



Rôle et régulation de l'haptoglobine adipocytaire au cours du vieillissement

Gwendoline Astre

► To cite this version:

Gwendoline Astre. Rôle et régulation de l'haptoglobine adipocytaire au cours du vieillissement. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30214 . tel-02316090

HAL Id: tel-02316090

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02316090>

Submitted on 15 Oct 2019

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

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Gwendoline ASTRE

Le 16 novembre 2018

Rôle et régulation de l'haptoglobine adipocytaire au cours du vieillessement

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **SCIENCES DU VIEILLISSEMENT**

Unité de recherche :

I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par

Isabelle CASTAN-LAURELL

Jury

M. Jean-François TANTI, Rapporteur

Mme Fabienne FOUFELLE, Rapporteur

M. Jacques GROBER, Rapporteur

M. Jérôme FEIGE, Examineur

Mme Catherine MULLER, Examineur

Mme Isabelle CASTAN-LAURELL, Directeur de thèse

M. Cédric DRAY, Co-directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres de mon jury de thèse, le Pr Catherine Muller, le Dr Fabienne Foufelle, le Dr Jacques Grober, le Dr Jean-François Tanti et le Dr Jérôme Feige, qui m'ont fait l'honneur de lire, d'évaluer mon manuscrit et de participer à mon jury de thèse. Cette journée fut une discussion très enrichissante.

A présent je vais remercier la famille *Adipolab*, dans laquelle j'ai passé de très belles années tant sur le plan scientifique qu'humain !

Un grand merci à mon chef, le Dr **Cédric** Dray, que je ne jugerai jamais d'écouter Maître Gims lors de ses footings... Bien que très occupé avec l'enseignement, les *petits*, les moyens, et les **GRANDS** projets scientifiques, le petit Sacha, et ton architecte je te remercie d'avoir toujours répondu présent notamment pour nos « Drayunions » que tu chérissais tant. Merci de ne pas (trop) avoir perdu patience à répéter cinq fois les mêmes choses car je doutais. Merci de m'avoir fait participer à différents projets allant de l'obésité, au vieillissement en passant par un peu de POCD (tu nous dois toujours une pizza pour le FACS nocturne de François). Ces quasi 4 années ont été intenses sur le plan humain : tu es devenu papa, et tu as également dû jongler avec mon caractère (similaire au tien) ; mais aussi sur le plan scientifique : co-directeur d'équipe, responsable de master/projets divers, rédaction d'un gros papier (encore bravo !). J'ai beaucoup appris à tes côtés. J'ai également développé ma patience et mon self-control grâce au « tofu chinois ». Mon besoin de tout vouloir anticiper et contrôler n'a pas été arrêté par un post-doctorat à l'étranger en Israël, loin de là ! Tu as su me convaincre (un peu) que je n'étais pas là « par hasard ». Que je ne suis pas si nulle que ça. Et bien que la destination étonne encore pas mal de monde, cela te donnera peut-être l'opportunité de visiter une partie de ta famille (la vraie, pas les poissons). Encore merci, j'espère très sincèrement de futures collaborations.

Je remercie le maître de cette équipe, le Pr **Philippe** Valet, pour être venu chercher le petit oiseau tombé du concours. Merci de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire, et pour les conseils stimulants que j'ai eu la chance de recevoir de votre part. Et merci de m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail de recherche.

Merci au Pr **Isabelle** Castan-Laurell, ma voisine ramonvilloise, de m'avoir conseillée, soutenue et critiquée dans mon travail. Merci également pour toutes les discussions que nous avons partagées, pour ton écoute et tes précieux conseils !

