Bruns, N.E., Tsokos, M., Alt, F.W., and Finkel, T. (2008). A role for the NAD-dependent deacetylase *Sirt1* in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3374–3379.
- Lee, J.-S., Kim, B.S., Seo, D., Park, J.H., and Cho, D.-W. (2017). Three-Dimensional Cell Printing of Large-Volume Tissues: Application to Ear Regeneration. *Tissue Eng Part C Methods* 23, 136–145.
- Lee, M., Im, W., and Kim, M. (2021). Exosomes as a potential messenger unit during heterochronic parabiosis for amelioration of Huntington’s disease. *Neurobiol Dis* 155, 105374.
- Lee, S., Huh, J.Y., Turner, D.M., Lee, S., Robinson, J., Stein, J.E., Shim, S.H., Hong, C.P., Kang, M.S., Nakagawa, M., et al. (2018). Repurposing the Cord Blood Bank for Haplobanking of HLA-Homozygous iPSCs and Their Usefulness to Multiple Populations. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 36, 1552–1566.
- Lehallier, B., Gate, D., Schaum, N., Nanasi, T., Lee, S.E., Yousef, H., Losada, P.M., Berdnik, D., Keller, A., Verghese, J., et al. (2019). Undulating changes in human plasma proteome profiles across the lifespan. *Nat Med* 25, 1843–1850.
- Lemmer, A., Van-Wagner, L.B., and Ganger, D. (2018). Assessment of Advanced Liver Fibrosis and the Risk for Hepatic Decompensation in Patients with Congestive Hepatopathy. *Hepatology* 68, 1633–1641.

- Lenain, C., Gussyatiner, O., Douma, S., van den Broek, B., and Peeper, D.S. (2015). Autophagy-mediated degradation of nuclear envelope proteins during oncogene-induced senescence. *Carcinogenesis* 36, 1263–1274.
- Leontieva, O.V., and Blagosklonny, M.V. (2010). DNA damaging agents and p53 do not cause senescence in quiescent cells, while consecutive re-activation of mTOR is associated with conversion to senescence. *Aging (Albany NY)* 2, 924–935.
- Leulier, F., MacNeil, L.T., Lee, W., Rawls, J.F., Cani, P.D., Schwarzer, M., Zhao, L., and Simpson, S.J. (2017). Integrative Physiology: At the Crossroads of Nutrition, Microbiota, Animal Physiology, and Human Health. *Cell Metabolism* 25, 522–534.
- Levine, A.J. (2020). p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat Rev Cancer* 20, 471–480.
- Levine, B., and Kroemer, G. (2019). Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* 176, 11–42.
- Levine, M.E., Lu, A.T., Quach, A., Chen, B.H., Assimes, T.L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A.A., Stewart, J.D., Li, Y., et al. (2018). An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY)* 10, 573–591.
- Lewis-McDougall, F.C., Ruchaya, P.J., Domenjo-Vila, E., Shin Teoh, T., Prata, L., Cottle, B.J., Clark, J.E., Punjabi, P.P., Awad, W., Torella, D., et al. (2019). Aged-senescent cells contribute to impaired heart regeneration. *Aging Cell* 18, e12931.
- Li, E., and Zhang, Y. (2014). DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a019133.
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Cañamero, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2009a). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPSC cell reprogramming. *Nature* 460, 1136–1139.
- Li, H., Lu, A., Gao, X., Tang, Y., Ravuri, S., Wang, B., and Huard, J. (2021). Improved Bone Quality and Bone Healing of Dystrophic Mice by Parabiosis. *Metabolites* 11, 247.
- Li, H.L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., Tanaka, M., Amano, N., Watanabe, A., Sakurai, H., et al. (2015). Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports* 4, 143–154.
- Li, J., Zhang, C.-X., Liu, Y.-M., Chen, K.-L., and Chen, G. (2017). A comparative study of anti-aging properties and mechanism: resveratrol and caloric restriction. *Oncotarget* 8, 65717–65729.
- Li, L., Zhao, Q., and Kong, W. (2018). Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biology* 68–69, 490–506.
- Li, M., Wang, B., Zhang, M., Rantalainen, M., Wang, S., Zhou, H., Zhang, Y., Shen, J., Pang, X., Zhang, M., et al. (2008). Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *PNAS* 105, 2117–2122.
- Li, W., Zhou, H., Abujarour, R., Zhu, S., Young Joo, J., Lin, T., Hao, E., Schöler, H.R., Hayek, A., and Ding, S. (2009b). Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cells* 27, 2992–3000.
- Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H.J., Yoder, M.C., and Chan, R.J. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 105, 635–637.
- Liang, Q., Monetti, C., Shutova, M.V., Neely, E.J., Hacibekiroglu, S., Yang, H., Kim, C., Zhang, P., Li, C., Nagy, K., et al. (2018). Linking a cell-division gene and a suicide gene to define and improve cell therapy safety. *Nature* 563, 701–704.
- Liu, A., Guo, E., Yang, J., Yang, Y., Liu, S., Jiang, X., Hu, Q., Dirsch, O., Dahmen, U., Zhang, C., et al. (2018a). Young plasma reverses age-dependent alterations in hepatic function through the restoration of autophagy. *Aging Cell* 17.
- Liu, G.-H., Barkho, B.Z., Ruiz, S., Diep, D., Qu, J., Yang, S.-L., Panopoulos, A.D., Suzuki, K., Kurian, L., Walsh, C., et al. (2011). Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 472, 221–225.

- Liu, H., Bravata, D.M., Olkin, I., Nayak, S., Roberts, B., Garber, A.M., and Hoffman, A.R. (2007). Systematic review: the safety and efficacy of growth hormone in the healthy elderly. *Ann Intern Med* 146, 104–115.
- Liu, J., Wang, L., Wang, Z., and Liu, J.-P. (2019a). Roles of Telomere Biology in Cell Senescence, Replicative and Chronological Ageing. *Cells* 8.
- Liu, M., Wilk, S.A., Wang, A., Zhou, L., Wang, R.-H., Ogawa, W., Deng, C., Dong, L.Q., and Liu, F. (2010). Resveratrol inhibits mTOR signaling by promoting the interaction between mTOR and DEPTOR. *J Biol Chem* 285, 36387–36394.
- Liu, T., Pang, Y., Zhou, Z., Yao, R., and Sun, W. (2019b). An integrated cell printing system for the construction of heterogeneous tissue models. *Acta Biomaterialia* 95, 245–257.
- Liu, W., Zhou, L., Zhou, C., Zhang, S., Jing, J., Xie, L., Sun, N., Duan, X., Jing, W., Liang, X., et al. (2016). GDF11 decreases bone mass by stimulating osteoclastogenesis and inhibiting osteoblast differentiation. *Nat Commun* 7, 12794.
- Liu, Z., Cai, Y., Wang, Y., Nie, Y., Zhang, C., Xu, Y., Zhang, X., Lu, Y., Wang, Z., Poo, M., et al. (2018b). Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell* 172, 881–887.e7.
- Lloyd, D., Aon, M.A., and Cortassa, S. (2001). Why homeodynamics, not homeostasis? *ScientificWorldJournal* 1, 133–145.
- Loffredo, F.S., Steinhauser, M.L., Jay, S.M., Gannon, J., Pancoast, J.R., Yalamanchi, P., Sinha, M., Dall’Osso, C., Khong, D., Shadrach, J.L., et al. (2013). Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell* 153, 828–839.
- Long, C., Li, H., Tiburcy, M., Rodriguez-Caycedo, C., Kyrychenko, V., Zhou, H., Zhang, Y., Min, Y.-L., Shelton, J.M., Mammen, P.P.A., et al. (2018). Correction of diverse muscular dystrophy mutations in human engineered heart muscle by single-site genome editing. *Sci Adv* 4, eaap9004.
- Longo, V.D. (2009). Linking sirtuins, IGF-I signaling, and starvation. *Exp Gerontol* 44, 70–74.
- Loomba, R., Seguritan, V., Li, W., Long, T., Klitgord, N., Bhatt, A., Dulai, P.S., Caussy, C., Bettencourt, R., Highlander, S.K., et al. (2017). Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metabolism* 25, 1054–1062.e5.
- Lopez-Mejia, I.C., de Toledo, M., Chavey, C., Lapasset, L., Cavelier, P., Lopez-Herrera, C., Chebli, K., Fort, P., Beranger, G., Fajas, L., et al. (2014). Antagonistic functions of LMNA isoforms in energy expenditure and lifespan. *EMBO Rep* 15, 529–539.
- López-Otín, C., and Kroemer, G. (2021). Hallmarks of Health. *Cell* 184, 33–63.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217.
- Lu, A., Guo, P., Wang, L., Tseng, C., Huard, M., Allen, C., McCarrick-Walmsley, R., Whitney, K.E., and Huard, J. (2020a). Heterogenetic parabiosis between healthy and dystrophic mice improve the histopathology in muscular dystrophy. *Sci Rep* 10, 7075.
- Lu, A.T., Quach, A., Wilson, J.G., Reiner, A.P., Aviv, A., Raj, K., Hou, L., Baccarelli, A.A., Li, Y., Stewart, J.D., et al. (2019a). DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY)* 11, 303–327.
- Lu, A.T., Seeboth, A., Tsai, P.-C., Sun, D., Quach, A., Reiner, A.P., Kooperberg, C., Ferrucci, L., Hou, L., Baccarelli, A.A., et al. (2019b). DNA methylation-based estimator of telomere length. *Aging (Albany NY)* 11, 5895–5923.
- Lu, Y., Brommer, B., Tian, X., Krishnan, A., Meer, M., Wang, C., Vera, D.L., Zeng, Q., Yu, D., Bonkowski, M.S., et al. (2020b). Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature* 588, 124–129.
- Luni, C., Giulitti, S., Serena, E., Ferrari, L., Zambon, A., Gagliano, O., Giobbe, G.G., Michielin, F., Knöbel, S., Bosio, A., et al. (2016). High-efficiency cellular reprogramming with microfluidics. *Nature Methods* 13, 446–452.
- Lyssiotis, C.A., Foreman, R.K., Staerk, J., Garcia, M., Mathur, D., Markoulaki, S., Hanna, J., Lairson, L.L., Charette, B.D., Bouchez, L.C., et al. (2009). Reprogramming of murine fibroblasts to induced

- pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8912–8917.
- Ma, Y., and Fang, M. (2013). Immunosenescence and age-related viral diseases. *Sci China Life Sci* 56, 399–405.
- Ma, T., Li, J., Xu, Y., Yu, C., Xu, T., Wang, H., Liu, K., Cao, N., Nie, B., Zhu, S., et al. (2015). Atg5-independent autophagy regulates mitochondrial clearance and is essential for iPSC reprogramming. *Nat Cell Biol* 17, 1379–1387.
- MacLennan, A., Lester, S., and Moore, V. (2001). Oral oestrogen replacement therapy versus placebo for hot flushes. *Cochrane Database Syst Rev* CD002978.
- Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Hofer, S.J., and Kroemer, G. (2019). Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Cell Metabolism* 29, 592–610.
- Mah, N., Wang, Y., Liao, M.-C., Prigione, A., Jozefczuk, J., Lichtner, B., Wolfrum, K., Haltmeier, M., Flöttmann, M., Schaefer, M., et al. (2011). Molecular insights into reprogramming-initiation events mediated by the OSKM gene regulatory network. *PLoS One* 6, e24351.
- Maherali, N., and Hochedlinger, K. (2009). Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 19, 1718–1723.
- Mahmoudi, S., Mancini, E., Xu, L., Moore, A., Jahanbani, F., Hebestreit, K., Srinivasan, R., Li, X., Devarajan, K., Prélôt, L., et al. (2019). Heterogeneity in old fibroblasts is linked to variability in reprogramming and wound healing. *Nature* 574, 553–558.
- Mair, W., Morantte, I., Rodrigues, A.P.C., Manning, G., Montminy, M., Shaw, R.J., and Dillin, A. (2011). Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTC-1 and CREB. *Nature* 470, 404–408.
- Mallon, B.S., Park, K.-Y., Chen, K.G., Hamilton, R.S., and McKay, R.D.G. (2006). Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1063–1075.
- Man, K., Loudon, A., and Chawla, A. (2016). Immunity around the clock. *Science* 354, 999–1003.
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., et al. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 376, 1038–1046.
- Mandolesi, L., Polverino, A., Montuori, S., Foti, F., Ferraioli, G., Sorrentino, P., and Sorrentino, G. (2018). Effects of Physical Exercise on Cognitive Functioning and Wellbeing: Biological and Psychological Benefits. *Front Psychol* 9, 509.
- Marín, D., Martín, M., and Sabater, B. (2009). Entropy decrease associated to solute compartmentalization in the cell. *Biosystems* 98, 31–36.
- Marión, R.M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPSC cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149–1153.
- Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). Telomeres Acquire Embryonic Stem Cell Characteristics in Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 4, 141–154.
- Marosi, K., Bori, Z., Hart, N., Sárga, L., Koltai, E., Radák, Z., and Nyakas, C. (2012). Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. *Neuroscience* 226, 21–28.
- Martin, C.K., Bhapkar, M., Pittas, A.G., Pieper, C.F., Das, S.K., Williamson, D.A., Scott, T., Redman, L.M., Stein, R., Gilhooly, C.H., et al. (2016). Effect of Calorie Restriction on Mood, Quality of Life, Sleep, and Sexual Function in Healthy Nonobese Adults: The CALERIE 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Internal Medicine* 176, 743–752.
- Martínez, P., and Blasco, M.A. (2017). Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. *J Cell Biol* 216, 875–887.
- Masoro, E.J. (2000). Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 35, 299–305.
- Mathieu, J., and Ruohola-Baker, H. (2017). Metabolic remodeling during the loss and acquisition of pluripotency. *Development* 144, 541–551.

- Mathieu, J., Zhou, W., Xing, Y., Sperber, H., Ferreccio, A., Agoston, Z., Kuppusamy, K.T., Moon, R.T., and Ruohola-Baker, H. (2014). Hypoxia-inducible factors have distinct and stage-specific roles during reprogramming of human cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 14, 592–605.
- Matsumoto, R., Suga, H., Aoi, T., Bando, H., Fukuoka, H., Iguchi, G., Narumi, S., Hasegawa, T., Muguruma, K., Ogawa, W., et al. (2020). Congenital pituitary hypoplasia model demonstrates hypothalamic OTX2 regulation of pituitary progenitor cells. *J Clin Invest* 130, 641–654.
- Mattison, J.A., Colman, R.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Kemnitz, J.W., Roth, G.S., Ingram, D.K., Weindruch, R., de Cabo, R., and Anderson, R.M. (2017). Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat Commun* 8, 14063.
- McCay, C.M., Crowell, M.F., and Maynard, L.A. (1935). The Effect of Retarded Growth Upon the Length of Life Span and Upon the Ultimate Body Size: One Figure. *The Journal of Nutrition* 10, 63–79.
- McClintock, D., Ratner, D., Lokuge, M., Owens, D.M., Gordon, L.B., Collins, F.S., and Djabali, K. (2007). The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin. *PLoS One* 2, e1269.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. (1999). Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat Genet* 22, 260–264.
- M.D, S.K. (2021). Targeting Cellular Senescence With Senolytics to Improve Skeletal Health in Older Humans: A Phase 2, Single-Center, 20-week, Open-Label, Randomized Controlled Trial. (clinicaltrials.gov).
- Medina, C.B., Mehrotra, P., Arandjelovic, S., Perry, J.S.A., Guo, Y., Morioka, S., Barron, B., Walk, S.F., Ghesquière, B., Krupnick, A.S., et al. (2020). Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers. *Nature* 580, 130–135.
- Meléndez, A., Tallóczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.-L., Hall, D.H., and Levine, B. (2003). Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301, 1387–1391.
- Menendez, J.A., Vellon, L., Oliveras-Ferreros, C., Cufí, S., and Vazquez-Martin, A. (2011). mTOR-regulated senescence and autophagy during reprogramming of somatic cells to pluripotency: a roadmap from energy metabolism to stem cell renewal and aging. *Cell Cycle* 10, 3658–3677.
- Menni, C., Kastenmüller, G., Petersen, A.K., Bell, J.T., Psatha, M., Tsai, P.-C., Gieger, C., Schulz, H., Erte, I., John, S., et al. (2013). Metabolomic markers reveal novel pathways of ageing and early development in human populations. *Int J Epidemiol* 42, 1111–1119.
- Merriam, G.R., Buchner, D.M., Prinz, P.N., Schwartz, R.S., and Vitiello, M.V. (1997). Potential applications of GH secretagogues in the evaluation and treatment of the age-related decline in growth hormone secretion. *Endocrine* 7, 49–52.
- Mianné, J., Ahmed, E., Bourguignon, C., Fieldes, M., Vachier, I., Bourdin, A., Assou, S., and De Vos, J. (2018). Induced Pluripotent Stem Cells for Primary Ciliary Dyskinesia Modeling and Personalized Medicine. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 59, 672–683.
- Middeldorp, J., Lehallier, B., Villeda, S.A., Miedema, S.S.M., Evans, E., Czirr, E., Zhang, H., Luo, J., Stan, T., Mosher, K.I., et al. (2016). Preclinical Assessment of Young Blood Plasma for Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* 73, 1325–1333.
- Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49–55.
- Miljkovic, N., Lim, J.-Y., Miljkovic, I., and Frontera, W.R. (2015). Aging of Skeletal Muscle Fibers. *Ann Rehabil Med* 39, 155–162.
- Miller, A.J., Dye, B.R., Ferrer-Torres, D., Hill, D.R., Overeem, A.W., Shea, L.D., and Spence, J.R. (2019). Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc* 14, 518–540.
- Mills, K.F., Yoshida, S., Stein, L.R., Grozio, A., Kubota, S., Sasaki, Y., Redpath, P., Migaud, M.E., Apte, R.S., Uchida, K., et al. (2016). Long-Term Administration of Nicotinamide Mononucleotide Mitigates Age-Associated Physiological Decline in Mice. *Cell Metabolism* 24, 795–806.

- Minois, N. (2000). Longevity and aging: beneficial effects of exposure to mild stress. *Biogerontology* 1, 15–29.
- Mitchell, S.J., Bernier, M., Aon, M.A., Cortassa, S., Kim, E.Y., Fang, E.F., Palacios, H.H., Ali, A., Navas-Enamorado, I., Di Francesco, A., et al. (2018). Nicotinamide Improves Aspects of Healthspan, but Not Lifespan, in Mice. *Cell Metab* 27, 667–676.e4.
- Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D.L., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F., et al. (2011). Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 8, 633–638.
- Mizushima, N., and Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* 12, 823–830.
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., and Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell* 7, 150–161.
- Moncsek, A., Al-Suraih, M.S., Trussoni, C.E., O’Hara, S.P., Splinter, P.L., Zuber, C., Patsenker, E., Valli, P.V., Fingas, C.D., Weber, A., et al. (2018). Targeting senescent cholangiocytes and activated fibroblasts with B-cell lymphoma-extra large inhibitors ameliorates fibrosis in multidrug resistance 2 gene knockout (Mdr2^{-/-}) mice. *Hepatology* 67, 247–259.
- Morimoto, R.I. (2020). Cell-Nonautonomous Regulation of Proteostasis in Aging and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12, a034074.
- Morioka, S., Maueröder, C., and Ravichandran, K.S. (2019). Living on the Edge: Efferocytosis at the Interface of Homeostasis and Pathology. *Immunity* 50, 1149–1162.
- Morizur, L., Herardot, E., Monville, C., and Ben M’Barek, K. (2020). Human pluripotent stem cells: A toolbox to understand and treat retinal degeneration. *Molecular and Cellular Neuroscience* 107, 103523.
- Morris, B.J., Willcox, D.C., Donlon, T.A., and Willcox, B.J. (2015). FOXO3: A Major Gene for Human Longevity - A Mini-Review. *GER* 61, 515–525.
- Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marión, R.M., Chondronasiou, D., Rovira, M., Fernandez-Marcos, P.J., Muñoz-Martin, M., Blanco-Aparicio, C., Pastor, J., et al. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* 354.
- Mouchiroud, L., Houtkooper, R.H., Moullan, N., Katsyuba, E., Ryu, D., Cantó, C., Mottis, A., Jo, Y.-S., Viswanathan, M., Schoonjans, K., et al. (2013). The NAD⁺/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. *Cell* 154, 430–441.
- Muftuoglu, M., Oshima, J., von Kobbe, C., Cheng, W.-H., Leistriz, D.F., and Bohr, V.A. (2008). The clinical characteristics of Werner syndrome: molecular and biochemical diagnosis. *Hum Genet* 124, 369–377.
- Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh, K., Kitzman, D.W., Kushugulova, A., Marotta, F., and Yadav, H. (2018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutrition and Healthy Aging* 4, 267–285.
- Nastase, M.V., Zeng-Brouwers, J., Wygrecka, M., and Schaefer, L. (2018). Targeting renal fibrosis: Mechanisms and drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 129, 295–307.
- Newman, J.C., and Verdin, E. (2017). β -Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite. *Annu Rev Nutr* 37, 51–76.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379–391.
- Nielsen, E.R., Eskildsen-Helmond, Y.E.G., and Rattan, S.I.S. (2006). MAP kinases and heat shock-induced hormesis in human fibroblasts during serial passaging in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1067, 343–348.
- Nishimura, K., Sano, M., Ohtaka, M., Furuta, B., Umemura, Y., Nakajima, Y., Ikehara, Y., Kobayashi, T., Segawa, H., Takayasu, S., et al. (2011). Development of Defective and Persistent Sendai Virus Vector. *J Biol Chem* 286, 4760–4771.