Je remercie également les autres membres de l'équipe : *nos chercheurs*. **Bernard** Masri, pour nos pauses, les blagues, les fous rires, et les discussions philosophiques jusqu'à 21h au laboratoire. **Armelle** Yart, pour ta gentillesse, tes conseils et ta discrétion légendaire. **Jean-Philippe** Pradère, pour ta spontanéité et tes conseils scientifiques avisés. Je te remercie également d'avoir implanté Radio FIP dans le laboratoire. Je t'attends à Jérusalem ! *Nos technicien(ne)s/ingénieur(e)s passé(e)s* : **Simon** Deleruyelle et **Aurélie** Batut pour votre bienveillance dès mon arrivée en 2015. Merci pour votre aide précieuse ! **Elsa** Moreau, alias Zaza, pour ta bonne humeur (surtout en période menstruelle) et notre danse de la morue dans le laboratoire. *Celles qui sont là* : **Vanessa** Bouguetoch, arrivée il y a peu, tu deviendras la

reine du poisson ! Grâce à toi et **Alizée** Dortignac je suis allée deux fois en boîte en moins d'un mois, le record de ma vie. Alizée tu étais un petit bébé à ton arrivée, tu es et resteras toujours le bébé de l'équipe. Je te souhaite beaucoup de bonheur ! Avec **Johanna** Auriau, je vous remercie de votre aide précieuse au laboratoire ! Je remercie **Sophie** Le Gonidec, pour ta bonne humeur et ta disponibilité à essayer de m'apprendre à faire des points de suture corrects. A mes deux techniciennes qui sont devenues de vraies amies, **Ophélie** Pereira et **Nancy** Geoffre. Vous avez plusieurs casquettes : mamans, sœurs, amies, collègues. Cela paraissait difficile de succéder à **Karine** Tréguer, votre amie, partant pour une nouvelle vie. J'en profite pour la remercier pour ses précieux conseils avant son départ, sa disponibilité ensuite et son organisation hors pair ! Les filles, je vous remercie de m'avoir sortie et nourrie en cette période de jeûne qu'était l'écriture du manuscrit et l'oral de soutenance. Merci de m'avoir supportée, et de ne pas m'avoir balancée par-dessus un pont car j'étais persuadée de ne rien valoir. Prenez bien soin des affaires que je vous laisse avant mon départ. Nancy, ne dors pas avec mon plongeur de cuisine, ça peut faire mal. Je compte sur vous pour penser à moi en faisant une machine de linge et en mangeant du fromage :-). A très bientôt au pays des kippas !

Un grand merci à mes deux acolytes de bureau, **Jean** Personnaz et **Romain** Paccoud, l'ambiance et les odeurs masculines vont me manquer ! On a été les premiers dans ce « bureau des thésards ». S'ils pouvaient parler... #RLDP ! Je vous souhaite le meilleur dans vos vies maritales et professionnelles. Je vous dis à bientôt par Skype :-)

Pour finir, **Veronika** Mayerova. Nous nous sommes connues tu étais en thèse dans l'équipe d'à côté, et nous avons beaucoup partagé en salle de culture et également à Prague lors de notre venue avec les filles ! Merci pour ton humeur égale ! **Sophie** Branka et **Enzo** Piccolo, je vous souhaite le meilleur et une jolie fin de thèse. N'oubliez pas que cette aventure est la vôtre, ne regrettez rien, ne lâchez rien !

J'adresse aussi mes remerciements aux personnes qui m'ont permis de découvrir l'enseignement pendant cette thèse : le Pr Jean-Edouard Gairin, le Dr Fabienne Thomas et le Dr Emilie Jouanjus.

Je tiens à remercier les stagiaires qui ont été avec moi et qui ont eu du mal à me suivre dans les couloirs : Thibaut, Lucile, Marion, Marie, Marie, Marie, numéro 7, numéro 8 etc. Nous ne devions pas travailler ensemble mais le projet POCD nous a rapproché : **Adeline** Dolsan-Chapelier, bien que ce fut difficile pour toi de suivre notre cadence et nos idées farfelues, surtout le ventre plein, tu es une personne sincère et je te remercie de ta confiance et de ta gentillesse !

Mes remerciements vont également aux personnes ayant partagé un bout de paillasse (et parfois quelques verres) : *des anciens* Sophie Bonnel, Claude Knauf, Christian Carpéné, Audren, Alysso, *des voisins de couloir* Marie-Adeline, Aline, Déborah, Fred, Jean-José, Sergent-Chef... **Jean** Galitzky, tu m'as appris à être patiente et obtenir un protocole en 4 fois dès mon arrivée :-). Merci pour tes conseils, ton humeur égale et ton savoir scientifique. **Etienne** Mouisel, on se revoit chez ta tante à Jérusalem avec du rhum arrangé et des falafels. De peur de ne pas faire de liste exhaustive, j'adresse un grand merci collégial à tous les membres des équipes avec qui j'ai pu avoir des interactions scientifiques. Grâce à vous tous, cette aventure a été très riche !