- Nishimura, K., Aizawa, S., Nugroho, F.L., Shiomitsu, E., Tran, Y.T.H., Bui, P.L., Borisova, E., Sakuragi, Y., Takada, H., Kurisaki, A., et al. (2017). A Role for KLF4 in Promoting the Metabolic Shift via TCL1 during Induced Pluripotent Stem Cell Generation. *Stem Cell Reports* 8, 787–801.
- Nishimura, K., Ishiwata, H., Sakuragi, Y., Hayashi, Y., Fukuda, A., and Hisatake, K. (2019). Live-cell imaging of subcellular structures for quantitative evaluation of pluripotent stem cells. *Sci Rep* 9, 1777.
- Nishimura, T., Suchy, F.P., Bhadury, J., Igarashi, K.J., Charlesworth, C.T., and Nakauchi, H. (2021). Generation of Functional Organs Using a Cell-Competitive Niche in Intra- and Inter-species Rodent Chimeras. *Cell Stem Cell* 28, 141-149.e3.
- Nishinakamura, R. (2019). Human kidney organoids: progress and remaining challenges. *Nature Reviews Nephrology* 15, 613–624.
- Niwa, H. (2011). Wnt: what's needed to maintain pluripotency? *Nat Cell Biol* 13, 1024–1026.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24, 372–376.
- Noble, R.L. (1977). The development of prostatic adenocarcinoma in Nb rats following prolonged sex hormone administration. *Cancer Res* 37, 1929–1933.
- Nørgaard, R., Kassem, M., and Rattan, S.I.S. (2006). Heat shock-induced enhancement of osteoblastic differentiation of hTERT-immortalized mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 1067, 443–447.
- Nori, S., Okada, Y., Yasuda, A., Tsuji, O., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Fujiyoshi, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Ikeda, E., et al. (2011). Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 16825–16830.
- Novais, E.J., Tran, V.A., Johnston, S.N., Darris, K.R., Roupas, A.J., Sessions, G.A., Shapiro, I.M., Diekman, B.O., and Risbud, M.V. (2021). Long-term treatment with senolytic drugs Dasatinib and Quercetin ameliorates age-dependent intervertebral disc degeneration in mice. *Nat Commun* 12, 5213.
- Nugraha, B., Buono, M.F., Boehmer, L. von, Hoerstrup, S.P., and Emmert, M.Y. (2019). Human Cardiac Organoids for Disease Modeling. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 105, 79–85.
- Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., Li, M., Lam, D., Kurita, M., Beyret, E., et al. (2016). In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell* 167, 1719-1733.e12.
- Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonja, T., Tiniakos, D., Wilson, C.L., Lahat, A., Day, C.P., Burt, A., Palmer, A., Anstee, Q.M., et al. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun* 8, 15691.
- Oh, S.P., Yeo, C.-Y., Lee, Y., Schrewe, H., Whitman, M., and Li, E. (2002). Activin type IIA and IIB receptors mediate Gdf11 signaling in axial vertebral patterning. *Genes Dev* 16, 2749–2754.
- Ohnishi, K., Semi, K., Yamamoto, T., Shimizu, M., Tanaka, A., Mitsunaga, K., Okita, K., Osafune, K., Arioka, Y., Maeda, T., et al. (2014). Premature Termination of Reprogramming In Vivo Leads to Cancer Development through Altered Epigenetic Regulation. *Cell* 156, 663–677.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949–953.
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., et al. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8, 409–412.
- Olova, N., Simpson, D.J., Marioni, R.E., and Chandra, T. (2019). Partial reprogramming induces a steady decline in epigenetic age before loss of somatic identity. *Aging Cell* 18, e12877.
- Osorio, F.G., Navarro, C.L., Cadiñanos, J., López-Mejía, I.C., Quirós, P.M., Bartoli, C., Rivera, J., Tazi, J., Guzmán, G., Varela, I., et al. (2011a). Splicing-Directed Therapy in a New Mouse Model of Human Accelerated Aging. *Science Translational Medicine* 3, 106ra107-106ra107.

- Osorio, F.G., Navarro, C.L., Cadiñanos, J., López-Mejía, I.C., Quirós, P.M., Bartoli, C., Rivera, J., Tazi, J., Guzmán, G., Varela, I., et al. (2011b). Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci Transl Med* 3, 106ra107.
- Owen, O.E., Reichard, G.A., Patel, M.S., and Boden, G. (1979). Energy Metabolism in Feasting and Fasting. In *Hormones and Energy Metabolism*, D.M. Klachko, R.R. Anderson, and M. Heimberg, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 169–188.
- Ozemek, C., Laddu, D.R., Lavie, C.J., Claeys, H., Kaminsky, L.A., Ross, R., Wisloff, U., Arena, R., and Blair, S.N. (2018). An Update on the Role of Cardiorespiratory Fitness, Structured Exercise and Lifestyle Physical Activity in Preventing Cardiovascular Disease and Health Risk. *Prog Cardiovasc Dis* 61, 484–490.
- Ozone, C., Suga, H., Eiraku, M., Kadoshima, T., Yonemura, S., Takata, N., Oiso, Y., Tsuji, T., and Sasai, Y. (2016). Functional anterior pituitary generated in self-organizing culture of human embryonic stem cells. *Nat Commun* 7, 10351.
- Paik, D.T., Chandy, M., and Wu, J.C. (2020). Patient and Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells for Discovery of Personalized Cardiovascular Drugs and Therapeutics. *Pharmacol. Rev.* 72, 320–342.
- Palacio, L., Goyer, M.-L., Maggiorani, D., Espinosa, A., Villeneuve, N., Bourbonnais, S., Moquin-Beaudry, G., Le, O., Demaria, M., Davalos, A.R., et al. (2019). Restored immune cell functions upon clearance of senescence in the irradiated splenic environment. *Aging Cell* 18, e12971.
- Palm, W., and de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 42, 301–334.
- Palmer, A.K., Xu, M., Zhu, Y., Pirtskhalava, T., Weivoda, M.M., Hachfeld, C.M., Prata, L.G., van Dijk, T.H., Verkade, E., Casalang-Verzosa, G., et al. (2019). Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. *Aging Cell* 18, e12950.
- Pan, G., and Thomson, J.A. (2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 17, 42–49.
- Pandey, K.K., Madhry, D., Ravi Kumar, Y.S., Malvankar, S., Sapra, L., Srivastava, R.K., Bhattacharyya, S., and Verma, B. (2021). Regulatory roles of tRNA-derived RNA fragments in human pathophysiology. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 26, 161–173.
- Panopoulos, A.D., Yanes, O., Ruiz, S., Kida, Y.S., Diep, D., Tautenhahn, R., Herrerías, A., Batchelder, E.M., Plongthongkum, N., Lutz, M., et al. (2012). The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res* 22, 168–177.
- Papadakis, E.D., Nicklin, S.A., Baker, A.H., and White, S.J. (2004). Promoters and control elements: designing expression cassettes for gene therapy. *Curr Gene Ther* 4, 89–113.
- Papadakis, M.A., Grady, D., Black, D., Tierney, M.J., Gooding, G.A., Schambelan, M., and Grunfeld, C. (1996). Growth hormone replacement in healthy older men improves body composition but not functional ability. *Ann Intern Med* 124, 708–716.
- Papadopoulos, C., Kravic, B., and Meyer, H. (2020). Repair or Lysophagy: Dealing with Damaged Lysosomes. *J Mol Biol* 432, 231–239.
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem (iPS) cells. *Cell* 134, 877–886.
- Park, S.-J., Lee, S.A., Prasain, N., Bae, D., Kang, H., Ha, T., Kim, J.S., Hong, K.-S., Mantel, C., Moon, S.-H., et al. (2017). Metabolome Profiling of Partial and Fully Reprogrammed Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev* 26, 734–742.
- Partch, C.L., Green, C.B., and Takahashi, J.S. (2014). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol* 24, 90–99.
- Pelletier, A.L., Rojas-Roldan, L., and Coffin, J. (2016). Vision Loss in Older Adults. *AFP* 94, 219–226.
- Pérez Martínez, G., Bäuerl, C., and Collado, M.C. (2014). Understanding gut microbiota in elderly's health will enable intervention through probiotics. *Benef Microbes* 5, 235–246.

- Perkhofer, L., Frappart, P.-O., Müller, M., and Kleger, A. (2018). Importance of organoids for personalized medicine. *Personalized Medicine* 15, 461–465.
- Pesl, M., Acimovic, I., Pribyl, J., Hezova, R., Vilotic, A., Fauconnier, J., Vrbsky, J., Kruzliak, P., Skladal, P., Kara, T., et al. (2014). Forced aggregation and defined factors allow highly uniform-sized embryoid bodies and functional cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Heart Vessels* 29, 834–846.
- Petrova, N.V., Velichko, A.K., Razin, S.V., and Kantidze, O.L. (2016). Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell* 15, 999–1017.
- Pison, G. (2019). Pourquoi l'espérance de vie augmente-t-elle moins vite en France ? *Population Societes* N° 564, 1–4.
- Pohl, C., and Dikic, I. (2019). Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science* 366, 818–822.
- Pollycove, M., and Feinendegen, L.E. (2003). Radiation-induced versus endogenous DNA damage: possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage. *Hum Exp Toxicol* 22, 290–306; discussion 307, 315–317, 319–323.
- Powers, E.T., Morimoto, R.I., Dillin, A., Kelly, J.W., and Balch, W.E. (2009). Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 959–991.
- Prieto, J., León, M., Ponsoda, X., Sendra, R., Bort, R., Ferrer-Lorente, R., Raya, A., López-García, C., and Torres, J. (2016). Early ERK1/2 activation promotes DRP1-dependent mitochondrial fission necessary for cell reprogramming. *Nat Commun* 7, 11124.
- Prieto, J., Seo, A.Y., León, M., Santacatterina, F., Torresano, L., Palomino-Schätzlein, M., Giménez, K., Vallet-Sánchez, A., Ponsoda, X., Pineda-Lucena, A., et al. (2018). MYC Induces a Hybrid Energetics Program Early in Cell Reprogramming. *Stem Cell Reports* 11, 1479–1492.
- Prieur, A., and Peeper, D.S. (2008). Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 20, 150–155.
- Prigione, A., Fauler, B., Lurz, R., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2010). The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 28, 721–733.
- Prigione, A., Hossini, A.M., Lichtner, B., Serin, A., Fauler, B., Megges, M., Lurz, R., Lehrach, H., Makrantonaki, E., Zouboulis, C.C., et al. (2011). Mitochondrial-associated cell death mechanisms are reset to an embryonic-like state in aged donor-derived iPS cells harboring chromosomal aberrations. *PLoS One* 6, e27352.
- Prigione, A., Rohwer, N., Hoffmann, S., Mlody, B., Drews, K., Bukowiecki, R., Blümlein, K., Wanker, E.E., Ralser, M., Cramer, T., et al. (2014). HIF1 α modulates cell fate reprogramming through early glycolytic shift and upregulation of PDK1-3 and PKM2. *Stem Cells* 32, 364–376.
- Qian, L., Huang, Y., Spencer, C.I., Foley, A., Vedantham, V., Liu, L., Conway, S.J., Fu, J., and Srivastava, D. (2012). In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 485, 593–598.
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., et al. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55–60.
- Qin, Y., Xiao, L., Zhan, X.B., and Zhou, H.X. (2015). Pdx1 and its role in activating Ngn3 and Pax6 to induce differentiation of iPSCs into islet β cells. *Genet. Mol. Res.* 14, 8892–8900.
- Quiros, P.M., Goyal, A., Jha, P., and Auwerx, J. (2017). Analysis of mtDNA/nDNA ratio in mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 7, 47–54.
- Radak, Z., Chung, H.Y., Koltai, E., Taylor, A.W., and Goto, S. (2008). Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Research Reviews* 7, 34–42.
- Radak, Z., Torma, F., Berkes, I., Goto, S., Mimura, T., Posa, A., Balogh, L., Boldogh, I., Suzuki, K., Higuchi, M., et al. (2019). Exercise effects on physiological function during aging. *Free Radical Biology and Medicine* 132, 33–41.

- Rai, R., Ghosh, A.K., Eren, M., Mackie, A.R., Levine, D.C., Kim, S.-Y., Cedernaes, J., Ramirez, V., Procissi, D., Smith, L.H., et al. (2017). Downregulation of the Apelinergic Axis Accelerates Aging, whereas Its Systemic Restoration Improves the Mammalian Healthspan. *Cell Rep* 21, 1471–1480.
- Rampelli, S., Candela, M., Turrioni, S., Biagi, E., Collino, S., Franceschi, C., O'Toole, P.W., and Brigidi, P. (2013). Functional metagenomic profiling of intestinal microbiome in extreme ageing. *Ageing (Albany NY)* 5, 902–912.
- Rattan, S.I. (1998). Repeated mild heat shock delays ageing in cultured human skin fibroblasts. *Biochem Mol Biol Int* 45, 753–759.
- Rattan, S.I.S., Fernandes, R.A., Demirovic, D., Dymek, B., and Lima, C.F. (2008). Heat Stress and Hormetin-Induced Hormesis in Human Cells: Effects on Aging, Wound Healing, Angiogenesis, and Differentiation. *Dose Response* 7, 90–103.
- Rauch, C., Feifel, E., Kern, G., Murphy, C., Meier, F., Parson, W., Beilmann, M., Jennings, P., Gstraunthaler, G., and Wilmes, A. (2018). Differentiation of human iPSCs into functional podocytes. *PLoS ONE* 13, e0203869.
- Rebo, J., Mehdipour, M., Gathwala, R., Causey, K., Liu, Y., Conboy, M.J., and Conboy, I.M. (2016). A single heterochronic blood exchange reveals rapid inhibition of multiple tissues by old blood. *Nat Commun* 7, 13363.
- Rebuzzini, P., Zuccotti, M., Redi, C.A., and Garagna, S. (2016). Achilles' heel of pluripotent stem cells: genetic, genomic and epigenetic variations during prolonged culture. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2453–2466.
- Redman, L.M., Smith, S.R., Burton, J.H., Martin, C.K., Il'yasova, D., and Ravussin, E. (2018). Metabolic Slowing and Reduced Oxidative Damage with Sustained Caloric Restriction Support the Rate of Living and Oxidative Damage Theories of Aging. *Cell Metabolism* 27, 805-815.e4.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435, 948–953.
- Ren, R., Ocampo, A., Liu, G.-H., and Izpisua Belmonte, J.C. (2017). Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics. *Cell Metab* 26, 460–474.
- Ring, K.L., Tong, L.M., Balestra, M.E., Javier, R., Andrews-Zwilling, Y., Li, G., Walker, D., Zhang, W.R., Kreitzer, A.C., and Huang, Y. (2012). Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell* 11, 100–109.
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C.G., and Salazar, N. (2016). Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in Microbiology* 7, 185.
- Ristow, M., and Schmeisser, S. (2011). Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 51, 327–336.
- Robinson, A.M., and Williamson, D.H. (1980). Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev* 60, 143–187.
- Rocchi, A., Yamamoto, S., Ting, T., Fan, Y., Sadleir, K., Wang, Y., Zhang, W., Huang, S., Levine, B., Vassar, R., et al. (2017). A *Becn1* mutation mediates hyperactive autophagic sequestration of amyloid oligomers and improved cognition in Alzheimer's disease. *PLoS Genetics* 13, e1006962.
- Rochette, L., Mazini, L., Meloux, A., Zeller, M., Cottin, Y., Vergely, C., and Malka, G. (2020). Anti-Aging Effects of GDF11 on Skin. *Int J Mol Sci* 21, 2598.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434, 113–118.
- Rodríguez-Matellán, A., Alcazar, N., Hernández, F., Serrano, M., and Ávila, J. (2020). In Vivo Reprogramming Ameliorates Aging Features in Dentate Gyrus Cells and Improves Memory in Mice. *Stem Cell Reports* 15, 1056–1066.
- Rondanelli, M., Giacosa, A., Faliva, M.A., Perna, S., Allieri, F., and Castellazzi, A.M. (2015). Review on microbiota and effectiveness of probiotics use in older. *World J Clin Cases* 3, 156–162.

- Roos, C.M., Zhang, B., Palmer, A.K., Ogrodnik, M.B., Pirtskhalava, T., Thalji, N.M., Hagler, M., Jurk, D., Smith, L.A., Casacang-Verzosa, G., et al. (2016). Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell* 15, 973–977.
- Rosano, G.M.C., Vitale, C., Marazzi, G., and Volterrani, M. (2007). Menopause and cardiovascular disease: the evidence. *Climacteric* 10, 19–24.
- Roshan, S., Nader, S., and Orlander, P. (1999). Review: Ageing and hormones. *Eur J Clin Invest* 29, 210–213.
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., et al. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321–333.
- Roux, A., Zhang, C., Paw, J., Zavala-Solorio, J., Vijay, T., Kolumam, G., Kenyon, C., and Kimmel, J.C. (2021). Partial reprogramming restores youthful gene expression through transient suppression of cell identity.
- Ruben, M.D., Wu, G., Smith, D.F., Schmidt, R.E., Francey, L.J., Lee, Y.Y., Anafi, R.C., and Hogenesch, J.B. (2018). A database of tissue-specific rhythmically expressed human genes has potential applications in circadian medicine. *Sci Transl Med* 10, eaat8806.
- Rubinsztein, D.C., Mariño, G., and Kroemer, G. (2011). Autophagy and Aging. *Cell* 146, 682–695.
- Rutkowski, K., Sowa, P., Rutkowska-Talipska, J., Kuryliszyn-Moskal, A., and Rutkowski, R. (2014). Dehydroepiandrosterone (DHEA): Hypes and Hopes. *Drugs* 74, 1195–1207.
- Ryan, M.C., Stucky, M., Wakefield, C., Melott, J.M., Akbani, R., Weinstein, J.N., and Broom, B.M. (2020). Interactive Clustered Heat Map Builder: An easy web-based tool for creating sophisticated clustered heat maps. *F1000Res* 8, ISCB Comm J-1750.
- Ryu, D., Mouchiroud, L., Andreux, P.A., Katsyuba, E., Moullan, N., Nicolet-Dit-Félix, A.A., Williams, E.G., Jha, P., Lo Sasso, G., Huzard, D., et al. (2016). Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nat Med* 22, 879–888.
- Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F.L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A.J., Walkey, C., et al. (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470, 359–365.
- Salminen, A., Kaarniranta, K., and Kauppinen, A. (2012). Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. 10.
- Salmon, A.B. (2015). About-face on the metabolic side effects of rapamycin. *Oncotarget* 6, 2585–2586.
- Sandre-Giovannoli, A.D., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C.L., Munnich, A., Merrer, M.L., et al. (2003). Lamin A Truncation in Hutchinson–Gilford Progeria. *Science* 300, 2055–2055.
- Sarkar, T.J., Quarta, M., Mukherjee, S., Colville, A., Paine, P., Doan, L., Tran, C.M., Chu, C.R., Horvath, S., Qi, L.S., et al. (2020). Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nat Commun* 11, 1545.
- Savic, S., Caseley, E.A., and McDermott, M.F. (2020). Moving towards a systems-based classification of innate immune-mediated diseases. *Nat Rev Rheumatol* 16, 222–237.
- Schafer, M.J., White, T.A., Iijima, K., Haak, A.J., Ligresti, G., Atkinson, E.J., Oberg, A.L., Birch, J., Salmonowicz, H., Zhu, Y., et al. (2017). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* 8, 14532.
- Schneuwly, S., Klemenz, R., and Gehring, W.J. (1987). Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*. *Nature* 325, 816–818.
- Schroeder, B.O., and Bäckhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med* 22, 1079–1089.
- Schultz, M.B., and Sinclair, D.A. (2016). When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development* 143, 3–14.
- Schwarz, E.R., Phan, A., and Willix, R.D. (2011). Andropause and the development of cardiovascular disease presentation—more than an epi-phenomenon. *J Geriatr Cardiol* 8, 35–43.

- Sellami, M., Gasmi, M., Denham, J., Hayes, L.D., Stratton, D., Padulo, J., and Bragazzi, N. (2018). Effects of Acute and Chronic Exercise on Immunological Parameters in the Elderly Aged: Can Physical Activity Counteract the Effects of Aging? *Front Immunol* 9, 2187.
- Selman, C., Tullet, J.M.A., Wieser, D., Irvine, E., Lingard, S.J., Choudhury, A.I., Claret, M., Al-Qassab, H., Carmignac, D., Ramadani, F., et al. (2009). Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science* 326, 140–144.
- Sen, P., Shah, P.P., Nativio, R., and Berger, S.L. (2016). Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell* 166, 822–839.
- Senís, E., Mosteiro, L., Wilkening, S., Wiedtke, E., Nowrouzi, A., Afzal, S., Fronza, R., Landerer, H., Abad, M., Niopek, D., et al. (2018). AAVvector-mediated in vivo reprogramming into pluripotency. *Nature Communications* 9, 2651.
- Serra, D., Mayr, U., Boni, A., Lukonin, I., Rempfler, M., Challet Meylan, L., Stadler, M.B., Strnad, P., Papasaikas, P., Vischi, D., et al. (2019). Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development. *Nature* 569, 66–72.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593–602.
- Seto, Y., and Eiraku, M. (2019). Human brain development and its in vitro recapitulation. *Neuroscience Research* 138, 33–42.
- Sharma, A., Burridge, P.W., McKeithan, W.L., Serrano, R., Shukla, P., Sayed, N., Churko, J.M., Kitani, T., Wu, H., Holmström, A., et al. (2017). High-throughput screening of tyrosine kinase inhibitor cardiotoxicity with human induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* 9.
- Sharma, A., McKeithan, W.L., Serrano, R., Kitani, T., Burridge, P.W., Del Álamo, J.C., Mercola, M., and Wu, J.C. (2018). Use of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to assess drug cardiotoxicity. *Nat Protoc* 13, 3018–3041.
- Sharma, S., Singla, N., Chadha, V.D., and Dhawan, D.K. (2019). A concept of radiation hormesis: stimulation of antioxidant machinery in rats by low dose ionizing radiation. *Hell J Nucl Med* 22, 43–48.
- Shi, Y., and Liu, J.-P. (2011). Gdf11 facilitates temporal progression of neurogenesis in the developing spinal cord. *J Neurosci* 31, 883–893.
- Shi, Y., Do, J.T., Despons, C., Hahm, H.S., Schöler, H.R., and Ding, S. (2008a). A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 525–528.
- Shi, Y., Despons, C., Do, J.T., Hahm, H.S., Schöler, H.R., and Ding, S. (2008b). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* 3, 568–574.
- Shiloh, Y., and Lederman, H.M. (2017). Ataxia-telangiectasia (A-T): An emerging dimension of premature ageing. *Ageing Res Rev* 33, 76–88.
- Shimazu, T., Hirschey, M.D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., Grueter, C.A., Lim, H., Saunders, L.R., Stevens, R.D., et al. (2013). Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339, 211–214.
- Shpilka, T., and Haynes, C.M. (2018). The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 109–120.
- Shyh-Chang, N., Daley, G.Q., and Cantley, L.C. (2013). Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* 140, 2535–2547.
- Shytikov, D., Balva, O., Debonneuil, E., Glukhovskiy, P., and Pishel, I. (2014). Aged Mice Repeatedly Injected with Plasma from Young Mice: A Survival Study. *Biores Open Access* 3, 226–232.
- Sidler, C., Kovalchuk, O., and Kovalchuk, I. (2017). Epigenetic Regulation of Cellular Senescence and Aging. *Front Genet* 8, 138.
- Sierra-Ramirez, A., López-Aceituno, J.L., Costa-Machado, L.F., Plaza, A., Barradas, M., and Fernandez-Marcos, P.J. (2020). Transient metabolic improvement in obese mice treated with navitoclax or dasatinib/quercetin. *Aging (Albany NY)* 12, 11337–11348.

- Sinha, I., Sinha-Hikim, A.P., Wagers, A.J., and Sinha-Hikim, I. (2014a). Testosterone is essential for skeletal muscle growth in aged mice in a heterochronic parabiosis model. *Cell Tissue Res* 357, 815–821.
- Sinha, M., Jang, Y.C., Oh, J., Khong, D., Wu, E.Y., Manohar, R., Miller, C., Regalado, S.G., Loffredo, F.S., Pancoast, J.R., et al. (2014b). Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science* 344, 649–652.
- Sivandzade, F., Prasad, S., Bhalariao, A., and Cucullo, L. (2019). NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. *Redox Biol* 21, 101059.
- Smith, L.K., He, Y., Park, J.-S., Bieri, G., Snethlage, C.E., Lin, K., Gontier, G., Wabl, R., Plambeck, K.E., Udeochu, J., et al. (2015). β 2-microglobulin is a systemic pro-aging factor that impairs cognitive function and neurogenesis. *Nat Med* 21, 932–937.
- Solanas, G., Peixoto, F.O., Perdiguero, E., Jardí, M., Ruiz-Bonilla, V., Datta, D., Symeonidi, A., Castellanos, A., Welz, P.-S., Caballero, J.M., et al. (2017). Aged Stem Cells Reprogram Their Daily Rhythmic Functions to Adapt to Stress. *Cell* 170, 678-692.e20.
- Song, B., Smink, A.M., Jones, C.V., Callaghan, J.M., Firth, S.D., Bernard, C.A., Laslett, A.L., Kerr, P.G., and Ricardo, S.D. (2012). The directed differentiation of human iPS cells into kidney podocytes. *PLoS ONE* 7, e46453.
- Song, Y.M., Lee, W.K., Lee, Y.-H., Kang, E.S., Cha, B.-S., and Lee, B.-W. (2016). Metformin Restores Parkin-Mediated Mitophagy, Suppressed by Cytosolic p53. *Int J Mol Sci* 17, E122.
- Sonntag, K.-C., Song, B., Lee, N., Jung, J.H., Cha, Y., Leblanc, P., Neff, C., Kong, S.W., Carter, B.S., Schweitzer, J., et al. (2018). Pluripotent stem cell-based therapy for Parkinson's disease: Current status and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 168, 1–20.
- Soto-Gamez, A., and Demaria, M. (2017). Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discov Today* 22, 786–795.
- Sousa-Victor, P., Gutarra, S., García-Prat, L., Rodríguez-Ubreva, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Jardí, M., Ballestar, E., González, S., Serrano, A.L., et al. (2014). Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* 506, 316–321.
- St. Jude Children's Research Hospital (2021). SEN-SURVIVORS: An Open-Label Intervention Trial to Reduce Senescence and Improve Frailty in Adult Survivors of Childhood Cancer (clinicaltrials.gov).
- Stadhouders, R., Filion, G.J., and Graf, T. (2019). Transcription factors and 3D genome conformation in cell-fate decisions. *Nature* 569, 345–354.
- Stadtfeld, M., and Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 24, 2239–2263.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945–949.
- Suchy, F., and Nakauchi, H. (2018). Interspecies chimeras. *Current Opinion in Genetics & Development* 52, 36–41.
- Suchy, F., Yamaguchi, T., and Nakauchi, H. (2018). iPSC-Derived Organs In Vivo: Challenges and Promise. *Cell Stem Cell* 22, 21–24.
- Suda, M., Shimizu, I., Katsuumi, G., Yoshida, Y., Hayashi, Y., Ikegami, R., Matsumoto, N., Yoshida, Y., Mikawa, R., Katayama, A., et al. (2021). Senolytic vaccination improves normal and pathological age-related phenotypes and increases lifespan in progeroid mice. *Nat Aging* 1, 1117–1126.
- Suhr, S.T., Chang, E.A., Tjong, J., Alcasid, N., Perkins, G.A., Goissis, M.D., Ellisman, M.H., Perez, G.I., and Cibelli, J.B. (2010). Mitochondrial rejuvenation after induced pluripotency. *PLoS ONE* 5, e14095.
- Sun, J., Shen, X., Liu, H., Lu, S., Peng, J., and Kuang, H. (2021). Caloric restriction in female reproduction: is it beneficial or detrimental? *Reproductive Biology and Endocrinology* 19, 1.

- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanaudomchai, H., et al. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153, 1228–1238.
- Takahashi, T. (2019). Organoids for Drug Discovery and Personalized Medicine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 59, 447–462.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.
- Takehita, H., Yamamoto, K., Nozato, S., Inagaki, T., Tsuchimochi, H., Shirai, M., Yamamoto, R., Imaizumi, Y., Hongyo, K., Yokoyama, S., et al. (2017). Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male mice. *Sci Rep* 7, 42323.
- Tan, R.S., and Pu, S.J. (2001). The andropause and memory loss: is there a link between androgen decline and dementia in the aging male? *Asian J Androl* 3, 169–174.
- Tanaka, T., Biancotto, A., Moaddel, R., Moore, A.Z., Gonzalez-Freire, M., Aon, M.A., Candia, J., Zhang, P., Cheung, F., Fantoni, G., et al. (2018). Plasma proteomic signature of age in healthy humans. *Aging Cell* 17, e12799.
- Tapia, P.C. (2006). Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: “Mitohormesis” for health and vitality. *Medical Hypotheses* 66, 832–843.
- Teichman, E.M., O’Riordan, K.J., Gahan, C.G.M., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2020). When Rhythms Meet the Blues: Circadian Interactions with the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Cell Metab* 31, 448–471.
- Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D.G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196–199.
- Thaiss, C.A., Zmora, N., Levy, M., and Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. *Nature* 535, 65–74.
- The University of Texas Health Science Center at San Antonio (2021). Pilot Study to Investigate the Safety and Feasibility of Senolytic Therapy to Modulate Progression of Alzheimer’s Disease (SToMP-AD) (clinicaltrials.gov).
- Theunissen, T.W., Friedli, M., He, Y., Planet, E., O’Neil, R.C., Markoulaki, S., Pontis, J., Wang, H., Iouranova, A., Imbeault, M., et al. (2016). Molecular Criteria for Defining the Naive Human Pluripotent State. *Cell Stem Cell* 19, 502–515.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 139, 871–890.
- Thijssen, D.H.J., Redington, A., George, K.P., Hopman, M.T.E., and Jones, H. (2018). Association of Exercise Preconditioning With Immediate Cardioprotection: A Review. *JAMA Cardiol* 3, 169–176.
- Thornton, P.L., Ingram, R.L., and Sonntag, W.E. (2000). Chronic [D-Ala2]-growth hormone-releasing hormone administration attenuates age-related deficits in spatial memory. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55, B106-112.
- Tomiyama, A.J. (2019). Stress and Obesity. *Annual Review of Psychology* 70, 703–718.
- Tosca, L., Feraud, O., Magniez, A., Bas, C., Griscelli, F., Bennaceur-Griscelli, A., and Tachdjian, G. (2015). Genomic instability of human embryonic stem cell lines using different passaging culture methods. *Mol Cytogenet* 8, 30.
- Toussaint, O., Medrano, E.E., and von Zglinicki, T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology* 35, 927–945.
- Toussaint, O., Royer, V., Salmon, M., and Remacle, J. (2002). Stress-induced premature senescence and tissue ageing. *Biochemical Pharmacology* 64, 1007–1009.

- Trayhurn, P., and Beattie, J.H. (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60, 329–339.
- Trichopoulou, A., and Lagiou, P. (1997). Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutr Rev* 55, 383–389.
- Trott, A.J., and Menet, J.S. (2018). Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1. *PLOS Genetics* 14, e1007156.
- Tsialikas, J., and Romer-Seibert, J. (2015). LIN28: roles and regulation in development and beyond. *Development* 142, 2397–2404.
- Tsurumi, A., and Li, W. (2012). Global heterochromatin loss. *Epigenetics* 7, 680–688.
- Turkson, S., Kloster, A., Hamilton, P.J., and Neigh, G.N. (2019). Neuroendocrine Drivers of Risk and Resilience: The Influence of Metabolism & Mitochondria. *Front Neuroendocrinol* 54, 100770.
- Turner, J.E. (2016). Is immunosenescence influenced by our lifetime “dose” of exercise? *Biogerontology* 17, 581–602.
- Turner, K.J., Vasu, V., and Griffin, D.K. (2019). Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells* 8.
- Usui, J., Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Knisely, A.S., Nishinakamura, R., and Nakauchi, H. (2012). Generation of Kidney from Pluripotent Stem Cells via Blastocyst Complementation. *The American Journal of Pathology* 180, 2417–2426.
- Utikal, J., Polo, J.M., Stadtfeld, M., Maherali, N., Kulalert, W., Walsh, R.M., Khalil, A., Rheinwald, J.G., and Hochedlinger, K. (2009). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 460, 1145–1148.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033.
- Varum, S., Rodrigues, A.S., Moura, M.B., Momcilovic, O., Easley, C.A., Ramalho-Santos, J., Van Houten, B., and Schatten, G. (2011). Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One* 6, e20914.
- Verbeke, P., Clark, B.F., and Rattan, S.I. (2001). Reduced levels of oxidized and glycosylated proteins in human fibroblasts exposed to repeated mild heat shock during serial passaging in vitro. *Free Radic Biol Med* 31, 1593–1602.
- Verbeke, P., Deries, M., Clark, B.F.C., and Rattan, S.I.S. (2002). Hormetic action of mild heat stress decreases the inducibility of protein oxidation and glycosylation in human fibroblasts. *Biogerontology* 3, 117–120.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Südhof, T.C., and Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035–1041.
- Villareal, D.T., Fontana, L., Weiss, E.P., Racette, S.B., Steger-May, K., Schechtman, K.B., Klein, S., and Holloszy, J.O. (2006). Bone Mineral Density Response to Caloric Restriction–Induced Weight Loss or Exercise-Induced Weight Loss: A Randomized Controlled Trial. *Archives of Internal Medicine* 166, 2502–2510.
- Villareal, D.T., Fontana, L., Das, S.K., Redman, L., Smith, S.R., Saltzman, E., Bales, C., Rochon, J., Pieper, C., Huang, M., et al. (2016). Effect of Two-Year Caloric Restriction on Bone Metabolism and Bone Mineral Density in Non-Obese Younger Adults: A Randomized Clinical Trial. *J Bone Miner Res* 31, 40–51.
- Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T.M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., et al. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477, 90–94.
- Villeda, S.A., Plambeck, K.E., Middeldorp, J., Castellano, J.M., Mosher, K.I., Luo, J., Smith, L.K., Bieri, G., Lin, K., Berdnik, D., et al. (2014). Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med* 20, 659–663.
- Vinel, C., Lukjanenko, L., Batut, A., Deleruyelle, S., Pradère, J.-P., Le Gonidec, S., Dortignac, A., Geoffre, N., Pereira, O., Karaz, S., et al. (2018). The exerkin apelin reverses age-associated sarcopenia. *Nat Med* 24, 1360–1371.

- Vitale, G., Pellegrino, G., Vollery, M., and Hofland, L.J. (2019). ROLE of IGF-1 System in the Modulation of Longevity: Controversies and New Insights From a Centenarians' Perspective. *Front. Endocrinol.* 0.
- Vitiello, M.V., Moe, K.E., Merriam, G.R., Mazzoni, G., Buchner, D.H., and Schwartz, R.S. (2006). Growth hormone releasing hormone improves the cognition of healthy older adults. *Neurobiol Aging* 27, 318–323.
- Waddington, C.H. (1942). The epigenotype. *Nature* 563–565.
- Waddington, C.H. (1958). The Strategy of the Genes. *AIBS Bulletin* 8, 49.
- Wahlström, A., Sayin, S.I., Marschall, H.-U., and Bäckhed, F. (2016). Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metabolism* 24, 41–50.
- Wake Forest University Health Sciences (2020). Targeted Removal of Pro-Inflammatory Cells: An Open Label Human Pilot Study in Idiopathic Pulmonary Fibrosis (clinicaltrials.gov).
- Walter, P., and Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081–1086.
- Wang, K., and Klionsky, D.J. (2011). Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy* 7, 297–300.
- Wang, R., and Holsinger, R.M.D. (2018). Exercise-induced brain-derived neurotrophic factor expression: Therapeutic implications for Alzheimer's dementia. *Ageing Res Rev* 48, 109–121.
- Wang, Y., and Pessin, J.E. (2013). Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16, 243–250.
- Wang, C., Rabadan Ros, R., Martinez-Redondo, P., Ma, Z., Shi, L., Xue, Y., Guillen-Guillen, I., Huang, L., Hishida, T., Liao, H.-K., et al. (2021). In vivo partial reprogramming of myofibers promotes muscle regeneration by remodeling the stem cell niche. *Nat Commun* 12, 3094.
- Wang, J., Hao, J., Bai, D., Gu, Q., Han, W., Wang, L., Tan, Y., Li, X., Xue, K., Han, P., et al. (2015). Generation of clinical-grade human induced pluripotent stem cells in Xeno-free conditions. *Stem Cell Res Ther* 6, 223.
- Wang, S., Xia, P., Ye, B., Huang, G., Liu, J., and Fan, Z. (2013). Transient activation of autophagy via Sox2-mediated suppression of mTOR is an important early step in reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell* 13, 617–625.
- Wang, Y., Liang, Y., and Vanhoutte, P.M. (2011). SIRT1 and AMPK in regulating mammalian senescence: a critical review and a working model. *FEBS Lett* 585, 986–994.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–630.
- Weidenheim, K.M., Dickson, D.W., and Rapin, I. (2009). Neuropathology of Cockayne syndrome: Evidence for impaired development, premature aging, and neurodegeneration. *Mechanisms of Ageing and Development* 130, 619–636.
- Weidner, C.I., Lin, Q., Koch, C.M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., Bauerschlag, D.O., Jöckel, K.-H., Erbel, R., Mühleisen, T.W., et al. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol* 15, R24.
- Weindruch, R., Walford, R.L., Fligiel, S., and Guthrie, D. (1986). The Retardation of Aging in Mice by Dietary Restriction: Longevity, Cancer, Immunity and Lifetime Energy Intake. *The Journal of Nutrition* 116, 641–654.
- Weismann, August (1915). *The Germ-plasm: a theory of heredity*. Translated by W. Newton Parker and Harriet Rönnfeldt. (New York:Scribner).
- Westholm, J.O., Miura, P., Olson, S., Shenker, S., Joseph, B., Sanfilippo, P., Celniker, S.E., Graveley, B.R., and Lai, E.C. (2014). Genome-wide Analysis of *Drosophila* Circular RNAs Reveals Their Structural and Sequence Properties and Age-Dependent Neural Accumulation. *Cell Reports* 9, 1966–1980.
- Willyard, C. (2018). Unlocking the secrets of scar-free skin healing. *Nature* 563, S86–S88.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813.

- Wissler Gerdes, E.O., Zhu, Y., Tchkonina, T., and Kirkland, J.L. (2020). Discovery, development, and future application of senolytics: theories and predictions. *The FEBS Journal* 287, 2418–2427.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., et al. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766–770.
- World Health Organization Disability-adjusted life years (DALYs).
- Wu, J., and Izpisua Belmonte, J.C. (2016). Stem Cells: A Renaissance in Human Biology Research. *Cell* 165, 1572–1585.
- Wu, H.-H., Ivkovic, S., Murray, R.C., Jaramillo, S., Lyons, K.M., Johnson, J.E., and Calof, A.L. (2003). Autoregulation of neurogenesis by GDF11. *Neuron* 37, 197–207.
- Wu, J., Platero-Luengo, A., Sakurai, M., Sugawara, A., Gil, M.A., Yamauchi, T., Suzuki, K., Bogliotti, Y.S., Cuello, C., Morales Valencia, M., et al. (2017). Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell* 168, 473–486.e15.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* 124, 471–484.
- Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J.N., Weigand, B.M., Palmer, A.K., Weivoda, M.M., Inman, C.L., Ogrodnik, M.B., Hachfeld, C.M., Fraser, D.G., et al. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* 24, 1246–1256.
- Yakubov, E., Rechavi, G., Rozenblatt, S., and Givol, D. (2010). Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 189–193.
- Yamada, M., Johannesson, B., Sagi, I., Burnett, L.C., Kort, D.H., Prosser, R.W., Paull, D., Nestor, M.W., Freeby, M., Greenberg, E., et al. (2014). Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature* 510, 533–536.
- Yamaguchi, T., Sato, H., Kato-Itoh, M., Goto, T., Hara, H., Sanbo, M., Mizuno, N., Kobayashi, T., Yanagida, A., Umino, A., et al. (2017). Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nature* 542, 191–196.
- Yamanaka, S. (2020). Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* 27, 523–531.
- Yang, J.-B., Wang, Y.-H., Yang, W., Lu, F.-T., Ma, H.-D., Zhao, Z.-B., Jia, Y.-J., Tang, W., Tsuneyama, K., Ridgway, W.M., et al. (2016a). Successful treatment of murine autoimmune cholangitis by parabiosis: Implications for hematopoietic therapy. *J Autoimmun* 66, 108–117.
- Yang, Y.R., Kabir, M.H., Park, J.H., Park, J.-I., Kang, J.S., Ju, S., Shin, Y.J., Lee, S.M., Lee, J., Kim, S., et al. (2020). Plasma proteomic profiling of young and old mice reveals cadherin-13 prevents age-related bone loss. *Aging (Albany NY)* 12, 8652–8668.
- Yang, Z., Wong, A., Kuh, D., Paul, D.S., Rakyanc, V.K., Leslie, R.D., Zheng, S.C., Widschwendter, M., Beck, S., and Teschendorff, A.E. (2016b). Correlation of an epigenetic mitotic clock with cancer risk. *Genome Biol* 17, 205.
- Yin, Y.-B., de Jonge, H.R., Wu, X., and Yin, Y.-L. (2019). Mini-gut: a promising model for drug development. *Drug Discovery Today* 24, 1784–1794.
- Yoder, M.C. (2015). Differentiation of pluripotent stem cells into endothelial cells. *Curr. Opin. Hematol.* 22, 252–257.
- Yokouchi, Y., Suzuki, S., Ohtsuki, N., Yamamoto, K., Noguchi, S., Soejima, Y., Goto, M., Ishioka, K., Nakamura, I., Suzuki, S., et al. (2020). Rapid repair of human disease-specific single-nucleotide variants by One-SHOT genome editing. *Sci Rep* 10.
- Yoshida, M., Satoh, A., Lin, J.B., Mills, K.F., Sasaki, Y., Rensing, N., Wong, M., Apte, R.S., and Imai, S.-I. (2019). Extracellular Vesicle-Contained eNAMPT Delays Aging and Extends Lifespan in Mice. *Cell Metab* 30, 329–342.e5.
- Yoshino, J., Mills, K.F., Yoon, M.J., and Imai, S. (2011). Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab* 14, 528–536.