Je tiens à remercier mes amis qui m'ont toujours accompagnée, pour leur présence, leurs conseils et leur soutien. Je pense en particulier à Muriel, Béné, Arthur... D'autres que je voyais moins mais qui ont toujours été là : Flow, Cécilia, Noémie. Toute la bande que j'aurais tant aimé voir plus souvent : Emilien, Guillaume, Camilla, Boris, Nico, Poupou, Lucile, les Julius. Je n'oublierai évidemment pas mon chou de Marseille, Mathieu de m'avoir supportée la veille de la soutenance <3.

Un immense merci à ma famille sans qui rien n'aurait été possible.

A mes parents, pour m'avoir permis d'aller jusqu'au bout de ces longues études semées d'embûches, d'avoir toujours été présents à mes côtés, votre écoute, vos conseils et vos encouragements. Il faut désormais vous préparer à prendre l'avion !

A Julie et sa maman Michèle-Ange, qui resteront toujours dans mon cœur.

A Nadine, ma maman de cœur qui n'a jamais cessé de me soutenir. Merci également à Césaria et Christine avec qui j'ai passé le meilleur job étudiant de ma vie en maison de retraite ! Vous êtes pour quelque chose dans la thématique de ma thèse.

A Juliette, ma mamie. Merci de votre soutien inconditionné.

A ma belle-famille Claudie, Bernard et Benjamin pour leur soutien. Merci aux deux hommes d'avoir remis mes os en place plus d'une fois...

A Benoît, mon homme qui m'a supporté du master à la thèse... Je ne te remercierai jamais assez de ton soutien, même à distance.

A mon oncle Charles,

Résumé

Le vieillissement est associé un mécanisme d'arrêt du cycle cellulaire nommé senescence. Au niveau de l'adipocyte, cet état cellulaire semble contribuer à la survenue d'altérations métaboliques et à un état pro-inflammatoire. Dans ce contexte, le tissu adipeux blanc viscéral pourrait jouer un rôle déterminant sur la perte du contrôle métabolique et ainsi participer à l'installation de pathologies associées au vieillissement. Au cours du vieillissement, le tissu adipeux blanc subit des modifications morphologiques et physiologiques conduisant à une altération progressive des fonctions de stockage et endocrines de l'adipocyte. Ainsi, un nouveau profil sécrétoire pro-inflammatoire appelé SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) a pu être mis en évidence et pourrait être impliqué dans la survenue de différentes pathologies liées à l'âge (diabète, insuffisance cardiaque ou rénales, ...). Dans ce sens, l'analyse précise du SASP d'adipocytes issus de souris de différents âges nous a permis d'identifier une cytokine pro-inflammatoire, l'haptoglobine, comme un nouveau candidat potentiellement impliqué dans les désordres métaboliques et inflammatoires associés au vieillissement. Nos premiers résultats montrent que, *via* une boucle de régulation, la senescence augmente la production d'haptoglobine adipocytaire et que réciproquement, cette production entretient la senescence de l'adipocyte. Au niveau fonctionnel, l'haptoglobine altère les principales fonctions adipocytaires métaboliques telles que la lipolyse et la sensibilité à l'insuline. Des expériences sont en cours afin de confirmer *in vivo* l'importance de cette adipocytokine sur les altérations métaboliques entraînant une accélération du vieillissement de l'organisme. Cette étude permettra de mieux comprendre la participation de l'haptoglobine dans la perte des fonctions du tissu adipeux afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ralentir les processus de vieillissement.