- Youn, A., and Wang, S. (2018). The MiAge Calculator: a DNA methylation-based mitotic age calculator of human tissue types. *Epigenetics* 13, 192–206.
- Young, V.B., and Hayden, M.K. (2016). Environmental management in the gut: fecal transplantation to restore the intestinal ecosystem. *Infect Dis (Lond)* 48, 593–595.
- Yousefzadeh, M.J., Wilkinson, J.E., Hughes, B., Gadela, N., Ladiges, W.C., Vo, N., Niedernhofer, L.J., Huffman, D.M., and Robbins, P.D. (2020). Heterochronic parabiosis regulates the extent of cellular senescence in multiple tissues. *Geroscience* 42, 951–961.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318, 1917–1920.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797–801.
- Yu, Y., Liang, D., Tian, Q., Chen, X., Jiang, B., Chou, B.-K., Hu, P., Cheng, L., Gao, P., Li, J., et al. (2014). Stimulation of somatic cell reprogramming by ERas-Akt-FoxO1 signaling axis. *Stem Cells* 32, 349–363.
- Yuan, Y., Li, J., He, Z., Fan, X., Mao, X., Yang, M., and Yang, D. (2021). tRNA-derived fragments as New Hallmarks of Aging and Age-related Diseases. *Aging and Disease* 12, 1304–1322.
- Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., and Bradley, A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 6, 363–369.
- Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Parys-Proszek, A., Makowska, Ż., Pałeczka, A., Kucharczyk, K., Płoski, R., and Branicki, W. (2015). Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Science International: Genetics* 17, 173–179.
- Zhang, J., Lian, Q., Zhu, G., Zhou, F., Sui, L., Tan, C., Mutalif, R.A., Navasankari, R., Zhang, Y., Tse, H.-F., et al. (2011). A Human iPSC Model of Hutchinson Gilford Progeria Reveals Vascular Smooth Muscle and Mesenchymal Stem Cell Defects. *Cell Stem Cell* 8, 31–45.
- Zhang, J., Khvorostov, I., Hong, J.S., Oktay, Y., Vergnes, L., Nuebel, E., Wahjudi, P.N., Setoguchi, K., Wang, G., Do, A., et al. (2016). UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells. *EMBO J* 35, 899.
- Zhang, K., Chou, C.-K., Xia, X., Hung, M.-C., and Qin, L. (2014). Block-Cell-Printing for live single-cell printing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 2948–2953.
- Zhang, Q., Vallerga, C.L., Walker, R.M., Lin, T., Henders, A.K., Montgomery, G.W., He, J., Fan, D., Fowdar, J., Kennedy, M., et al. (2019). Improved precision of epigenetic clock estimates across tissues and its implication for biological ageing. *Genome Medicine* 11, 54.
- Zhang, W., Li, J., Suzuki, K., Qu, J., Wang, P., Zhou, J., Liu, X., Ren, R., Xu, X., Ocampo, A., et al. (2015). A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging. *Science* 348, 1160–1163.
- Zhang, Y., Wilson, R., Heiss, J., Breitling, L.P., Saum, K.-U., Schöttker, B., Holleczeck, B., Waldenberger, M., Peters, A., and Brenner, H. (2017). DNA methylation signatures in peripheral blood strongly predict all-cause mortality. *Nat Commun* 8, 14617.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381–384.
- Zhou, W., Choi, M., Margineantu, D., Margaretha, L., Hesson, J., Cavanaugh, C., Blau, C.A., Horwitz, M.S., Hockenbery, D., Ware, C., et al. (2012). HIF1 α induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. *EMBO J* 31, 2103–2116.
- Zhou, X., Franklin, R.A., Adler, M., Jacox, J.B., Bailis, W., Shyer, J.A., Flavell, R.A., Mayo, A., Alon, U., and Medzhitov, R. (2018). Circuit Design Features of a Stable Two-Cell System. *Cell* 172, 744–757.e17.

- Zhu, S., Li, W., Zhou, H., Wei, W., Ambasadhan, R., Lin, T., Kim, J., Zhang, K., and Ding, S. (2010). Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell* 7, 651–655.
- Zhu, Y., Tchkonina, T., Pirtskhalava, T., Gower, A.C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A.K., Ikeno, Y., Hubbard, G.B., Lenburg, M., et al. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14, 644–658.
- Zitvogel, L., Dailière, R., Roberti, M.P., Routy, B., and Kroemer, G. (2017). Anticancer effects of the microbiome and its products. *Nat Rev Microbiol* 15, 465–478.

8 ANNEXES

Annexe 1

Alle Q, Le Borgne E, Milhavet O, Lemaitre J-M. Reprogramming : Emerging Strategies to Rejuvenate Aging Cells and Tissues. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(8):3990. <https://doi.org/10.3390/ijms22083990>



Review

Reprogramming: Emerging Strategies to Rejuvenate Aging Cells and Tissues

Quentin Alle ^{1,†}, Enora Le Borgne ^{1,†}, Ollivier Milhavel ^{2,*} and Jean-Marc Lemaitre ^{1,*}

¹ IRMB, University of Montpellier, INSERM, 34295 Montpellier, France; quentin.alle@inserm.fr (Q.A.); enora.le-borgne@inserm.fr (E.L.B.)

² IRMB, University of Montpellier, INSERM, CNRS, 34295 Montpellier, France

* Correspondence: ollivier.milhavel@inserm.fr (O.M.); jean-marc.lemaitre@inserm.fr (J.-M.L.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Aging is associated with a progressive and functional decline of all tissues and a striking increase in many “age-related diseases”. Although aging has long been considered an inevitable process, strategies to delay and potentially even reverse the aging process have recently been developed. Here, we review emerging rejuvenation strategies that are based on reprogramming toward pluripotency. Some of these approaches may eventually lead to medical applications to improve healthspan and longevity.

Keywords: aging; senescence; epigenetics; stem cells; reprogramming; iPSC



Citation: Alle, Q.; Le Borgne, E.; Milhavel, O.; Lemaitre, J.-M. Reprogramming: Emerging Strategies to Rejuvenate Aging Cells and Tissues. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3990. <https://doi.org/10.3390/ijms22083990>

Academic Editor: Manuela Malatesta

Received: 1 February 2021

Accepted: 6 April 2021

Published: 13 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

As we age, we become increasingly vulnerable to age-related diseases. The progressive aging of the population makes this issue one of, if not the, major current scientific concern in the field of medicine. Aging is an intricate process that increases the likelihood of cancer, cardiovascular disorders, diabetes, atherosclerosis, neurodegeneration and age-related macular degeneration. The regenerative capacity of cells and tissues diminishes over time and they thus become vulnerable to age-related malfunctions that can precipitate death. Developing prophylactic strategies to increase the duration of healthy life and promote healthy aging is challenging, as the mechanisms causing aging are poorly understood, even if great progress has been made from studying naturally occurring or accelerated-aging phenomena. We now know that aging inculcates many changes, or ‘hallmarks’: genomic instability, telomere shortening, epigenetic alterations, loss of proteostasis, cellular senescence, mitochondrial dysfunction, deregulated nutrient sensing, altered intercellular communication, and stem cell compromise and exhaustion [1].

These various hallmarks of aging are all active fields of molecular mechanistic study with much promise but relatively few tangible results have been translated into therapy.

Perhaps the most effective strategies so far have been those that focus on the removal of senescent cells with ‘senolytic’ drugs [2,3]. In some ways, however, we feel this is too focused on the symptoms of aging whereas perhaps the most promising strategy for the future would be to focus on the causes of aging and its corollary, the rejuvenative capacity of stem cells.

Simply expressing four transcription factors, OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC (OSKM), converts somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs) [4]. Reprogramming occurs through a global remodeling of the epigenetic landscape that ultimately reverts the cell to a pluripotent embryonic-like state, with properties similar to embryonic stem cells (ESCs). This cellular reprogramming allows us to imagine cell therapies that restore organ and tissue function. Indeed, by reprogramming a somatic cell, from a donor into iPSCs, these cells can then be modified or corrected before redifferentiation, to produce ‘rejuvenated’ cells, tissues or organs, for replacement in the same donor or an immune-compatible person. In recent years, emerging results have led to new ideas demonstrating

that the mechanics of cellular reprogramming can be used to reduce the deleterious effects of aging and to delay these effects by increasing regenerative capacity, either at the cellular or the whole-organism level.

In this review, then, we focus on emerging strategies that aim to rejuvenate cells or tissues based on stem cells, with an emphasis on cell reprogramming approaches that promise new routes for everyone to enjoy prolonged healthspan and lifespan.

2. Understanding the Aging Process

Aging brings increasing frailty. There are two major phases during aging. The first phase is healthy aging, where minor alterations accumulate. Then there is a second phase, so-called pathological aging, in which chronic clinical diseases and disabilities predominate and impair physiological functions [5].

The problems facing our aging population can be studied with a new demographic metric, the Healthy Life Years (HLY) or ‘disability-free life expectancy’ [6], which is defined by the European Statistical Office as the average number of years one can expect to live in the absence of these disorders, within the life expectancy and for a given age.

2.1. Age-Associated Pathologies

Deterioration of body functions with age is the main risk factor for major human pathologies and therefore the main factor limiting HLY. Moreover, since advanced age is the common causal influence, these chronic disorders often occur concurrently, as comorbidities, in the elderly [1,5]. Among these major pathologies are cancer, most commonly lung, breast, prostate, and colorectal cancers, and cardiovascular disorders including chronic ischemic heart disease, congestive heart failure, and arrhythmia. The latter two heart diseases are now the two leading causes of death [7,8]. Age-related diseases affecting the skeletal system are also common, particularly osteoarthritis and osteoporosis. Another disease that increases greatly with age is the muscular degeneration known as sarcopenia. Metabolic disorders such as diabetes and non-alcoholic hepatic steatosis also become more common with age [9]. Organ and tissue fibrosis, a pathological process characterized by inflammatory injury and excessive fibrous connective tissue production [10], also increases during aging and acts as one of the primary causes for age-related deterioration of human organs, including the lungs [11], kidneys [12], liver [13] and heart [14]. Lymphoid organs, such as the spleen, also undergo a structural loss of integrity in the elderly. Global deterioration of the immune system increases susceptibility to infectious diseases and reduces the response to vaccination [15]. This has been widely illustrated lately by age-related mortality from COVID-19. Finally, there are neurodegenerative diseases, such as Alzheimer’s disease, Parkinson’s, and Huntington’s disease and sensorial failures such as auditory and macular degeneration that all increase significantly in the aged [16–18].

The progressive functional and physiological decline of any living organism, leading inevitably to death, is the progressive accumulation of molecular and cellular damage occurring throughout its life.

Thus, aging is not a disease in itself but rather a biological process whose multiple causes and consequences add up and overlap.

2.2. Cellular Damage at the Heart of Aging

For decades, a large number of studies aimed at understanding the adverse effects of aging were carried out on a wide range of model organisms. In 2013, López-Otín et al. compiled much of this knowledge and referenced nine general hallmarks of aging in living organisms [1]. These hallmarks of aging affect the organism at different scales. Some occur at the molecular level within cells, while others impact tissues and even beyond, at the level of an organ or the entire organism. These elements were classified according to three important criteria. First, each hallmark must occur naturally during physiological aging. In addition, the experimental deterioration of each mark must accelerate aging, while, conversely, the experimental improvement of each mark must slow aging. Moreover, as

aging occurs, all these hallmarks are gradually implemented and interact with each other and an integrative model of these events was proposed [1] that supports a multifactorial origin of age-related pathologies (Figure 1).

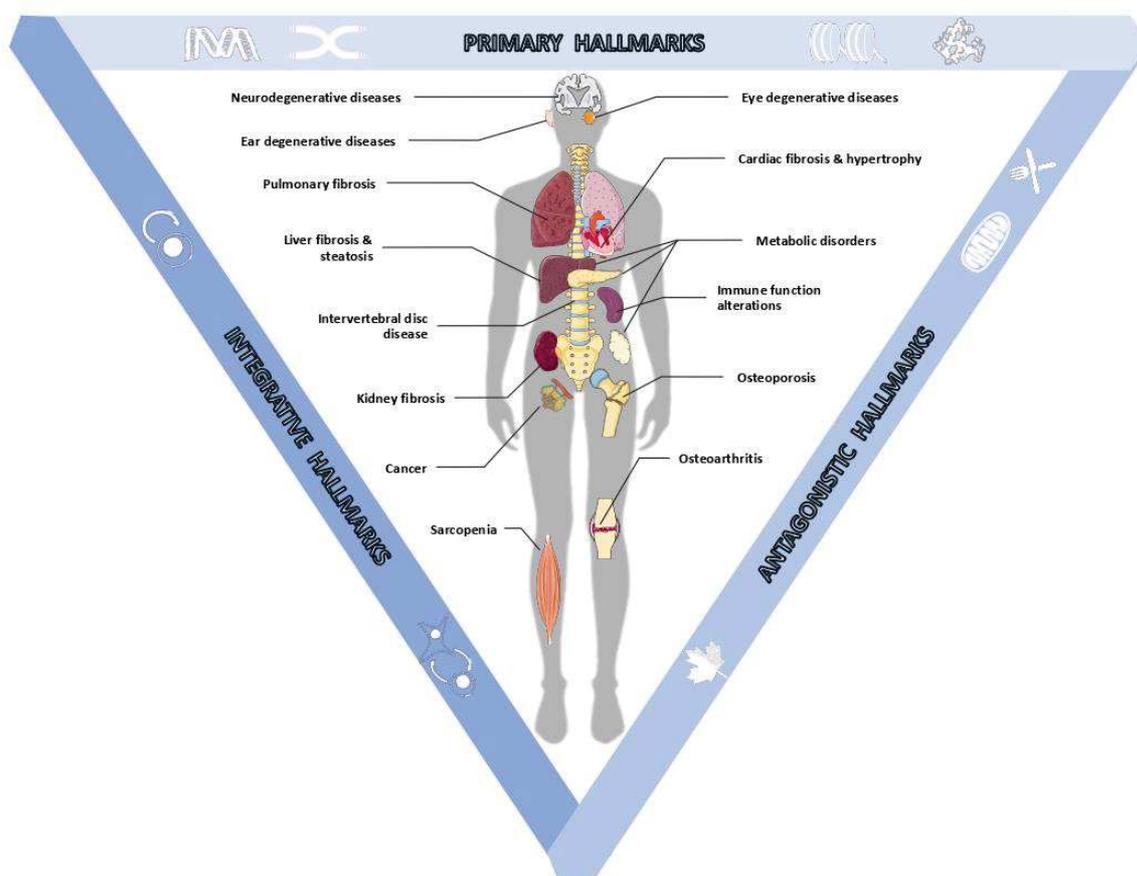


Figure 1. Hallmarks of aging at the origin of age-related diseases. Aging is characterized by a progressive loss of biological functions linked to the appearance and accumulation of molecular and cellular damage over entire lives. This damage has been classified into three categories by López-Otín [1]. (i) Primary hallmarks corresponding to molecular disorders occurring in cells: genomic instability, telomere attrition, epigenetic alterations, and loss of proteostasis. (ii) Antagonistic hallmarks, corresponding to alterations of damage response mechanisms: deregulated nutrient sensing, mitochondrial dysfunction, and cellular senescence. Finally, (iii) integrative hallmarks corresponding to tissue homeostasis failures: stem cell exhaustion and altered intercellular communication. Altogether, these interconnected hallmarks of aging act as cause and catalyst engendering a large set of age-related pathologies affecting the whole body.

2.2.1. The Primary Hallmarks of Aging Are the Triggering Events Whose Harmful Consequences Progressively Accumulate Over Time

The hallmarks are structural changes to biological molecules that alter their functions. These changes increase molecular disorder, or decrease molecular fidelity, within cells. Molecular disorder can be blocked, or at least slowed, by repair and replacement processes. However, these mechanisms are also achieved by biomolecules, which are themselves subject to this increasing disorder [19]. The paradigms of aging-linked disorders are in the macromolecules, DNA, and protein, including genomic instability [20–23], telomere shortening [24–26], epigenetic alterations in DNA [27–29], and loss of proteostasis [30–35].

2.2.2. The Antagonistic Hallmarks Are Damage Response Mechanisms That Become Overwhelmed

In principle, antagonistic hallmarks of aging are activated to counter the primary hallmarks, but they progressively become negative in a process that is partly favored or accelerated by the primary damage.

Cells suffer many impairments, affecting all their molecules and compartments. Fortunately, they usually have the necessary weapons to deal with these problems. However, as we age, molecular chaos overwhelms our cells' declining capacity for control and repair. To temporarily stabilize and then eliminate overly damaged cells, we have cellular processes such as senescence. However, senescent cells accumulate within tissues during aging, in particular due to a decrease in their elimination by the immune system, and this accumulation incurs many age-related diseases [36]. Moreover, not only cells but also cell organelles can be damaged. Damaged mitochondria accumulate during aging, upregulating reactive oxygen species and decreasing energy levels and cellular respiratory capacity [37–39].

During aging, there is a general deregulation of the nutrient-sensing pathways that detect the intracellular and extracellular levels of nutrients and metabolites as well as the different hormones that regulate them, and several metabolic alterations thus accumulate over time, reducing functionality in metabolic disorders.

In addition, certain environmental factors act as catalysts of these deregulations such as hypercaloric nutrition and a sedentary lifestyle [40].

2.2.3. The Integrative Hallmarks Are Tissue Homeostasis Failures

Integrative hallmarks occur when the accumulated damage caused by the primary and antagonistic hallmarks cannot be compensated for by homeostatic mechanisms within the aging tissues. Indeed, as we age, we witness the gradual accumulation of molecular damage that is no longer tolerated by cellular control mechanisms and thus the number of altered, dysfunctional senescent cells within tissues increases.

Reduced regenerative capacity and/or depletion of stem cells, resulting from accumulated cell damage, are among the major causes of the body aging process [41,42].

These important changes interfere with interactions and communication between cells, tissues, and organs, and result in the loss of tissue integrity. Senescent cells have a specific senescence-associated secretory phenotype (SASP) repertoire composed of pro-inflammatory cytokines (IL-1 α , IL-6, IL-8), chemokines (CCL2, CXCL1), growth factors (VEGF), and metalloproteinases (MMP-1, MMP-3). SASP is a major source of circulating inflammatory factors [43,44]. The immune system itself also progressively declines in function over life. This decline, called immuno-senescence, reduces both humoral and cellular immune responses [45,46]. Immuno-senescence also favors a pro-inflammatory environment affecting endocrine, neurocrine, and neuronal intercellular communication.

Although the classification proposed by López-Otín is widely accepted, a few new hallmarks of aging have been identified since 2013, including stiffening of the extracellular matrix [47], tRNA-derived fragments [48], circRNA accumulation [49], and even microbiota dysbiosis [50].

3. The Promise of Pluripotent Stem Cells

Among the approaches to age-related pathological phenotypes, most are aimed at preventing or mitigating cell damage [1]. This involves activating cellular stress resistance mechanisms, either with antioxidant molecules or by suppressing senescent cells to reduce their impact on tissues.

An exception is heterochronic parabiosis, which aims at restoring the regenerative ability of older tissues through exposure to circulating juvenile factors [51–57].

This objective of restoring functions of a tissue or an organ, when the regenerative ability of older tissues is reduced, is a foundation of regenerative medicine.

Thus, new strategies are currently being developed around stem cells and the use of their regenerative potential to prevent the detrimental effects of aging. In particular,

human pluripotent stem cells (hPSCs) including ESCs and, more recently, iPSCs, are an indefatigable source of cells for clinical use [58]. ESCs and iPSCs are pluripotent and therefore have the ability to differentiate into any cell type of the body (with the exception of embryonic appendices). This characteristic, in addition to self-renewal, gives hPSCs a central role in a growing number of new cell therapies aimed at restoring functions of many tissues during aging.

3.1. Human Embryonic Stem Cells

ESCs were first obtained in mice [59,60] and in rhesus monkeys [61]. The work in primates paved the way for the first successful human embryonic stem cells (hESCs) to be derived a few years later [62]. Characterization of hESCs revealed specific surface markers expressed by these cells, and their ability to differentiate into the three embryonic layers: endoderm, ectoderm, and mesoderm. Following this breakthrough, a large number of studies demonstrated the possibility of differentiating ESCs into different specialized cell types, including mature neurons, cardiomyocytes, or insulin-producing cells [63], thus paving the way for future therapeutic applications.

3.2. Cell Reprogramming

Other methods aim to revert to the pluripotent state using somatic cells as starting material. Cellular reprogramming has revolutionized the understanding of many fields of biology and medicine, notably following the discovery of iPSCs in 2006. Two of the main contributors to cell reprogramming were awarded the Nobel Prize in Medicine in 2012, namely, Sir John Gurdon and Shinya Yamanaka [64].