Mots clés : sénescence cellulaire, adipocyte, métabolisme, SASP, Haptoglobine

Abstract

Aging is associated with a cell cycle arrest mechanism named senescence. In adipocyte, this cell state could contribute to metabolic alterations as well as a low-grade inflammatory state. In this context, visceral white adipose tissue could play a major role in age-associated setup pathologies through the loss of metabolic control. Indeed, during aging, white adipose tissue undergoes functional and morphological modifications progressively leading to altered storage and endocrine capacities. Consequently, it has been hypothesized that a new emerging adipocyte secretory profile associated with aging (SASP for senescence associated secretory phenotype) could actively participate to the progressive onset of metabolic diseases related to aging. By proteomic analysis, we identified haptoglobin as a new proinflammatory cytokine overproduced by murine adipose tissue during aging. Our results showed a regulatory feedback loop between adipocyte haptoglobin and senescence state arguing for a role of the cytokine in aging process. Moreover, haptoglobin induced adipocyte metabolic alterations in vitro targeting lipolysis and insulin sensitivity. In vivo validation of haptoglobin's role on metabolic-induced aging are currently ongoing. Our study will allow a better understanding of haptoglobin's role in age-related adipose tissue loss of function and will pave the road for a new therapeutic strategy in the field of metabolism and age-associated pathologies.

Key words: cellular senescence, adipocyte, metabolism, SASP, Haptoglobin

TABLE DES MATIERES

RESUME	2
ABSTRACT	3
LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX.....	9
PARTIE I : LE VIEILLISSEMENT, CETTE PERIODE REDOUTEE.....	1
A. Les théories du vieillissement	1
I. Les théories programmées.....	1
1. La mort cellulaire programmée.....	1
2. La théorie neuro-endocrinienne ou hormonale	1
3. La théorie immunologique	2
II. Les théories stochastiques	2
1. La théorie de l'usure et du soma jetable	3
2. La théorie radicalaire	3
3. L'accumulation des mutations	4
III. La théorie de la pléiotropie antagoniste	4
B. Vieillissement physiologique et pathologique.....	5
I. Les trajectoires du vieillissement	5
II. La fragilité.....	7
1. Phénotype de fragilité de Fried.....	7
2. Phénotype de fragilité de Rockwood	8
III. Maladies liées au vieillissement.....	9
1. Les maladies génétiques associées au vieillissement	9
2. Maladies développées avec l'âge.....	12
C. La sénescence : cause physiologique et pathologique du vieillissement.....	14
I. Causes et caractéristiques de la sénescence	14
1. Blocage du cycle cellulaire	14
2. Attrition des télomères	21
3. Résistance à l'apoptose	21
II. Caractérisation d'une cellule sénescence	22
1. Morphologie cellulaire et stress lysosomal.....	22
2. Modifications moléculaires	23

3.	Modifications cellulaires.....	24
4.	Résistance à l'apoptose	27
5.	L'autophagie	27
III.	Sécrétions d'une cellule sénescence : SASP.....	29
IV.	Les inducteurs de la sénescence répllicative et oxydative	31
1.	Stress oxydatif	31
2.	Stress génotoxique	32
3.	Activation d'oncogène	33
V.	Cibler les cellules sénescences.....	34
1.	La clairance des cellules sénescences <i>in vivo</i>	34
2.	Sénomorphiques.....	40
PARTIE II : UN METABOLISME BOULEVERSE PAR LES ANNEES.....		44
A.	Altérations métaboliques liées à l'âge chez l'Homme.....	44
I.	Régulation de la consommation d'énergie	45
II.	Régulation de la dépense énergétique et de l'utilisation des substrats.....	46
III.	Régulation de la glycémie et de l'insulinémie	47
IV.	Interventions visant à améliorer le métabolisme	48
1.	Exercice physique.....	49
2.	Aspect nutritionnel	50
V.	Voies métaboliques impliquées dans la longévité.....	51
1.	Axe GH/IGF-1	51
2.	Voie de l'insuline/Foxo.....	53
3.	Voie mTOR	56
4.	Voie des Sirtuines.....	59
5.	Rôle de l'AMPK.....	61
B.	Evolution du tissu adipeux blanc au cours du vieillissement	63
I.	Localisation du TAB.....	63
II.	Composition du tissu adipeux	66
1.	Fraction stroma-vasculaire (FSV).....	66
2.	Adipocytes	67
III.	Altérations des fonctions métaboliques au cours du vieillissement.....	69
1.	La lipogenèse	69
2.	La lipolyse.....	70
IV.	Altération de la fonction endocrine	70
HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL		73