Following the discoveries made in the field of somatic cell reprogramming by nuclear transfer [65,66], which led to therapeutic cloning, trans-differentiation, and cell fusion [67], it has been hypothesized that somatic cells can be directly reprogrammed into pluripotent cells through the action of appropriate transcription factors [68–70].

In 2006, Shinya Yamanaka's team validated this hypothesis with mouse and human cells [4,71]. They determined the minimum cocktail of factors necessary to generate cell colonies similar to those observed in ESC cultures. A final combination of four protein factors, since named Yamanaka factors or OSKM, reprograms somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPSCs). OSKM is OCT4 and SOX2, which are stabilizers of pluripotency in ESCs and the early embryo [72–74], and KLF4 and C-MYC, which are important in the self-renewal and proliferation of ESCs in culture [75,76]. This discovery revolutionized stem cell research for two main reasons. The first is that this method is completely free of the ethical problems associated with the manipulation of human embryos for research purposes. The second, resulting directly from the first, is that it opens the door to autologous transplant strategies into a much larger space than was possible through classical somatic cell reprogramming by nuclear transfer. With iPSCs, autologous transplants of "reconstructed or repaired" cells, tissues, or organs can be derived from the patient's own cells, which avoids any risk of rejection down the line. Induced reprogramming represents the third and most recent source of hPSCs developed for therapeutic applications, after therapeutic cloning and deriving ESCs from embryos.

3.3. Human Pluripotent Cells as an Experimental Modelling Tool

Reprogramming has revealed that cellular fate is highly plastic. Another parameter of prime importance for medical research is that, after having ascended the slope from one cell type to a pluripotent state, the cell can be brought back down along various different pathways from the original one. Thus, hPSCs create the possibility of in vitro differentiation into various cell types. In vitro differentiation can be used experimentally, to model different diseases, and therapeutically, to manipulate diseased states. In the following sections, we will discuss concrete examples, in the context of aging, of in vitro modelling of differentiation and pathologies, and the challenges of developing them into therapeutic solutions.

3.3.1. Organoids and Complex Tissues

Pluripotent stem cells (PSCs) spontaneously differentiate when culture conditions no longer stabilize their pluripotency. Equally, PSCs can be guided towards desired cell identities if specific stimuli are added, such as those present during embryonic differentiation. Examples of iPSC differentiation are now numerous and varied. The differentiation of iPSCs into renal podocytes [77,78], hematopoietic progenitors [77], neurons [79], endothelial cells [80], cardiomyocytes [81], retinal progenitors [82], pancreatic β islet cells [83], or ciliated epithelial cells [84], implies no limits to human tissue modeling in vitro. The recent development of organoids also illustrates the progress of knowledge in the manipulation of cell fate. Three-dimensional suspension cultures of pluripotent cells allow them to organize and differentiate into spheroid structures, in which several cell types cohabit. The cells thus form “mini-organs” in which cellular interactions mimic those that exist within tissues in vivo. Organoids have become very popular in recent years [85–87] and many teams model tissues and characterize the cell populations in these structures with increasing precision, particularly through high-throughput single-cell transcriptomics [88]. The most advanced organoids currently model the brain [89–91], intestine [92,93], kidney [94], heart [91,95–97], or retina [98].

More recently, the emergence of cell-printing technologies, using PSCs or differentiated cells as “inks”, has also led to advances in the formation of heterogeneous tissues and has even allowed the development of supports for ear cartilage regeneration [99–101].

Despite the rapid advances in this field, the level of complexity attained in cellular and organoid models still falls short of the real complexity of living organisms, in which large systems interact with each other and constantly adapt to changes brought about by the environment. These modeling strategies are thus complementary approaches to animal experimentation.

3.3.2. Modelling Age-Related Pathologies In Vitro

Technologies reprogramming human somatic cells into iPSCs [71,102], have also paved the way for the generation of patient-derived iPSCs, allowing the various pathological phenotypes to be recreated in vitro, e.g., for genetic disorders, including Duchenne muscular dystrophy, Becker muscular dystrophy, Parkinson’s disease, Huntington’s disease, trisomy 21, and polymorphic catecholaminergic ventricular tachycardia [103–105].

Accelerated aging pathologies can also be modeled through reprogramming. Our group has modeled several of these syndromes. Indeed, we have demonstrated that cells from Werner syndrome patients can be reprogrammed while maintaining their shortened telomeres phenotype [106]. We also reprogrammed cells from a patient with Bloom syndrome, while maintaining the characteristic sister chromatid exchange phenotype [107]. Other teams have obtained similar results on several premature aging syndromes [108–113].

3.3.3. New Models for the Screening of Therapeutic Molecules

In addition to providing new knowledge about the molecular characteristics of pathologies and their development, pathology models derived from hPSCs can also provide key lead molecules in high-throughput screens [114,115]. Furthermore, these screens can test potential therapeutic agents on organoids in specific pathological contexts to assess toxicity and optimize treatment.

For example, evaluating therapeutic candidates for cardiotoxicity is a major phase in drug development, and thus a particularly important application in hPSC-based models [116–120].

Thus, hiPSCs can be broadly used as a modelling tool. Moreover, an important parameter, brought by the use of patient-derived iPSCs, is the personalized nature of this approach, allowing hypotheses to be tested in the patient’s genetic background [121–123]. Furthermore, the intersection of stem cell research and genome editing research, and in particular, the recent advances in the use of CRISPR-Cas technology, promises to open up new possibilities in the correction of genetic mutations associated with pathological

phenotypes [124–127]. These developments pave the way for future therapies based on cell or tissue replacement by their genetically corrected ex vivo equivalent derived from iPSCs.

4. New Strategies in Regenerative Medicine to Rejuvenate Cells and Tissues

Taking advantage of cell reprogramming, several strategies can be envisioned to rejuvenate cells and tissues. Two major types of treatment are of note. A classical therapeutic approach is the direct consequence of clinical applications based on the production of differentiated cells from iPSCs to regenerate or replace cells inside a damaged tissue or even replace the entire injured organ (Figure 2). Another more innovative and disruptive process is to act directly on the cells, inside the damaged tissue, to rejuvenate them, without modifying their identity. In the same vein, we can also imagine intervening prophylactically before the appearance of the damage induced by aging.

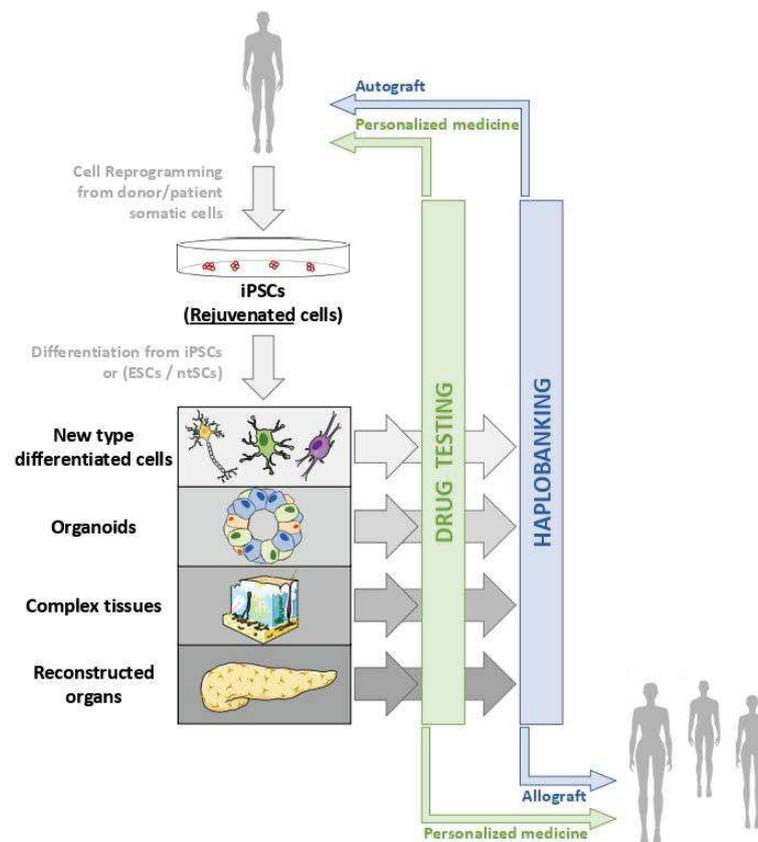


Figure 2. Applications of cell reprogramming and hPSCs to restore altered or aged tissues. Due to increased life expectancy and global population aging, two major health issues are arising: increased prevalence of age-associated pathologies whose mechanisms remain only partially explored and understood, and increased age-associated tissue deterioration and loss of function. Therefore, human pluripotent stem cells (hPSCs), including embryonic stem cells (ESCs), nuclear transfer stem cells (ntSCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) emerged as tools to model both age-associated pathologies and tissue deterioration: from 2D cell culture to 3D complex reconstructed tissues, through organoids, and cells or tissue replacement strategies. Thanks to cell reprogramming [4,71], iPSCs made it possible to envisage autografts, especially in aged patients, as reprogramming erases aging marks in iPSCs and allows production of “rejuvenated” cells after differentiation [128].

4.1. Clinical Applications of Human Pluripotent Stem Cells

All developments in the *ex vivo* reproduction of tissue for analytical purposes also benefit clinical applications that aimed at “repairing” humans. In contexts such as the shortage of organs to meet the demand for transplants, the inexistence of therapeutic solutions in certain cases of traumatic injuries or the problem of immune rejection of transplants after transplantation, therapies based on hPSCs and particularly iPSCs are extremely innovative and promising.

4.1.1. Production of hPSCs for Clinical Use

The therapeutic use of hPSCs requires safety standards, and it is therefore highly pertinent to develop reprogramming factors that minimize the risk of alterations. For example, Okita et al. demonstrated that the transgene encoding C-MYC could be reactivated and cause tumors in chimeric mice derived from retroviral-vector-reprogrammed iPSCs [129]. Other studies have also revealed that genetic and epigenetic alterations occur during very long-term maintenance of cells in culture and that culture techniques also have an impact at this level [130,131]. Quality control of the genomic integrity of clones used for therapeutic applications should therefore be applied, even when reprogramming has been carried out using non-integrative factors [132]. There have also been refinements to the composition of hPSC culture media and matrices that ensure the absence of xenogenic elements for clinical use [132,133].

The reprogramming of patient cells, although relatively cumbersome and expensive, has tremendous advantages for autologous therapies. Cells can easily be collected by blood sampling and thus very low surgical risk is associated with very little inconvenience to the patient. Recently, culture techniques in microfluidic systems have shown an increase in the efficiency of reprogramming when mRNA-like factors are used rather than conventional culture techniques. Moreover, this approach allows a drastic reduction in the amount of components needed for reprogramming [134,135].

iPSCs can also be used for allogeneic transplants. One approach is to build haplobanks in which cells would be characterized and selected for their compatibility with the recipient, in particular for human leukocyte antigen (HLA) [136–138]. Another interesting possibility is to decrease cell immunogenicity, as demonstrated in mice by Deuse et al. [139]. In their experiments, they found that murine and human iPSCs lost their immunogenicity from the dual effects of CD47 overexpression and CRISPR-Cas9 ablation of major class I and II histocompatibility complexes [139]. This proof of principle suggests it will be possible to design several clones of “universal” iPSCs characterized and modified to be compatible with the general population, which would greatly reduce the cost compared to patient-specific strategies. However, such a strategy should be used with caution as it increases the risk of cancer development due to a reduction of cell immunogenicity. Therefore, in order to ensure maximum security, control of the system using suicide genes could be added [140,141].

4.1.2. Cell and Tissue Replacement Therapies

Therapies based on the transplantation of cells and tissues, differentiated from hPSCs, aim to replace or repair age-related injured, damaged, or non-functional tissues [142]. We will discuss a few illustrative examples. Many cell and tissue replacement trials have focused on the nervous system and traumas, such as spinal cord injuries, that often occur in accidents. These frequently lead to reduced motor functions, even paralysis, or loss of sensory functions. Unfortunately, there are no real classical therapeutic solutions yet for these situations. Demonstrating the potential of hPSCs, it was showed, in 2005, that the transplantation of human neural stem cells of fetal origin into the spinal cord of a primate—a marmoset—can promote functional recovery after injury. In particular, it was shown that the transplanted cells differentiate into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes [143]. The same group went on to demonstrate in mice and marmosets that human neural stem cells derived from iPSC differentiation could improve motor functions, form synaptic

connections with host neurons and reduce demyelination from injury [144,145]. This cell replacement strategy was also applied for deafness using hESCs differentiated into otic progenitors and then into ciliated cells and auditory neurons. After transplantation, these cells significantly improved auditory response thresholds in a model of lesion-generated auditory neuropathy [146].

Degenerative pathologies can also benefit from this type of therapeutic approach. Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's are among the interesting targets for cell therapy given their frequency in the population [147–149]. In monkeys, autologous transplantation of dopaminergic neurons, derived from iPSCs, avoided immunosuppression and significantly re-innervated the putamen, improved motor function and enhanced survival by over two years [150]. Retinopathies, such as age-related macular degeneration or retinitis pigmentosa, have also been targeted in several clinical trials using differentiated cells derived from hESCs or iPSCs [151,152]. In 2017, Mandai et al. performed an autologous retinal cell transplant of retinal cells derived from iPSCs from a patient with neovascular (or wet) AMD [153]. Another development by Ben M'Barek et al. focusing on the treatment of retinitis pigmentosa associated with mutations in the LRAT, RPE65 and MERTK genes, used a sheet of retinal pigmentary epithelium grown on a human biological matrix of amniotic origin. This leaflet, derived from hESCs using a GMP process, has been tested in mice and primates and is currently in clinical trials [152].

4.1.3. Organ Production in In Vivo Models

All the therapeutic strategies we have addressed consist of developing therapeutic cells or tissues *ex vivo*, under defined conditions, and then reimplanting them in the patient. Another approach consists of developing complete human organs directly in animal hosts. By creating *in vivo* models closer to human beings, it should be possible to generate functional and directly transplantable organs and circumvent the lack of organs [154,155].

By injecting iPSCs from one species into a blastocyst stage embryo of a second species, it is possible to generate interspecific chimeric individuals composed of cells from both species. Interspecific organogenesis then takes a specific organ of one species grown in a second species host that has a defect in the development of the organ in question. This was first performed in 2010 by Kobayashi et al., who injected rat iPSCs into a mouse blastocyst for which the genesis of the pancreas was genetically disabled by deletion of the PDX1 gene. This 'blastocyst complementation' resulted in a mouse with a functional mouse-sized rat pancreas [156]. The reverse experiment was performed a few years later by Yamaguchi et al., using the same genetic deletion in rats, with mouse iPSCs. Again, the host organism, the rat, had a normal rat-size functional pancreas, derived from the donor mouse cells [157]. Usui et al. showed in 2012 that it was possible to extend this process to other organs by performing intraspecific blastocyst complementation with wild-type mouse iPSCs and a mouse blastocyst, deleted for the SALL1 gene, i.e., in which kidney genesis is inactivated. The chimera resulting from the complementation also showed functional kidneys from the donor cells [158]. All these studies make it possible to envisage blastocyst complementation from hPSCs in blastocysts from animals such as pigs or sheep, whose organ size, anatomy, and physiology are close to those of human organs. However, Wu et al. have found that the frequency of human cells in chimeric pig embryos is currently very marginal [159].

Many improvements and discoveries still need to be made to make this type of strategy fully operational. Recently, it was demonstrated that the contribution of donor cells to host tissues is greatly improved by the artificial creation of a permissive niche that could even allow the formation of complete organs [160]. However, the main limitation to achieve interspecific chimerism is indisputably the pluripotent state of hPSCs. Indeed, two distinct states of pluripotency have been characterized—the naïve state corresponding to mouse ESCs and the primed state corresponding to hPSCs or to mouse epiblast stem cells (epiESCs) originating from the early post-implantation epiblast [161,162]. These different naïve and primed states have important archetypal differences, particularly in terms of cellular metabolism, the level of chromatin methylation, and gene expression. They also

display important functional differences, notably in their ability to integrate into other species embryos [163]. Numerous research projects aim at developing and optimizing cell culture processes to increase the ‘naivety’ of hPSCs to approach that of murine naive cells and to increase their capacity to integrate into blastocysts [164–166].

4.2. Organismal Rejuvenation through Cellular Reprogramming

As we have just seen, the new therapeutic solutions provided by regenerative medicine benefit, or will benefit, the fight against many age-related diseases. Many age-damaged tissues and organs can already be replaced, or may be considered for replacement in the near future, thanks to ongoing innovations in stem cell research. This would be possible thanks to organs grown *ex vivo* or produced in animals from iPSCs derived from patient cells. However, there are obstacles to realizing this vision.

4.2.1. Aging and Senescence, Two Obstacles to Reprogramming

One of these important limitations is the aging itself, of the individual, since, as we previously discussed, there are important changes that negatively and permanently affect cells as they age. Thus, developing autologous replacement strategies based on cells already altered by age would lead to the creation of new organs that are already old and therefore, by definition, damaged. Cell senescence, which is always increasing in the body during aging, is a major obstacle to cell reprogramming, reducing the effectiveness of autologous approaches in an aging context. It is notably via epigenetic remodeling of the CDKN2A locus and overexpression of the proteins p53, p16INK4A and p21CIP1 that senescence is thought to act as a barrier to reprogramming in older and damaged cells [167–169]. Consequently, inhibition of the p16INK4A pathway [170] or inactivation of the p53 gene [171,172] can increase reprogramming efficiency and have even enabled reprogramming in cells that failed to be reprogrammed under normal conditions, although these changes increased the susceptibility to genetic instability. The inactivation of p53 not only promoted reprogramming but also allowed reprogramming of cells via only two transcription factors: OCT4 and SOX2 [173]. One of the obstacles for reprogramming is thus falling.

Recently, Mahmoudi et al. demonstrated high variability in reprogramming in elderly fibroblast populations, due in part to the pro-inflammatory secretory profile of certain so-called “activated” fibroblasts. These fibroblasts are characterized by the secretion of inflammatory cytokines, notably TNF, and are also believed to be involved in the variability of *in vivo* wound healing rates in elderly mice [174].

4.2.2. Cellular Reprogramming to Erase Cell Aging

In many ways, iPSCs are considered equivalent to ESCs, if not indistinguishable. Although this is still under discussion, it is clear that these cells have much in common and that iPSCs have embryonic genetic and epigenetic characteristics. Among these characteristics, some are known to be altered by age, such as telomeric shortening. Thus, by restoring an embryonic state, reprogramming has demonstrated a very interesting ability to erase certain cellular marks of aging. Marion et al. have thus shown that reprogramming fibroblasts with short telomeres resulted in an extension of the telomeres in the same way as reprogramming young fibroblasts with longer telomeres [175]. From a metabolic point of view, Surh et al. demonstrated that after reprogramming, iPSCs exhibit mitochondria similar to those of ESCs. Moreover, after redifferentiation, neo-fibroblasts significantly improved functionally, compared to their parent fibroblasts [176].

It is intuitive that re-programming promotes cell rejuvenation in certain ways, as an embryonic cell (or iPSC) has more juvenile feature than an adult cell. Furthermore, we demonstrated for the first time that cell reprogramming can even rejuvenate cells from centenarians, and that it can also overcome the barrier of cell senescence without directly inactivating senescence inducers such as p53, p16INK4A, and p21CIP1, as discussed in the previous paragraph [128]. The reprogramming protocol used has been optimized

and is based on the use of a cocktail of the combined six reprogramming factors from pooling the overlapping four factor cocktails of Yamanaka [71] and Thomson [102], i.e., OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC, NANOG, and LIN28 (OSKMNL). Following this protocol, we discovered that iPSCs reprogrammed from replicative senescing or centennial cells had restored telomere and mitochondrial functions, with a gene expression profile and a level of oxidative stress similar to hESCs. In addition, after their redifferentiation, the fibroblasts obtained had reset their proliferation capacity and had a similar transcriptomic profile to fibroblasts derived from hESCs, as well as a restored metabolism. This demonstrated conclusively that “cellular aging” is reversible. Overall, then, iPSC technology is now among the major regenerative medicine approaches for elderly patients and the one that promises the most perspectives for new therapeutic avenues.

4.2.3. Complete Cellular Reprogramming Causes Teratomas

As a result of all these observations, several teams around the world, including ours, have wondered whether cell rejuvenation by reprogramming could also be applied *in vivo*, directly within tissues, to prevent aging deteriorations. Thus, various distinct mouse models for *in vivo* reprogramming have been developed to explore this hypothesis.

Abad et al. were the first to address this question [177]. They developed two different functional transgenic murine lines, named i4F-A and i4F-B, both allowing the inducible expression of the four reprogramming factors in the presence of doxycycline. A polycistronic expression cassette encoding OSKM was inserted using a lentivirus-like vector into two different genome loci: an intron of the *Neto2* gene for the i4F-A lineage and into an intron of the *PPAR γ* gene for the i4F-B lineage. The expression of the OSKM cassette is controlled by a doxycycline-inducible transcriptional activator (rtTA) in the *Rosa26* locus. Firstly, mice were treated with a high dose, 1mg/mL, of doxycycline in drinking water to induce OSKM, which revealed a very rapid deterioration in the health of the animals after just one week, including significant weight loss and damage to the intestine and pancreas. Other protocols were then designed to minimize these effects and maximize survival, which led to the generation of pluripotent cells *in vivo*, circulating in the blood, and thus validated the feasibility of direct reprogramming in animals. Unfortunately, these treatments also produced teratomas in many organs, especially the pancreas, kidneys, intestine, and adipose tissue, with an incidence of over 40%. Using another *in vivo* reprogramming model, Ohnishi et al. achieved results similar to Abad et al. [178], with a rapid degradation of health status due to the proliferation of undifferentiated dysplastic cells within the tissues. The authors also observed the appearance of teratomas in the kidneys, pancreas, and liver, even one week after stopping a seven-day treatment on their animals. Thus, although *in vivo* reprogramming has deleterious effects on health status and lifespan when carried out to completion, it is nevertheless possible to convert adult cells into embryonic cells *in vivo* just as in cell culture.

Based on the previously described mouse transgenic models [177], several studies have revealed a strong association between reprogramming and tissue senescence. *In vivo*, complete reprogramming requires senescence-associated secretory phenotype (SASP) factors, in particular IL-6 [179]. Indeed, Mosteiro et al. demonstrated the role of senescence in cell plasticity by generating teratomas in the lungs, only in the context of injury. In addition to the teratomas, this organ had high expression levels of senescence markers such as IL-6 and PAI-1. Inactivation of senescence in this tissue inhibits teratoma formation. Similar results obtained in injured muscle by Chiche et al., using the same model, highlighted the central role of Pax7⁺ muscle stem cells in the reprogramming of this tissue [180].

Overall, these examples fully illustrate the importance, for any reprogramming strategy aiming at rejuvenating organisms, of first overcoming the conditions leading to deleterious total dedifferentiation of the cells.

4.2.4. Partial Cellular Reprogramming Rejuvenates Cells In Vitro and In Vivo

To overcome this ultra-dedifferentiation problem, Ocampo et al. have developed a protocol to induce partial reprogramming. Their work was the first proof that reprogramming can counteract aging, demonstrating in particular that cyclic expression of OSKM in vivo can prolong the life expectancy of mice recapitulating the human Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome, while improving the age-related phenotype [181]. For the purposes of their experiments, the authors used reprogrammable homozygous progeria mice of genotype $Lmna^{G609G/G609G} R26^{rtTA/+} Col1A1^{4F2A/+}$ obtained by crossing a reprogramming model developed by Carey et al. [182] with the accelerated aging model developed by Osorio et al. [183]. The authors chronically induced OSKM with a dose of 1 mg/mL of doxycycline in bottle water two days per week. It was observed that by following this induction protocol, the life expectancy of homozygous progeria animals was increased by almost a third, with a median life expectancy of 24 weeks for treated animals compared to 18 weeks for controls. This improvement in longevity was also accompanied by an overall improvement in health, as well as maintenance of tissue integrity in organs such as the kidneys, spleen, stomach, and heart. These results were, however, obtained on animals with a homozygous *Lmna* gene mutation, i.e., that were highly abnormal [183]. It would be interesting to confirm these results in the context of normal physiological aging or in models closer to it, such as heterozygous progeria animals for this same mutation.

Interestingly, it was shown in the same study that induction of OSKM improves (i) the regenerative capacities of non-progeria animals of genotype $Lmna^{+/+} R26^{rtTA/+} Col1A1^{4F2A/+}$ [181], (ii) regeneration in a model of diabetes induced by streptozocin toxin administration, and (iii) in a model of muscle degeneration induced by intramuscular cardiotoxin injection. The improvements occur through an increase in the number of Pax7⁺ satellite stem cells that are involved in muscle fiber regeneration [181]. In the same mouse model, Doeser et al. showed that local induction of reprogramming factors temporarily slowed skin wound healing by reducing the activity of fibroblasts and their transdifferentiation into myofibroblasts, illustrated by the down-regulation of the markers TGFβ1, COL1a1, and αSMA. The consequence of this phenomenon is a significant reduction in the formation of scar tissue during regeneration [184]. Recently, Rodríguez-Matellán et al. demonstrated, with the i4F-B model, that a cyclic induction three days per week by 2 mg/mL of doxycycline improved cognitive functions in mice, with a positive correlation between an increase scored in object recognition memory test and the level of OSKM expression [185].

In addition, Ocampo et al. demonstrated that inducing OSKM for four days induces epigenetic rearrangement in the histone markers H3K9me3 and H4K20me3, which are known to be deregulated during aging, in vitro and in vivo in the tissues of treated animals. However, these short induction effects were reversible, suggesting that chronic induction is necessary to obtain impact on longevity [181].

To further investigate the impact of partial reprogramming in humans, Sarkar et al. recently developed an in vitro strategy based on the use of mRNA to allow the expression of the 6 OSKMNL reprogramming factors in young and old human cells [186], whose effectiveness in erasing aging hallmarks leading to a rejuvenated phenotype had previously been established by the work of our team [128]. They demonstrated, in fibroblasts and endothelial cells, that transient reprogramming could restore certain cellular characteristics altered in physiological aging, including two epigenetic clocks, namely a pan-tissue epigenetic clock based on 353 CpGs and a skin- and blood-focused second clock based on 391 CpGs, described to be highly correlated to chronological age. In addition, the authors demonstrated that reprogramming changed the level of H3K9me3, improved proteosomal activity and autophagosome formation, and decreased ROS. To analyze whether transient OSKMNL expression could also reverse age-related phenotypes such as increased levels of inflammation and decreased regenerative capacity of adult stem cells, the authors first analyzed the transcriptional consequences of reprogramming to chondrocytes in elderly osteoarthritic patients. They observed a significant reduction in intracellular mRNA levels

of RANKL and iNOS2, as well as in the levels of inflammatory factors secreted by the cells, such as MIP1A, IL-6, IFNA and MCP3. In a second step, they analyzed the power and regenerative capacity of transiently reprogrammed human muscle stem cells of different ages by transplanting them into a mouse muscle injury model. Reprogrammed aged stem cells became stronger and regenerated better muscle fibers [186]. These results are promising as they open the way to new in vivo reprogramming strategies for cell therapy interventions and validate the non-integrative approach to achieve the expression of reprogramming factors.

Another type of in vivo reprogramming strategy has been illustrated recently. Senís et al. demonstrated that in vivo reprogramming was achievable by delivering OSK factors with viral vectors [187]. This kind of approach has very recently been illustrated as a strategy for regeneration of the central nervous system in mice, and more precisely, for restoring vision [188]. In this study, the authors used AAV2 vectors for the controlled expression of a polycistronic cassette encoding OSK factors that they injected into the vitreous body of the mouse eye to reach the retina. To test the safety of this strategy, the authors maintained an induction for over 15 months to validate the absence of tumors or deformations of the retina. The authors then demonstrated that the induction of OSK in retinal ganglion cells increased their survival, the regeneration of their axonal extension and forming of the optic nerve, during different stress situations. These included a model of optic nerve injury by nerve compression, a model of glaucoma induced by ocular overpressure, and their final demonstration was in the context of age-related vision impairment. DNA methylation and transcriptomic profiles were also restored in these retinal ganglion cells. Furthermore, epigenetics seems to play an important role in the regeneration phenomenon, as the inhibition of TET1 and TET2 DNA demethylase acts as a barrier and prevents any restoration. Epigenetic reorganizations involved in transient reprogramming are the widely considered to be the driving force behind the global rejuvenation phenomenon observed both in vitro and in vivo [181,185,186,188,189].

In summary, then, the various modes of cellular reprogramming detailed above confirm it as an important avenue toward innovative therapies to combat the harmful effects of aging and age-related pathologies due to decreased regenerative capacities of stem cells altered by aging.

5. Conclusions

The above paragraphs address the many approaches based on the properties of cell pluripotency and reprogramming that can be used to counter the multifactorial damages of aging. “Classical” approaches using iPSCs and derived cells obtained after differentiation are now being intensively studied and developed, and clinical applications, although still in their infancy, are progressing very rapidly. Beyond this, methods based on a direct intervention through partial reprogramming as a strategy against aging have laid the foundations for more disruptive approaches (Figure 3). All these procedures can be used to rejuvenate cells or tissues. Depending on the timing, the intervention can either be preventive or therapeutic. Moreover, these strategies, or a combination of them, might either delay or slow aging, or both. It is obvious that purely genetic techniques to induce reprogramming in humans are not feasible, and lifelong chronic induction is far from being translated to the clinic. However, the studies we summarize and many others that we have not had the space to cover establish a proof-of-concept for further investigations to define an optimal regimen suitable for clinical applications. Indeed, the identification of molecular and cellular pathways for tissue improvement or repair during aging opens the door for strategies for ectopic expression of reprogramming factors using non-integrative vectors or using mimetic molecules to activate endogenous reprogramming factors. In addition, these investigations could lead to the discovery of secondary and/or complementary pathways to intervene during aging and improve the healthspan. Thus, a wide range of therapeutic solutions based on induced pluripotent stem cells, but also on

cell reprogramming strategies, is now available to improve healthy aging for the benefit of individuals and society.

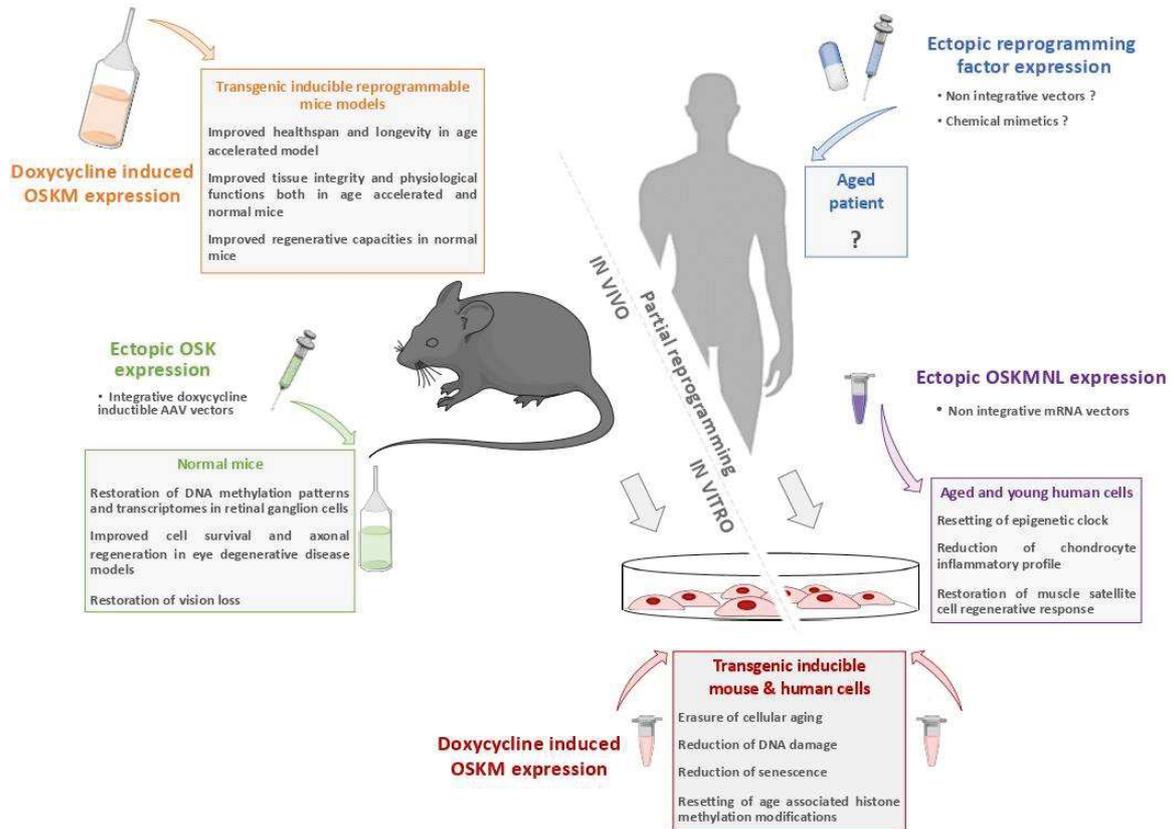


Figure 3. Partial reprogramming toward pluripotency as a new anti-aging strategy. For decades, complete cell reprogramming has been demonstrated to reset somatic cell physiology to a juvenile state equivalent to ESCs. Starting from transgenic models allowing inducible reprogramming factor expression to non-integrative vectors; numerous studies have recently demonstrated that a partial reprogramming is sufficient to restore the general characteristics of cellular aging without changing the identity of the cells. These innovative approaches pave the way for new strategies based on a safe transient reprogramming that can be directly transposed to humans.

Author Contributions: Q.A., E.L.B., O.M. and J.-M.L. drafted, wrote, and edited this review. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. López-Otín, C.; Blasco, M.A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **2013**, *153*, 1194–1217. [CrossRef]
2. Baker, D.J.; Wijshake, T.; Tchkonia, T.; LeBrasseur, N.K.; Childs, B.G.; van de Sluis, B.; Kirkland, J.L.; van Deursen, J.M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **2011**, *479*, 232–236. [CrossRef]
3. Cai, Y.; Zhou, H.; Zhu, Y.; Sun, Q.; Ji, Y.; Xue, A.; Wang, Y.; Chen, W.; Yu, X.; Wang, L.; et al. Elimination of senescent cells by β -galactosidase-targeted prodrug attenuates inflammation and restores physical function in aged mice. *Cell Res.* **2020**, *30*, 574–589. [CrossRef]

4. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676. [[CrossRef](#)]
5. Seals, D.R.; Justice, J.N.; LaRocca, T.J. Physiological geroscience: Targeting function to increase healthspan and achieve optimal longevity. *J. Physiol.* **2016**, *594*, 2001–2024. [[CrossRef](#)]
6. Eurostat, Measuring Progress towards a More Sustainable Europe. *Sustainable Development Indicators for the European Union. Data 1990–2005*; Office for Official Publications of the European Communities: Luxembourg, 2005.
7. Pison, G. Pourquoi l'espérance de vie augmente-t-elle moins vite en France? *Popul. Sociétés* **2019**, *564*, 1. [[CrossRef](#)]
8. DeSantis, C.E.; Miller, K.D.; Dale, W.; Mohile, S.G.; Cohen, H.J.; Leach, C.R.; Goding Sauer, A.; Jemal, A.; Siegel, R.L. Cancer statistics for adults aged 85 years and older. *CA Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 452–467. [[CrossRef](#)]
9. Hazlehurst, J.M.; Woods, C.; Marjot, T.; Cobbold, J.F.; Tomlinson, J.W. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. *Metabolism* **2016**, *65*, 1096–1108. [[CrossRef](#)]
10. Birbrair, A.; Zhang, T.; Files, D.C.; Mannava, S.; Smith, T.; Wang, Z.M.; Messi, M.L.; Mintz, A.; Delbono, O. Type-1 pericytes accumulate after tissue injury and produce collagen in an organ-dependent manner. *Stem Cell Res. Ther.* **2014**, *5*, 122. [[CrossRef](#)]
11. Espindola, M.S.; Habiels, D.M.; Narayanan, R.; Jones, I.; Coelho, A.L.; Murray, L.A.; Jiang, D.; Noble, P.W.; Hogaboam, C.M. Targeting of TAM Receptors Ameliorates Fibrotic Mechanisms in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2018**, *197*, 1443–1456. [[CrossRef](#)]
12. Nastase, M.V.; Zeng-Brouwers, J.; Wygrecka, M.; Schaefer, L. Targeting renal fibrosis: Mechanisms and drug delivery systems. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2018**, *129*, 295–307. [[CrossRef](#)]
13. Lemmer, A.; VanWagner, L.B.; Ganger, D. Assessment of Advanced Liver Fibrosis and the Risk for Hepatic Decompensation in Patients With Congestive Hepatopathy. *Hepatology* **2018**, *68*, 1633–1641. [[CrossRef](#)]
14. Li, L.; Zhao, Q.; Kong, W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2018**, *68–69*, 490–506. [[CrossRef](#)]
15. Palacio, L.; Goyer, M.L.; Maggiorani, D.; Espinosa, A.; Villeneuve, N.; Bourbonnais, S.; Moquin-Beaudry, G.; Le, O.; Demaria, M.; Davalos, A.R.; et al. Restored immune cell functions upon clearance of senescence in the irradiated splenic environment. *Aging Cell* **2019**, *18*, e12971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hou, Y.; Dan, X.; Babbar, M.; Wei, Y.; Hasselbalch, S.G.; Croteau, D.L.; Bohr, V.A. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15*, 565–581. [[CrossRef](#)]
17. Bowl, M.R.; Dawson, S.J. Age-Related Hearing Loss. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2019**, *9*, a033217. [[CrossRef](#)]
18. Pelletier, A.L.; Rojas-Roldan, L.; Coffin, J. Vision Loss in Older Adults. *Am. Fam. Physician* **2016**, *94*, 219–226.
19. Hayflick, L. Biological Aging Is No Longer an Unsolved Problem. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1100*, 1–13. [[CrossRef](#)]
20. Faggioli, F.; Wang, T.; Vijg, J.; Montagna, C. Chromosome-specific accumulation of aneuploidy in the aging mouse brain. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 5246–5253. [[CrossRef](#)]
21. Forsberg, L.A.; Rasi, C.; Razzaghian, H.R.; Pakalapati, G.; Waite, L.; Thilbeault, K.S.; Ronowicz, A.; Wineinger, N.E.; Tiwari, H.K.; Boomsma, D.; et al. Age-related somatic structural changes in the nuclear genome of human blood cells. *Am. J. Hum. Genet.* **2012**, *90*, 217–228. [[CrossRef](#)]
22. Park, C.B.; Larsson, N.-G. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J. Cell Biol.* **2011**, *193*, 809–818. [[CrossRef](#)]
23. Rossi, D.J.; Bryder, D.; Seita, J.; Nussenzweig, A.; Hoeijmakers, J.; Weissman, I.L. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* **2007**, *447*, 725–729. [[CrossRef](#)]
24. Martínez, P.; Blasco, M.A. Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. *J. Cell Biol.* **2017**, *216*, 875–887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Liu, J.; Wang, L.; Wang, Z.; Liu, J.-P. Roles of Telomere Biology in Cell Senescence, Replicative and Chronological Ageing. *Cells* **2019**, *8*, 54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zhu, Y.; Liu, X.; Ding, X.; Wang, F.; Geng, X. Telomere and its role in the aging pathways: Telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. *Biogerontology* **2019**, *20*, 1–16. [[CrossRef](#)]
27. Field, A.E.; Robertson, N.A.; Wang, T.; Havas, A.; Ideker, T.; Adams, P.D. DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. *Mol. Cell* **2018**, *71*, 882–895. [[CrossRef](#)]
28. Jones, M.J.; Goodman, S.J.; Kobor, M.S. DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell* **2015**, *14*, 924–932. [[CrossRef](#)]
29. Sati, S.; Bonev, B.; Szabo, Q.; Jost, D.; Bensadoun, P.; Serra, F.; Loubiere, V.; Papadopoulos, G.L.; Rivera-Mulia, J.-C.; Fritsch, L.; et al. 4D Genome Rewiring during Oncogene-Induced and Replicative Senescence. *Mol. Cell* **2020**, *78*, 522–538.e9. [[CrossRef](#)]
30. Labbadia, J.; Morimoto, R.I. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 435–464. [[CrossRef](#)]
31. Laskowska, E.; Kuczyńska-Wisnik, D.; Lipińska, B. Proteomic analysis of protein homeostasis and aggregation. *J. Proteom.* **2019**, *198*, 98–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Klaiaps, C.L.; Jayaraj, G.G.; Hartl, F.U. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 51–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Leidal, A.M.; Levine, B.; Debnath, J. Autophagy and the cell biology of age-related disease. *Nat. Cell Biol.* **2018**, *20*, 1338–1348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tomaru, U.; Takahashi, S.; Ishizu, A.; Miyatake, Y.; Gohda, A.; Suzuki, S.; Ono, A.; Ohara, J.; Baba, T.; Murata, S.; et al. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180*, 963–972. [[CrossRef](#)]