RESULTATS EXPERIMENTAUX	80
A. Conséquences de la senescence adipocytaire sur le fonctionnement du tissu adipeux blanc (TAB) au cours du vieillissement.....	80
B. Caractérisation du sécrétome de l'adipocyte sénescant : rôle et régulation de l'Haptoglobine dans la perte de fonction de l'adipocyte liée à l'âge	88
MATERIELS ET METHODES	96
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	104
BIBLIOGRAPHIE	116
ANNEXE.....	157

Listes des figures et tableaux

Figures

Introduction : Partie I et Partie II

Figure 1 Les trajectoires du vieillissement	6
Figure 2 Régulation des Cdk et activation/désactivation des complexes Cdk/Cycline	16
Figure 3 Le cycle cellulaire	17
Figure 4 Structure du locus du gène INK4A/Arf	18
Figure 5 Les deux voies canoniques principales de la sénescence	20
Figure 6 Marquage SA- β -galactosidase	22
Figure 7 Expression de CDKI et arrêt du cycle cellulaire	24
Figure 8 Marquage des foyers d'hétérochromatine	25
Figure 9 Marquage des cassures double brins	26
Figure 10 Marquage de l'enveloppe nucléaire	26
Figure 11 Marquage de la dégradation des organites	27
Figure 12 Le SASP	30
Figure 13 La chaîne respiratoire mitochondriale production de ROS	32
Figure 14 Les différents inducteurs de la sénescence cellulaire	34
Figure 15 Construction génique souris INK-ATTAC	35
Figure 16 Prévalence du diabète chez les hommes et les femmes dans les années 1990	44
Figure 17 Changement de la masse corporelle dans les groupes de personnes jeunes et âgées	45
Figure 18 Dépense énergétique totale à différents âges chez l'homme et la femme	47
Figure 19 Utilisation du glucose en fonction de l'âge	48
Figure 20 Voie GH/IGF-1 et Insuline/FOXO	55
Figure 21 Voie mTOR	58
Figure 22 Réaction des sirtuines	59
Figure 23 Les effets pléiotropes de l'AMPK	62
Figure 24 Effets de la restriction calorique et de l'exercice physique	63
Figure 25 Les différents dépôts adipeux chez la souris et l'Homme	64
Figure 26 Distribution du TAB chez l'Homme avec l'âge	65
Figure 27 Morphologie et composants d'un adipocyte du TAB	67
Figure 28 Le métabolisme dans les adipocytes du TAB	68

Hypothèses et objectifs de travail

Figure 29 Liaison de l'Hp avec l'Hb	77
---	----

Conclusion et perspectives

Figure 30 Composition de la FSV des TAB viscéral et sous-cutané avec l'âge	105
Figure 31 Expression génique de SREBP1-c et LHS après traitement chronique in vitro à l'Hp	112
Figure 32 Rôle potentiel de l'Hp du TAB viscéral au cours du vieillissement	115

Tableaux

Tableau 1 Les critères d'analyse de la fragilité de Fried	7
Tableau 2 Les critères d'analyse de la fragilité de Rockwood	8
Tableau 3 Marqueurs de la sénescence cellulaire	28
Tableau 4 Modèles murins transgéniques éliminant les cellules p16 ^{INK4A} positives	36
Tableau 5 Les sénolytiques : activateurs d'apoptose de cellules sénescents	38

Partie I : Le vieillissement, cette période redoutée

A. Les théories du vieillissement

Pourquoi vieillissons-nous ? Quand commence-t-on à vieillir ? Les mécanismes biologiques qui causent le vieillissement ne sont pas toujours définis. Cependant, des changements visibles et quantifiables liés à l'âge fournissent la base d'un certain nombre de théories sur le vieillissement. En effet, il existe plus de 300 théories sur les mécanismes affectant le vieillissement et la longévité (Medvedev, 1990). Au fil du temps, certaines ont été abandonnées alors que d'autres sont devenues plus largement acceptées.

Les théories modernes du vieillissement biologique chez l'Homme et d'autres mammifères se divisent principalement en deux catégories : les théories programmées (ou non stochastiques), qui prétendent que les organismes sont conçus pour avoir une durée de vie limitée et génétiquement programmée et les théories stochastiques qui expliquent le vieillissement en tant que processus non programmé qui présente une accumulation progressive de dommages cumulatifs à divers niveaux. Parmi ces différents modèles, certains sont basés sur des faits scientifiques, d'autres sur des croyances.