35. Abdellatif, M.; Sedej, S.; Carmona-Gutierrez, D.; Madeo, F.; Kroemer, G. Autophagy in Cardiovascular Aging. *Circ. Res.* **2018**, *123*, 803–824. [[CrossRef](#)]
36. Borghesan, M.; Hoogaars, W.M.H.; Varela-Eirin, M.; Talma, N.; Demaria, M. A Senescence-Centric View of Aging: Implications for Longevity and Disease. *Trends Cell Biol.* **2020**, *10*, 777–791. [[CrossRef](#)]
37. Kujoth, G.C.; Bradshaw, P.C.; Haroon, S.; Prolla, T.A. The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *PLoS Genet.* **2007**, *3*, e24. [[CrossRef](#)]
38. Trifunovic, A.; Wredenberg, A.; Falkenberg, M.; Spelbrink, J.N.; Rovio, A.T.; Bruder, C.E.; Bohlooly, Y.M.; Gidlof, S.; Oldfors, A.; Wibom, R.; et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **2004**, *429*, 417–423. [[CrossRef](#)]
39. Vermulst, M.; Wanagat, J.; Kujoth, G.C.; Bielas, J.H.; Rabinovitch, P.S.; Prolla, T.A.; Loeb, L.A. DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 392–394. [[CrossRef](#)]
40. López-Otín, C.; Galluzzi, L.; Freije, J.M.P.; Madeo, F.; Kroemer, G. Metabolic Control of Longevity. *Cell* **2016**, *166*, 802–821. [[CrossRef](#)]
41. Chen, D.; Kerr, C. The Epigenetics of Stem Cell Aging Comes of Age. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 563–568. [[CrossRef](#)]
42. Ren, R.; Ocampo, A.; Liu, G.-H.; Izpisua Belmonte, J.C. Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics. *Cell Metab.* **2017**, *26*, 460–474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Goldberg, E.L.; Dixit, V.D. Drivers of age-related inflammation and strategies for healthspan extension. *Immunol. Rev.* **2015**, *265*, 63–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Franceschi, C.; Campisi, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J. Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2014**, *69* (Suppl. 1), S4–S9. [[CrossRef](#)]
45. Aw, D.; Silva, A.B.; Palmer, D.B. Immunosenescence: Emerging challenges for an ageing population. *Immunology* **2007**, *120*, 435–446. [[CrossRef](#)]
46. Croke, S.N.; Ovsyannikova, I.G.; Poland, G.A.; Kennedy, R.B. Immunosenescence and human vaccine immune responses. *Immun. Ageing I A* **2019**, *16*, 25. [[CrossRef](#)]
47. Fedintsev, A.; Moskalev, A. Stochastic non-enzymatic modification of long-lived macromolecules—A missing hallmark of aging. *Ageing Res. Rev.* **2020**, *62*, 101097. [[CrossRef](#)]
48. Yuan, Y.; Li, J.; He, Z.; Fan, X.; Mao, X.; Yang, M.; Yang, D. tRNA-derived fragments as New Hallmarks of Aging and Age-related Diseases. *Ageing Dis.* **2021**. [[CrossRef](#)]
49. Knupp, D.; Miura, P. CircRNA accumulation: A new hallmark of aging? *Mech. Ageing Dev.* **2018**, *173*, 71–79. [[CrossRef](#)]
50. Nagpal, R.; Mainali, R.; Ahmadi, S.; Wang, S.; Singh, R.; Kavanagh, K.; Kitzman, D.W.; Kushugulova, A.; Marotta, F.; Yadav, H. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutr. Healthy Aging* **2018**, *4*, 267–285. [[CrossRef](#)]
51. Conboy, M.J.; Conboy, I.M.; Rando, T.A. Heterochronic parabiosis: Historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity. *Ageing Cell* **2013**, *12*, 525–530. [[CrossRef](#)]
52. Villeda, S.A.; Luo, J.; Mosher, K.I.; Zou, B.; Britschgi, M.; Bieri, G.; Stan, T.M.; Fainberg, N.; Ding, Z.; Eggel, A.; et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* **2011**, *477*, 90–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Carlson, M.E.; Hsu, M.; Conboy, I.M. Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* **2008**, *454*, 528–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sinha, M.; Jang, Y.C.; Oh, J.; Khong, D.; Wu, E.Y.; Manohar, R.; Miller, C.; Regalado, S.G.; Loffredo, F.S.; Pancoast, J.R.; et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science* **2014**, *344*, 649–652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Elabd, C.; Cousin, W.; Upadhyayula, P.; Chen, R.Y.; Chooljian, M.S.; Li, J.; Kung, S.; Jiang, K.P.; Conboy, I.M. Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–11. [[CrossRef](#)]
56. Egerman, M.A.; Cadena, S.M.; Gilbert, J.A.; Meyer, A.; Nelson, H.N.; Swalley, S.E.; Mallozzi, C.; Jacobi, C.; Jennings, L.L.; Clay, I.; et al. GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 164–174. [[CrossRef](#)]
57. Castellano, J.M.; Mosher, K.I.; Abbey, R.J.; McBride, A.A.; James, M.L.; Berdnik, D.; Shen, J.C.; Zou, B.; Xie, X.S.; Tingle, M.; et al. Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *544*, 488–492. [[CrossRef](#)]
58. Mao, A.S.; Mooney, D.J. Regenerative Medicine: Current Therapies and Future Directions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 14452–14459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Evans, M.J.; Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nat. Cell Biol.* **1981**, *292*, 154–156. [[CrossRef](#)]
60. Martin, G.R. Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 7634–7638. [[CrossRef](#)]
61. Thomson, J.A.; Kalishman, J.; Golos, T.G.; Durning, M.; Harris, C.P.; Becker, R.A.; Hearn, J.P. Isolation of a Primate Embryonic Stem Cell Line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7844–7848. [[CrossRef](#)]
62. Thomson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.S.; Waknitz, M.A.; Swiergiel, J.J.; Marshall, V.S.; Jones, J.M. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **1998**, *282*, 1145–1147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Eguizabal, C.; Aran, B.; Lopes, S.M.C.D.S.; Geens, M.; Heindryckx, B.; Panula, S.; Popovic, M.; Vassena, R.; Veiga, A. Two decades of embryonic stem cells: A historical overview. *Hum. Rep. Open* **2019**, *2019*, hoy024. [[CrossRef](#)]

64. Colman, A. Profile of John Gurdon and Shinya Yamanaka, 2012 Nobel Laureates in Medicine or Physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 5740–5741. [[CrossRef](#)]
65. Gurdon, J.B.; Elsdale, T.R.; Fischberg, M. Sexually Mature Individuals of *Xenopus laevis* from the Transplantation of Single Somatic Nuclei. *Nat. Cell Biol.* **1958**, *182*, 64–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Gurdon, J. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev. Biol.* **1962**, *4*, 256–273. [[CrossRef](#)]
67. Halley-Stott, R.P.; Pasque, V.; Gurdon, J.B. Nuclear reprogramming. *Development* **2013**, *140*, 2468–2471. [[CrossRef](#)]
68. Takahashi, K.; Yamanaka, S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 183–193. [[CrossRef](#)]
69. Yamanaka, S. Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 678–684. [[CrossRef](#)]
70. Yamanaka, S.; Blau, H.M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *465*, 704–712. [[CrossRef](#)]
71. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Avilion, A.A.; Nicolis, S.K.; Pevny, L.H.; Perez, L.; Vivian, N.; Lovell-Badge, R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 126–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Nichols, J.; Zevnik, B.; Anastasiadis, K.; Niwa, H.; Klewe-Nebenius, D.; Chambers, I.; Schöler, H.; Smith, A. Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor. *Cell* **1998**, *95*, 379–391. [[CrossRef](#)]
74. Niwa, H.; Miyazaki, J.-I.; Smith, A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* **2000**, *24*, 372–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Cartwright, P.; McLean, C.; Sheppard, A.; Rivett, D.; Jones, K.; Dalton, S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* **2005**, *132*, 885–896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Li, Y.; McClintock, J.; Zhong, L.; Edenberg, H.J.; Yoder, M.C.; Chan, R.J. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor. *Blood* **2005**, *105*, 635–637. [[CrossRef](#)]
77. Rauch, C.; Feifel, E.; Kern, G.; Murphy, C.; Meier, F.; Parson, W.; Beilmann, M.; Jennings, P.; Gstraunthaler, G.; Wilmes, A. Differentiation of human iPSCs into functional podocytes. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0203869. [[CrossRef](#)]
78. Song, B.; Smink, A.M.; Jones, C.V.; Callaghan, J.M.; Firth, S.D.; Bernard, C.A.; Laslett, A.L.; Kerr, P.G.; Ricardo, S.D. The Directed Differentiation of Human iPSCs into Kidney Podocytes. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46453. [[CrossRef](#)]
79. Fernandopulle, M.S.; Prestil, R.; Grunseich, C.; Wang, C.; Gan, L.; Ward, M.E. Transcription Factor-Mediated Differentiation of Human iPSCs into Neurons. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2018**, *79*, e51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Yoder, M.C. Differentiation of pluripotent stem cells into endothelial cells. *Curr. Opin. Hematol.* **2015**, *22*, 252–257. [[CrossRef](#)]
81. Acimovic, I.; Vilotic, A.; Pesl, M.; Lacampagne, A.; Dvorak, P.; Rotrekl, V.; Meli, A.C. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as Research and Therapeutic Tools. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–14. [[CrossRef](#)]
82. Deng, Y.I.; Verron, E.; Rohanizadeh, R. Molecular Mechanisms of Anti-metastatic Activity of Curcumin. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 5639–5648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Qin, Y.; Xiao, L.; Zhan, X.; Zhou, H. Pdx1 and its role in activating Ngn3 and Pax6 to induce differentiation of iPSCs into islet β cells. *Genet. Mol. Res.* **2015**, *14*, 8892–8900. [[CrossRef](#)]
84. Mianné, J.; Ahmed, E.; Bourguignon, C.; Fieldes, M.; Vachier, I.; Bourdin, A.; Assou, S.; De Vos, J. Induced Pluripotent Stem Cells for Primary Ciliary Dyskinesia Modeling and Personalized Medicine. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2018**, *59*, 672–683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Akkerman, N.; Defize, L.H. Dawn of the organoid era. *BioEssays* **2017**, *39*, 1600244. [[CrossRef](#)]
86. Huch, M.; Knoblich, J.A.; Lutolf, M.P.; Martinez-Arias, A. The hope and the hype of organoid research. *Development* **2017**, *144*, 938–941. [[CrossRef](#)]
87. Rossi, G.; Manfrin, A.; Lutolf, M.P. Progress and potential in organoid research. *Nat. Rev. Genet.* **2018**, *19*, 671–687. [[CrossRef](#)]
88. Brazovskaja, A.; Treutlein, B.; Camp, J.G. High-throughput single-cell transcriptomics on organoids. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *55*, 167–171. [[CrossRef](#)]
89. Di Lullo, E.; Kriegstein, A.R. The use of brain organoids to investigate neural development and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2017**, *18*, 573–584. [[CrossRef](#)]
90. Heide, M.; Huttner, W.B.; Mora-Bermúdez, F. Brain organoids as models to study human neocortex development and evolution. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2018**, *55*, 8–16. [[CrossRef](#)]
91. Seto, Y.; Eiraku, M. Human brain development and its in vitro recapitulation. *Neurosci. Res.* **2019**, *138*, 33–42. [[CrossRef](#)]
92. Serra, D.; Mayr, U.; Boni, A.; Lukonin, I.; Rempfler, M.; Meylan, L.C.; Stadler, M.B.; Strnad, P.; Papasaikas, P.; Vischi, D.; et al. Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *569*, 66–72. [[CrossRef](#)]
93. Yin, Y.-B.; De Jonge, H.R.; Wu, X.; Yin, Y.-L. Mini-gut: A promising model for drug development. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 1784–1794. [[CrossRef](#)]
94. Nishinakamura, R. Human kidney organoids: Progress and remaining challenges. *Nat. Rev. Nephrol.* **2019**, *15*, 613–624. [[CrossRef](#)]
95. Hulot, J.-S. Modeling Cardiac Arrhythmias with Organoids. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2019**, *73*, 2325–2327. [[CrossRef](#)]
96. Nugraha, B.; Buono, M.F.; Von Boehmer, L.; Hoerstrup, S.P.; Emmert, M.Y. Human Cardiac Organoids for Disease Modeling. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2019**, *105*, 79–85. [[CrossRef](#)]

97. Pesl, M.; Acimovic, I.; Pribyl, J.; Hezova, R.; Vilotic, A.; Fauconnier, J.; Vrbsky, J.; Kruzliak, P.; Skladal, P.; Kara, T.; et al. Forced aggregation and defined factors allow highly uniform-sized embryoid bodies and functional cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Heart Vessel*. **2013**, *29*, 834–846. [\[CrossRef\]](#)
98. Brooks, M.J.; Chen, H.Y.; Kelley, R.A.; Mondal, A.K.; Nagashima, K.; De Val, N.; Li, T.; Chaitankar, V.; Swaroop, A. Improved Retinal Organoid Differentiation by Modulating Signaling Pathways Revealed by Comparative Transcriptome Analyses with Development In Vivo. *Stem Cell Rep*. **2019**, *13*, 891–905. [\[CrossRef\]](#)
99. Lee, J.-S.; Kim, B.S.; Seo, D.; Park, J.H.; Cho, D.-W. Three-Dimensional Cell Printing of Large-Volume Tissues: Application to Ear Regeneration. *Tissue Eng. Part C Methods* **2017**, *23*, 136–145. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
100. Liu, T.-K.; Pang, Y.; Zhou, Z.-Z.; Yao, R.; Sun, W. An integrated cell printing system for the construction of heterogeneous tissue models. *Acta Biomater*. **2019**, *95*, 245–257. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
101. Zhang, K.; Chou, C.-K.; Xia, X.; Hung, M.-C.; Qin, L. Block-Cell-Printing for Live Single-Cell Printing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 2948–2953. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
102. Yu, J.; Vodyanik, M.A.; Smuga-Otto, K.; Antosiewicz-Bourget, J.; Frane, J.L.; Tian, S.; Nie, J.; Jonsdottir, G.A.; Ruotti, V.; Stewart, R.; et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* **2007**, *318*, 1917–1920. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
103. Acimovic, I.; Refaat, M.M.; Moreau, A.; Salykin, A.; Reiken, S.; Sleiman, Y.; Souidi, M.; Pribyl, J.; Kajava, A.V.; Richard, S.; et al. Post-Translational Modifications and Diastolic Calcium Leak Associated to the Novel RyR2-D3638A Mutation Lead to CPVT in Patient-Specific hiPSC-Derived Cardiomyocytes. *J. Clin. Med*. **2018**, *7*, 423. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Jelinkova, S.; Vilotic, A.; Pribyl, J.; Amond, F.; Salykin, A.; Acimovic, I.; Pesl, M.; Caluori, G.; Klimovic, S.; Urban, T.; et al. DMD Pluripotent Stem Cell Derived Cardiac Cells Recapitulate in vitro Human Cardiac Pathophysiology. *Front. Bioeng. Biotechnol*. **2020**, *8*, 535. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Park, I.-H.; Arora, N.; Huo, H.; Maherali, N.; Ahfeldt, T.; Shimamura, A.; Lensch, M.W.; Cowan, C.; Hochedlinger, K.; Daley, G.Q. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* **2008**, *134*, 877–886. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Gatinois, V.; Desprat, R.; Becker, F.; Pichard, L.; Bernex, F.; Corsini, C.; Pellestor, F.; Lemaitre, J.-M. Reprogramming of Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) from a patient suffering of a Werner syndrome resulting in iPSC line (REGU1003-A) maintaining a short telomere length. *Stem Cell Res*. **2019**, *39*, 101515. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Gatinois, V.; Desprat, R.; Becker, F.; Pichard, L.; Bernex, F.; Isidor, B.; Pellestor, F.; Lemaitre, J.-M. iPSC line derived from a Bloom syndrome patient retains an increased disease-specific sister-chromatid exchange activity. *Stem Cell Res*. **2020**, *43*, 101696. [\[CrossRef\]](#)
108. Zhang, J.; Lian, Q.; Zhu, G.; Zhou, F.; Sui, L.; Tan, C.; Mutalif, R.A.; Navasankari, R.; Zhang, Y.; Tse, H.-F.; et al. A Human iPSC Model of Hutchinson Gilford Progeria Reveals Vascular Smooth Muscle and Mesenchymal Stem Cell Defects. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 31–45. [\[CrossRef\]](#)
109. Liu, G.-H.; Barkho, B.Z.; Ruiz, S.Z.; Diep, D.; Qu, J.; Yang, S.-L.; Panopoulos, A.D.; Suzuki, K.; Kurian, L.; Walsh, C.T.; et al. Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nat. Cell Biol*. **2011**, *472*, 221–225. [\[CrossRef\]](#)
110. Batista, L.F.Z.; Pech, M.F.; Zhong, F.L.; Nguyen, H.N.; Xie, K.T.; Zaug, A.J.; Crary, S.M.; Choi, J.; Sebastiano, V.; Cherry, A.M.; et al. Telomere shortening and loss of self-renewal in dyskeratosis congenita induced pluripotent stem cells. *Nat. Cell Biol*. **2011**, *474*, 399–402. [\[CrossRef\]](#)
111. Agarwal, S.; Loh, Y.-H.; McLoughlin, E.M.; Huang, J.; Park, I.-H.; Miller, J.D.; Huo, H.; Okuka, M.; Dos Reis, R.M.; Loewer, S.; et al. Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients. *Nat. Cell Biol*. **2010**, *464*, 292–296. [\[CrossRef\]](#)
112. Cheung, H.-H.; Liu, X.; Canterel-Thouennon, L.; Li, L.; Edmonson, C.; Rennert, O.M. Telomerase Protects Werner Syndrome Lineage-Specific Stem Cells from Premature Aging. *Stem Cell Rep*. **2014**, *2*, 534–546. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
113. Zhang, W.; Li, J.; Suzuki, K.; Qu, J.; Wang, P.; Zhou, J.; Liu, X.; Ren, R.; Xu, X.; Ocampo, A.; et al. A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging. *Science* **2015**, *348*, 1160–1163. [\[CrossRef\]](#)
114. Jung, C.B.; Moretti, A.; Schnitzler, M.M.Y.; Iop, L.; Storch, U.; Bellin, M.; Dorn, T.; Ruppenthal, S.; Pfeiffer, S.; Goedel, A.; et al. Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *EMBO Mol. Med*. **2012**, *4*, 180–191. [\[CrossRef\]](#)
115. Sasaki, K.; Makiyama, T.; Yoshida, Y.; Wuriyanghai, Y.; Kamakura, T.; Nishiuchi, S.; Hayano, M.; Harita, T.; Yamamoto, Y.; Kohjitani, H.; et al. Patient-Specific Human Induced Pluripotent Stem Cell Model Assessed with Electrical Pacing Validates S107 as a Potential Therapeutic Agent for Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0164795. [\[CrossRef\]](#)
116. Del Álamo, J.C.; Lemons, D.; Serrano, R.; Savchenko, A.; Cerignoli, F.; Bodmer, R.; Mercola, M. High throughput physiological screening of iPSC-derived cardiomyocytes for drug development. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Res*. **2016**, *1863*, 1717–1727. [\[CrossRef\]](#)
117. Grimm, F.A.; Iwata, Y.; Sirenko, O.; Bittner, M.; Rusyn, I. High-Content Assay Multiplexing for Toxicity Screening in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Hepatocytes. *Assay Drug Dev. Technol*. **2015**, *13*, 529–546. [\[CrossRef\]](#)
118. Pesl, M.; Pribyl, J.; Caluori, G.; Cmiel, V.; Acimovic, I.; Jelinkova, S.; Dvorak, P.; Starek, Z.; Skladal, P.; Rotrekl, V. Phenotypic assays for analyses of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J. Mol. Recognit*. **2017**, *30*, e2602. [\[CrossRef\]](#)