I. Les théories programmées

Peu de temps après que Charles Darwin ait publié sa théorie de l'évolution par la sélection naturelle dans *On the Origin of Species* en 1859, les scientifiques ont utilisé ce modèle pour expliquer le vieillissement. En effet, selon ces théories, le processus de vieillissement implique des changements morphologiques et physiologiques prévisibles chez des individus vieillissant d'une même espèce. Ceci rend improbable que toutes ces modifications soient dues à des facteurs aléatoires. Parmi ces théories, il y a celles qui prônent une mort cellulaire programmée afin de conserver l'espèce, et d'autres, s'appuyant sur un déclin de fonctions inévitables conduisant à la mort. Nous allons détailler quelques-unes de ces théories.

1. La mort cellulaire programmée

Vladimir Petrovitch Skulatchev a développé la théorie de la « phénoptose » également appelée « the Samurai law of biology » (Skulachev, 2001). Selon lui, les systèmes biologiques ont des mécanismes intégrés d'autodestruction lorsqu'ils reconnaissent qu'ils sont devenus inutiles ou même dangereux pour un système vivant. Ces processus et mécanismes héréditaires sont conservés de façon évolutive et adaptative car ils peuvent accélérer l'évolution. L'apoptose en est un exemple. Cette mort cellulaire programmée élimine les cellules inutiles et endommagées afin d'assurer le bon développement de l'organisme. Le vieillissement normal est donc une phénoptose lente.

2. La théorie neuro-endocrinienne ou hormonale

Un principe fondamental en physiologie est le concept d'homéostasie. C'est l'état permettant de maintenir les paramètres physiologiques, endocriniens et biochimiques de l'organisme dans une gamme assez étroite pour conserver un état d'équilibre. Durant sa thèse, Vladimir Dilman fut, en 1954, un des premiers à proposer que les hormones contrôlent la vitesse à laquelle nous vieillissons. En 1992, Ward Dean s'est joint à sa théorie dans *The neuroendocrine theory of aging and degenerative disease*. En effet, le vieillissement serait principalement causé par une perte progressive de la sensibilité des récepteurs de l'hypothalamus (Dilman, 1984). Des études menées par Everitt suggèrent que les procédures telles que l'hypophysectomie n'interrompent pas le mécanisme de vieillissement chez les jeunes rats mais exerce probablement une influence inhibitrice continue sur certains processus de vieillissement tout au long de la vie (Everitt et al., 1980).

Notre production hormonale est élevée durant notre jeunesse (période de reproduction) puis diminue au fil du temps (van den Beld et al., 2018). Parmi les hormones les plus régulées par le vieillissement, on peut citer la testostérone, les œstrogènes, l'*insulin growth factor* (IGF-1) ou encore la dehydroépiandrostérone (DHEA). Une production diminuée de ces hormones va concourir à l'installation d'une « pause » pour l'organisme au cours du vieillissement appelée ménopause pour les femmes et andropause chez l'homme.

Actuellement, des traitements hormonaux substitutifs sont proposés pour retarder les effets de la ménopause et l'andropause. La DHEA, hormone stéroïdienne anabolisante et précurseur des œstrogènes et testostérone est une hormonothérapie controversée. Tout a commencé avec une étude dirigée par le Professeur Baulieu qui a administré à des hommes et des femmes âgés de 60 à 79 ans 50mg de DHEA par voie orale pendant un an (Baulieu et al., 2000). Plus tard, plusieurs études ont démontré que la DHEA n'avait qu'un faible effet sur

les symptômes liés au vieillissement : faible amélioration du statut métabolique (Villareal and Holloszy, 2004), de l'humeur, pas d'effet sur la masse musculaire (Percheron et al., 2003) et peu d'effet sur le risque cardiovasculaire chez les personnes âgées (Boxer et al., 2010).

D'autre part, il a été démontré chez les invertébrés que l'insuline et la voie de signalisation de l'IGF-1 jouaient un rôle majeur dans le contrôle de la longévité. En effet, chez le *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) (Kenyon et al., 1993) ainsi que chez *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) (Tatar et al., 2001), des mutations uniques qui diminuent la signalisation insuline / IGF-1 augmentent la durée de vie plus de deux fois et rend l'animal plus actif et plus jeune que la normale. De même chez les mammifères, des souris déficientes pour le récepteur à l'insuline dans le tissu adipeux blanc (TAB) (FIRKO) (Blüher et al., 2003), ou encore des souris inactivées pour le gène du récepteur IGF-1 (Igf1r) (Holzenberger et al., 2003) présentent une augmentation de leur longévité. Ces études montrent bien que la signalisation à l'insuline est impliquée dans la longévité.

3. La théorie immunologique

Le système immunitaire est programmé pour diminuer au fil des années, augmentant la vulnérabilité aux maladies, au vieillissement et à la mort. En effet, avec l'âge, les anticorps perdent leur efficacité (Cornelius, 1972). Cette théorie repose sur le rôle du thymus, organe où les lymphocytes T se développent, qui régresse dès l'adolescence (Burnet and Holmes, 1962). De plus, avec l'âge on observe une augmentation de la production d'auto-anticorps responsables de réactions auto-immunes (Manoussakis et al., 1987; Rowley et al., 1968). Les lymphocytes T dirigés contre le soi (auto-immunité) sont normalement détruits par le thymus (processus appelé délétion clonale). Mais cet organe involuant avec l'âge, il devient incapable d'assurer ce rôle. En conséquence, les maladies auto-immunes telles que le lupus, le diabète de type I, et la polyarthrite rhumatoïde se développent avec une fréquence plus importante chez les personnes âgées.

II. Les théories stochastiques

Les théories stochastiques s'appuient sur des événements épisodiques non programmés qui causent des dommages cellulaires aléatoires qui s'accumulent au cours du temps et provoquent le vieillissement.

1. La théorie de l'usure et du soma jetable

Une théorie connue sous le nom de « *sélection de groupe* » initiée par August Weismann (1891) était que le vieillissement évoluait au profit de l'espèce, en remplaçant les individus « usés/âgés » par des individus plus jeunes. Plus tard, Weismann a abandonné ce concept et a suggéré que le vieillissement évolue parce que les organismes qui séparent le *germen* (cellules qui permettent la transmission du patrimoine génétique et donc de l'existence d'une espèce) et le *soma* (cellules permettant la croissance de l'organisme) doivent investir des ressources supplémentaires pour se reproduire au lieu de maintenir le soma. Cette renonciation au soma semblerait alors entraîner le vieillissement. Les idées de Weismann ont ensuite été reprises par Thomas Kirkwood dans les années 1970 pour devenir la théorie du « soma jetable », qui prédit que le vieillissement se produit en raison de l'accumulation de dommages au cours de la vie et que plusieurs mécanismes de défense ou de réparation contribuent au vieillissement (Kirkwood and Holliday, 1979). Lorsque la descendance est assurée, il n'y a plus aucune utilité pour l'espèce à entretenir le soma. Ce modèle s'applique uniquement aux espèces à reproduction sexuée. Cette idée aurait l'avantage d'expliquer en partie la disparité dans la durée de vie entre différents types d'organismes. Les espèces susceptibles de mourir en raison de la prédation, comme les souris, investissent plus d'énergie dans la reproduction que dans le maintien de la santé alors que les humains, possédant peu de prédateurs, peuvent allouer plus de ressources à la réparation des dommages physiques puisqu'ils pourront se reproduire sur une plus longue période de temps.

2. La théorie radicalaire

Dans son livre publié en 1928, Raymond Pearl fut le premier à décrire une corrélation négative entre le métabolisme de base, c'est-à-dire les besoins énergétiques minimums pour survivre, et la durée de vie (théorie appelée « théorie du taux de vie »). Cette théorie affirme que la durée de vie d'un organisme dépend de l'épuisement d'une quantité fixe d'une substance vitale à un taux proportionnel au taux métabolique. Cette théorie fut d'abord introduite par Gerschman en 1954 (Gerschman et al., 1954). D'après leurs expériences, il semblerait que l'irradiation et l'empoisonnement à l'oxygène produisent certains de leurs effets létaux à travers au moins un mécanisme commun qui pourrait être celui de la formation de **radicaux libres oxydants**. Cela fut ensuite développé par Denham Harman (Harman, 1956) qui a proposé que les ions superoxydes et les radicaux libres (appelés espèces réactives de l'oxygène ou ERO) causent des dommages à la cellule, provoquant des altérations cumulatives jusqu'à l'arrêt fonctionnel. Les acides nucléiques, les lipides, les