119. Sharma, A.; McKeithan, W.L.; Serrano, R.; Kitani, T.; Burridge, P.W.; Del Álamo, J.C.; Mercola, M.; Wu, J.C. Use of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to assess drug cardiotoxicity. *Nat. Protoc.* **2018**, *13*, 3018–3041. [[CrossRef](#)]
120. Sharma, A.; Burridge, P.W.; McKeithan, W.L.; Serrano, R.; Shukla, P.; Sayed, N.; Churko, J.M.; Kitani, T.; Wu, H.; Holmström, A.; et al. High-throughput screening of tyrosine kinase inhibitor cardiotoxicity with human induced pluripotent stem cells. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, eaaf2584. [[CrossRef](#)]
121. Paik, D.T.; Chandy, M.; Wu, J.C. Patient and Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells for Discovery of Personalized Cardiovascular Drugs and Therapeutics. *Pharmacol. Rev.* **2020**, *72*, 320–342. [[CrossRef](#)]
122. Perkhof, L.; Frappart, P.-O.; Müller, M.; Kleger, A. Importance of organoids for personalized medicine. *Pers. Med.* **2018**, *15*, 461–465. [[CrossRef](#)]
123. Takahashi, T. Organoids for Drug Discovery and Personalized Medicine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2019**, *59*, 447–462. [[CrossRef](#)]
124. Yokouchi, Y.; Suzuki, S.; Ohtsuki, N.; Yamamoto, K.; Noguchi, S.; Soejima, Y.; Goto, M.; Ishioka, K.; Nakamura, I.; Suzuki, S.; et al. Rapid repair of human disease-specific single-nucleotide variants by One-SHOT genome editing. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–13. [[CrossRef](#)]
125. Beghini, D.G.; Horita, S.I.; Cascabulho, C.M.; Alves, L.A.; Henriques-Pons, A. Induced Pluripotent Stem Cells: Hope in the Treatment of Diseases, including Muscular Dystrophies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Li, H.L.; Fujimoto, N.; Sasakawa, N.; Shirai, S.; Ohkame, T.; Sakuma, T.; Tanaka, M.; Amano, N.; Watanabe, A.; Sakurai, H.; et al. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas. *Stem Cell Rep.* **2015**, *4*, 143–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Long, C.; Li, H.; Tiburcy, M.; Rodriguez-Caycedo, C.; Kyrychenko, V.; Zhou, H.; Zhang, Y.; Min, Y.-L.; Shelton, J.M.; Mammen, P.P.A.; et al. Correction of diverse muscular dystrophy mutations in human engineered heart muscle by single-site genome editing. *Sci. Adv.* **2018**, *4*, eaap9004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Lapasset, L.; Milhavel, O.; Prieur, A.; Besnard, E.; Babled, A.; Ait-Hamou, N.; Leschik, J.; Pellestor, F.; Ramirez, J.-M.; De Vos, J.; et al. Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 2248–2253. [[CrossRef](#)]
129. Okita, K.; Ichisaka, T.; Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *448*, 313–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Rebuzzini, P.; Zuccotti, M.; Redi, C.A.; Garagna, S. Achilles' heel of pluripotent stem cells: Genetic, genomic and epigenetic variations during prolonged culture. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 2453–2466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Tosca, L.; Féraud, O.; Magniez, A.; Bas, C.; Griscelli, F.; Bennaceur-Griscelli, A.; Tachdjian, G. Genomic instability of human embryonic stem cell lines using different passaging culture methods. *Mol. Cytogenet.* **2015**, *8*, 1–11. [[CrossRef](#)]
132. Wang, J.; Hao, J.; Bai, D.; Gu, Q.; Han, W.; Wang, L.; Tan, Y.; Li, X.; Xue, K.; Han, P.; et al. Generation of clinical-grade human induced pluripotent stem cells in Xeno-free conditions. *Stem Cell Res. Ther.* **2015**, *6*, 223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Mallon, B.S.; Park, K.-Y.; Chen, K.G.; Hamilton, R.S.; McKay, R.D.G. Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 1063–1075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Gagliano, O.; Luni, C.; Qin, W.; Bertin, E.; Torchio, E.; Galvanin, S.; Urciuolo, A.; Elvassore, N. Microfluidic reprogramming to pluripotency of human somatic cells. *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 722–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Luni, C.; Giulitti, S.; Serena, E.; Ferrari, L.; Zambon, A.; Gagliano, O.; Giobbe, G.G.; Michielin, F.; Knöbel, S.; Bosio, A.; et al. High-efficiency cellular reprogramming with microfluidics. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *13*, 446–452. [[CrossRef](#)]
136. Barry, J.; Hyllner, J.; Stacey, G.; Taylor, C.J.; Turner, M. Setting Up a Haplobank: Issues and Solutions. *Curr. Stem Cell Rep.* **2015**, *1*, 110–117. [[CrossRef](#)]
137. Gourraud, P.-A.; Gilson, L.; Girard, M.; Peschanski, M. The Role of Human Leukocyte Antigen Matching in the Development of Multiethnic “Haplobank” of Induced Pluripotent Stem Cell Lines. *Stem Cells* **2012**, *30*, 180–186. [[CrossRef](#)]
138. Lee, S.; Huh, J.Y.; Turner, D.M.; Lee, S.; Robinson, J.; Stein, J.E.; Shim, S.H.; Hong, C.P.; Kang, M.S.; Nakagawa, M.; et al. Repurposing the Cord Blood Bank for Haplobanking of HLA-Homozygous iPSCs and Their Usefulness to Multiple Populations. *Stem Cells* **2018**, *36*, 1552–1566. [[CrossRef](#)]
139. Deuse, T.; Hu, X.; Gravina, A.; Wang, D.; Tediashvili, G.; De, C.; Thayer, W.O.; Wahl, A.; Garcia, J.V.; Reichenspurner, H.; et al. Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 252–258. [[CrossRef](#)]
140. Jones, B.S.; Lamb, L.S.; Egoldman, F.; Stasi, A.E. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 254. [[CrossRef](#)]
141. Liang, Q.; Monetti, C.; Shutova, M.V.; Neely, E.J.; Hacibekiroglu, S.; Yang, H.; Kim, C.; Zhang, P.; Li, C.; Nagy, K.; et al. Linking a cell-division gene and a suicide gene to define and improve cell therapy safety. *Nat. Cell Biol.* **2018**, *563*, 701–704. [[CrossRef](#)]
142. Yamanaka, S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* **2020**, *27*, 523–531. [[CrossRef](#)]
143. Iwanami, A.; Kaneko, S.; Nakamura, M.; Kanemura, Y.; Mori, H.; Kobayashi, S.; Yamasaki, M.; Momoshima, S.; Ishii, H.; Ando, K.; et al. Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J. Neurosci. Res.* **2005**, *80*, 182–190. [[CrossRef](#)]
144. Kobayashi, Y.; Okada, Y.; Itakura, G.; Iwai, H.; Nishimura, S.; Yasuda, A.; Nori, S.; Hikishima, K.; Konomi, T.; Fujiyoshi, K.; et al. Pre-Evaluated Safe Human iPSC-Derived Neural Stem Cells Promote Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Common Marmoset without Tumorigenicity. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52787. [[CrossRef](#)]

145. Nori, S.; Okada, Y.; Yasuda, A.; Tsuji, O.; Takahashi, Y.; Kobayashi, Y.; Fujiyoshi, K.; Koike, M.; Uchiyama, Y.; Ikeda, E.; et al. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16825–16830. [[CrossRef](#)]
146. Chen, W.; Jongkamonwiwat, N.; Abbas, L.; Eshtan, S.J.; Johnson, S.L.; Kuhn, S.; Milo, M.; Thurlow, J.K.; Andrews, P.W.; Marcotti, W.; et al. Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *490*, 278–282. [[CrossRef](#)]
147. Duncan, T.; Valenzuela, M. Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 1–9. [[CrossRef](#)]
148. González, C.; Bonilla, S.; Flores, A.I.; Cano, E.; Liste, I. An Update on Human Stem Cell-Based Therapy in Parkinson's Disease. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **2016**, *11*, 561–568. [[CrossRef](#)]
149. Sonntag, K.-C.; Song, B.; Lee, N.; Jung, J.H.; Cha, Y.; Leblanc, P.; Neff, C.; Kong, S.W.; Carter, B.S.; Schweitzer, J.; et al. Pluripotent stem cell-based therapy for Parkinson's disease: Current status and future prospects. *Prog. Neurobiol.* **2018**, *168*, 1–20. [[CrossRef](#)]
150. Hallett, P.J.; Deleidi, M.; Astradsson, A.; Smith, G.A.; Cooper, O.; Osborn, T.M.; Sundberg, M.; Moore, M.A.; Perez-Torres, E.; Brownell, A.-L.; et al. Successful Function of Autologous iPSC-Derived Dopamine Neurons following Transplantation in a Non-Human Primate Model of Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell* **2015**, *16*, 269–274. [[CrossRef](#)]
151. Ben M'Barek, K.; Monville, C. Cell Therapy for Retinal Dystrophies: From Cell Suspension Formulation to Complex Retinal Tissue Bioengineering. *Stem Cells Int.* **2019**, *2019*, 1–14. [[CrossRef](#)]
152. Morizur, L.; Herardot, E.; Monville, C.; Ben M'Barek, K.; Elise, H.; Christelle, M.; Karim, B.M. Human pluripotent stem cells: A toolbox to understand and treat retinal degeneration. *Mol. Cell. Neurosci.* **2020**, *107*, 103523. [[CrossRef](#)]
153. Mandai, M.; Watanabe, A.; Kurimoto, Y.; Hirami, Y.; Morinaga, C.; Daimon, T.; Fujihara, M.; Akimaru, H.; Sakai, N.; Shibata, Y.; et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1038–1046. [[CrossRef](#)]
154. Suchy, F.; Nakauchi, H. Interspecies chimeras. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2018**, *52*, 36–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Suchy, F.; Yamaguchi, T.; Nakauchi, H. iPSC-Derived Organs In Vivo: Challenges and Promise. *Cell Stem Cell* **2018**, *22*, 21–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Kobayashi, T.; Yamaguchi, T.; Hamanaka, S.; Kato-Itoh, M.; Yamazaki, Y.; Ibata, M.; Sato, H.; Lee, Y.-S.; Usui, J.-I.; Knisely, A.; et al. Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells. *Cell* **2010**, *142*, 787–799. [[CrossRef](#)]
157. Yamaguchi, T.; Sato, H.; Kato-Itoh, M.; Goto, T.; Hara, H.; Sanbo, M.; Mizuno, N.; Kobayashi, T.; Yanagida, A.; Umino, A.; et al. Interspecies organogenesis generates autologous functional islets. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *542*, 191–196. [[CrossRef](#)]
158. Usui, J.-I.; Kobayashi, T.; Yamaguchi, T.; Knisely, A.; Nishinakamura, R.; Nakauchi, H. Generation of Kidney from Pluripotent Stem Cells via Blastocyst Complementation. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180*, 2417–2426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Wu, J.; Platero-Luengo, A.; Sakurai, M.; Sugawara, A.; Gil, M.A.; Yamauchi, T.; Suzuki, K.; Bogliotti, Y.S.; Cuello, C.; Valencia, M.M.; et al. Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell* **2017**, *168*, 473–486.e15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Nishimura, T.; Suchy, F.P.; Bhadury, J.; Igarashi, K.J.; Charlesworth, C.T.; Nakauchi, H. Generation of Functional Organs Using a Cell-Competitive Niche in Intra- and Inter-species Rodent Chimeras. *Cell Stem Cell* **2021**, *28*, 141–149.e3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Brons, I.G.M.; Smithers, L.E.; Trotter, M.W.B.; Rugg-Gunn, P.; Sun, B.; Lopes, S.M.C.D.S.; Howlett, S.K.; Clarkson, A.; Ahrlund-Richter, L.; Pedersen, R.A.; et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *448*, 191–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Tesar, P.J.; Chenoweth, J.G.; Brook, F.A.; Davies, T.J.; Evans, E.P.; Mack, D.L.; Gardner, R.L.; McKay, R.D.G. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *448*, 196–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Angeles, A.D.L.; Ferrari, F.; Xi, R.; Fujiwara, Y.; Benvenisty, N.; Deng, H.; Hochedlinger, K.; Jaenisch, R.; Lee, S.; Leitch, H.G.; et al. Hallmarks of pluripotency. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *525*, 469–478. [[CrossRef](#)]
164. Hu, Z.; Li, H.; Jiang, H.; Ren, Y.; Yu, X.; Qiu, J.; Stablewski, A.B.; Zhang, B.; Buck, M.J.; Feng, J. Transient inhibition of mTOR in human pluripotent stem cells enables robust formation of mouse-human chimeric embryos. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaaz0298. [[CrossRef](#)]
165. Kilens, S.; Meistermann, D.; Moreno, D.; Chariou, C.; Gaignerie, A.; Reignier, A.; Lelièvre, Y.; Casanova, M.; Vallot, C.; Nedellec, S.; et al. Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–13. [[CrossRef](#)]
166. Theunissen, T.W.; Friedli, M.; He, Y.; Planet, E.; O'Neil, R.C.; Markoulaki, S.; Pontis, J.; Wang, H.; Iouranova, A.; Imbeault, M.; et al. Molecular Criteria for Defining the Naive Human Pluripotent State. *Cell Stem Cell* **2016**, *19*, 502–515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Banito, A.; Rashid, S.T.; Acosta, J.C.; Li, S.; Pereira, C.F.; Geti, I.; Pinho, S.; Silva, J.C.; Azuara, V.; Walsh, M.; et al. Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 2134–2139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Li, H.; Collado, M.; Villasante, A.; Strati, K.; Ortega, S.; Cañamero, M.; Blasco, M.A.; Serrano, M. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *460*, 1136–1139. [[CrossRef](#)]
169. Marión, R.M.; Strati, K.; Li, H.; Murga, M.; Blanco, R.; Ortega, S.; Fernandez-Capetillo, O.; Serrano, M.; Blasco, M.A. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *460*, 1149–1153. [[CrossRef](#)]
170. Hayashi, Y.; Hsiao, E.C.; Sami, S.; Lancero, M.; Schlieve, C.R.; Nguyen, T.; Yano, K.; Nagahashi, A.; Ikeya, M.; Matsumoto, Y.; et al. BMP-SMAD-ID promotes reprogramming to pluripotency by inhibiting p16/INK4A-dependent senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 13057–13062. [[CrossRef](#)]

171. Hong, H.; Takahashi, K.; Ichisaka, T.; Aoi, T.; Kanagawa, O.; Nakagawa, M.; Okita, K.; Yamanaka, S. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53–p21 pathway. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *460*, 1132–1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Utikal, J.; Polo, J.M.; Stadtfeld, M.; Maherali, N.; Kulalert, W.; Walsh, R.M.; Khalil, A.; Rheinwald, J.G.; Hochedlinger, K. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *460*, 1145–1148. [[CrossRef](#)]
173. Kawamura, T.; Suzuki, J.; Wang, Y.V.; Menendez, S.; Morera, L.B.; Raya, A.; Wahl, G.M.; Belmonte, J.C.I. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *460*, 1140–1144. [[CrossRef](#)]
174. Mahmoudi, S.; Mancini, E.; Xu, L.; Moore, A.; Jahanbani, F.; Hebestreit, K.; Srinivasan, R.; Li, X.; Devarajan, K.; Prélôt, L.; et al. Heterogeneity in old fibroblasts is linked to variability in reprogramming and wound healing. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *574*, 553–558. [[CrossRef](#)]
175. Marion, R.M.; Strati, K.; Li, H.; Tejera, A.; Schoeftner, S.; Ortega, S.; Serrano, M.; Blasco, M.A. Telomeres Acquire Embryonic Stem Cell Characteristics in Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **2009**, *4*, 141–154. [[CrossRef](#)]
176. Suhr, S.T.; Chang, E.A.; Tjong, J.; Alcasid, N.; Perkins, G.A.; Goissis, M.D.; Ellisman, M.H.; Perez, G.I.; Cibelli, J.B. Mitochondrial Rejuvenation After Induced Pluripotency. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e14095. [[CrossRef](#)]
177. Abad, M.; Mosteiro, L.; Pantoja, C.; Cañamero, M.; Rayon, T.; Ors, I.; Graña, O.; Megías, D.; Domínguez, O.; Martínez, D.; et al. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *502*, 340–345. [[CrossRef](#)]
178. Ohnishi, K.; Semi, K.; Yamamoto, T.; Shimizu, M.; Tanaka, A.; Mitsunaga, K.; Okita, K.; Osafune, K.; Arioka, Y.; Maeda, T.; et al. Premature Termination of Reprogramming In Vivo Leads to Cancer Development through Altered Epigenetic Regulation. *Cell* **2014**, *156*, 663–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Mosteiro, L.; Pantoja, C.; Alcazar, N.; Marión, R.M.; Chondronasiou, D.; Rovira, M.; Fernandez-Marcos, P.J.; Muñoz-Martin, M.; Blanco-Aparicio, C.; Pastor, J.; et al. Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* **2016**, *354*, aaf4445. [[CrossRef](#)]
180. Chiche, A.; Le Roux, I.; von Joest, M.; Sakai, H.; Aguin, S.B.; Cazin, C.; Salam, R.; Fiette, L.; Alegria, O.; Flamant, P.; et al. Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. *Cell Stem Cell* **2017**, *20*, 407–414.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Ocampo, A.; Reddy, P.; Martinez-Redondo, P.; Platero-Luengo, A.; Hatanaka, F.; Hishida, T.; Li, M.; Lam, D.; Kurita, M.; Beyret, E.; et al. In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell* **2016**, *167*, 1719–1733.e12. [[CrossRef](#)]
182. Carey, B.W.; Markoulaki, S.; Beard, C.; Hanna, J.; Jaenisch, R. Single-gene transgenic mouse strains for reprogramming adult somatic cells. *Nat. Methods* **2009**, *7*, 56–59. [[CrossRef](#)]
183. Osorio, F.G.; Navarro, C.L.; Cadiñanos, J.; López-Mejía, I.C.; Quirós, P.M.; Bartoli, C.; Rivera, J.; Tazi, J.; Guzmán, G.; Varela, I.; et al. Splicing-Directed Therapy in a New Mouse Model of Human Accelerated Aging. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 106ra107. [[CrossRef](#)]
184. Doeser, M.C.; Schöler, H.R.; Wu, G. Reduction of Fibrosis and Scar Formation by Partial Reprogramming In Vivo. *Stem Cells* **2018**, *36*, 1216–1225. [[CrossRef](#)]
185. Rodríguez-Matellán, A.; Alcazar, N.; Hernández, F.; Serrano, M.; Ávila, J. In Vivo Reprogramming Ameliorates Aging Features in Dentate Gyrus Cells and Improves Memory in Mice. *Stem Cell Rep.* **2020**, *15*, 1056–1066. [[CrossRef](#)]
186. Sarkar, T.J.; Quarta, M.; Mukherjee, S.; Colville, A.; Paine, P.; Doan, L.; Tran, C.M.; Chu, C.R.; Horvath, S.; Qi, L.S.; et al. Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Senís, E.; Mosteiro, L.; Wilkening, S.; Wiedtke, E.; Nowrouzi, A.; Afzal, S.; Fronza, R.; Landerer, H.; Abad, M.; Niopek, D.; et al. AAV vector-mediated in vivo reprogramming into pluripotency. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Lu, Y.; Brommer, B.; Tian, X.; Krishnan, A.; Meer, M.; Wang, C.; Vera, D.L.; Zeng, Q.; Yu, D.; Bonkowski, M.S.; et al. Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *588*, 124–129. [[CrossRef](#)]
189. Olova, N.; Simpson, D.J.; Marioni, R.E.; Chandra, T. Partial reprogramming induces a steady decline in epigenetic age before loss of somatic identity. *Aging Cell* **2018**, *18*, e12877. [[CrossRef](#)]

RESUME

Le vieillissement est un processus complexe qui se caractérise par l'altération progressive de la physiologie cellulaire et tissulaire. Modulé par des facteurs génétiques et épigénétiques, il s'accompagne d'une modification du métabolisme cellulaire, d'une diminution de la résistance aux différents stress cellulaires et de la sénescence cellulaire. L'objectif de ce travail est d'utiliser la reprogrammation cellulaire comme stratégie visant à retarder les effets du vieillissement, en induisant un rajeunissement global ou en améliorant les capacités régénératrices de l'organisme.

L'expression de quatre facteurs de transcription : OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC (OSKM) permet l'induction de la reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes. Procéder à une reprogrammation dite transitoire, c'est-à-dire initier le processus sans atteindre l'état de pluripotence, a un effet immédiat qui efface en partie les marques caractéristiques du vieillissement des tissus et des cellules. Afin de déterminer comment une courte reprogrammation cellulaire transitoire réalisée précocement affecte les processus de vieillissement chez un animal entier, nous avons induit l'expression d'OSKM chez des souris progériques reprogrammables jeunes et avons révélé une augmentation de la longévité sur les âges tardifs et un effet protecteur sur l'intégrité des structures tissulaires et sur les pathologies liées à l'âge, associé à des modifications des signatures épigénétiques dans les tissus. Ces résultats sur les âges tardifs après une reprogrammation transitoire précoce suggèrent un effet mémoire, se maintenant tout au long de la vie. Afin d'expliquer ces effets à long terme, nous avons exploré l'impact d'une reprogrammation transitoire précoce sur le métabolisme. Nous avons pu mettre en évidence une modification globale de la composition corporelle des animaux, avec un ralentissement de la prise de masse grasse dans les âges jeunes et un maintien de cette même masse grasse dans les âges tardifs, associé à une modification globale de l'ultrastructure et de l'activité métabolique du tissu adipeux blanc. Cette transition métabolique semble aussi impacter le tissu musculaire selon une dynamique qui lui est propre.

L'identification des mécanismes sous-jacents nous permettra de définir de nouvelles stratégies pour prévenir le vieillissement et la sénescence, à l'origine de l'apparition des pathologies liées à l'âge.

Mots clés : vieillissement, sénescence, cellules souches, régénération, reprogrammation, métabolisme, épigénétique.

ABSTRACT

Aging is a complex process characterized by the progressive alteration of cellular and tissue physiology. Modulated by genetic and epigenetic factors, it is accompanied by a modification of the cellular metabolism, a decrease in resistance to various cellular stresses and cellular senescence. The objective of this work is to use cell reprogramming as a strategy to delay the effects of aging by inducing global rejuvenation or by improving the regenerative capacities of the organism.

The expression of four transcription factors: OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC (OSKM) allows the induction of somatic cell reprogramming into pluripotent cells. This so-called transient reprogramming, i.e., initiating the process without leading to the pluripotent state, has an immediate effect that partially erases the characteristic marks of tissue and cell aging. In order to determine how an early short transient cellular reprogramming affects aging processes in a whole animal, we induced OSKM expression in young progeric reprogrammable mice and revealed an increase in longevity at late ages and a protective effect on the integrity of tissue structures and on age-related pathologies, associated with modifications of epigenetic signatures in tissues. These results on late ages after an early transient reprogramming suggest a memory effect maintained throughout life. To explain these long-term effects, we explored the impact of an early transient reprogramming on metabolism. We were able to demonstrate a global modification of the body composition of the animals with a decrease of the fat mass gain in the young ages and a maintenance of this same fat mass in the late ages associated with a global modification of the ultrastructure and the metabolic activity of the white adipose tissue. This metabolic transition also seems to impact the muscle tissue with its own dynamics.

The identification of the underlying mechanisms will allow us to define new strategies to prevent aging and senescence, which are at the origin of the appearance of age-related pathologies.

Keywords: aging, senescence, stem cells, regeneration, reprogramming, metabolism, epigenetic.