carbohydrates et les protéines sont susceptibles d'être attaqués par les radicaux libres. Au cours du vieillissement, les ERO sont nombreux et leur surproduction chronique participe à la création de dommages cellulaires. Cependant, notre organisme possède des systèmes antioxydants sous forme d'enzymes (ex : SOD, superoxide dismutase) permettant de limiter l'accumulation des radicaux libres. Des expériences au cours desquelles des souris ont été nourries avec des antioxydants ont montré que ces animaux présentaient une longévité moyenne plus grande, confirmant ainsi cette théorie (Parameshwaran et al., 2010). Cependant, l'équipe de Siegfried Hekimi a développé une hypothèse opposée à la théorie radicalaire. En effet, ils ont démontré que les radicaux libres pouvaient avoir des effets bénéfiques sur le *C.elegans* et permettraient de retarder les effets du vieillissement en augmentant l'expression de certains gènes comme la SOD (Yang and Hekimi, 2010). Selon eux, les radicaux libres agissent dans un premier temps comme un signal des dommages cellulaires nécessaire à la mise en place d'un système anti-oxydant. Dans ce sens, deux études ont montré chez la souris qu'une supplémentation en antioxydants (glutathione, vitamine E) prolongeait la longévité seulement si ce régime était commencé à deux ou neuf mois de vie (Bezlepkin et al., 1996; Lipman et al., 1998).

3. L'accumulation des mutations

La théorie de Peter Medawar a émergé à partir de l'observation de Haldane (1941) sur la chorée de Huntington dont les symptômes ne se développent qu'après la période de reproduction (Haldane, 1941). La sélection naturelle ne peut donc éliminer des mutations qui ont des effets tardifs (c'est-à-dire après la période de reproduction). Ceci peut expliquer pourquoi la maladie de Huntington n'a pas pu être éliminée et qu'elle est aussi répandue car elle n'affecte pas les personnes qui sont dans la période de reproduction. En 1952, Peter Medawar a proposé que l'incapacité de la sélection naturelle à influencer les traits de la vie tardive pourrait signifier que les gènes ayant des effets néfastes sur la vie tardive pourraient continuer à être transmis de génération en génération (Medawar and University College, 1952).

III. La théorie de la pléiotropie antagoniste

Quelques années plus tard, en 1957, George Williams a extrapolé cette idée en formulant la théorie de la « pléiotropie antagoniste » (Williams, 1957). La pléiotropie antagoniste suggère que certains gènes déterminants de caractères multiples (pléiotropes) et ayant des effets

positifs à un âge jeune, auraient des effets négatifs chez les personnes vieillissantes. Parce que les effets délétères du gène n'apparaissent qu'après la fin de la reproduction, ils ne peuvent pas être éliminés par la sélection naturelle. Un exemple de pléiotropie antagoniste chez l'Homme est la protéine p53, qui lorsqu'elle est suractivée, « ordonne » aux cellules endommagées de cesser de se reproduire ou de mourir. Cette protéine aide à prévenir le cancer chez les jeunes individus, mais peut être en partie responsable du vieillissement en altérant la capacité du corps à renouveler les tissus qui se détériorent. Un autre exemple de système antagoniste pléiotrope est l'IGF-1 (daf-2 chez *C.elegans*). Un niveau adéquat d'IGF-1 est indispensable à la croissance et au développement au cours de l'ontogenèse. Cependant, un niveau élevé à l'âge adulte est associé à un risque élevé de cancer et de décès prématuré (Kenyon et al., 1993; Kimura et al., 1997; Wong et al., 1995).

B. Vieillesse physiologique et pathologique

I. Les trajectoires du vieillissement

Les gériatres s'accordent à dire qu'à partir de l'âge de 20 ans, nos capacités fonctionnelles globales diminuent progressivement. En effet, avec l'âge on observe certaines altérations comme les pertes auditive et/ou visuelle, une mobilité réduite, ainsi qu'une baisse hormonale (œstrogènes, testostérone, hormone de croissance) et des modifications métaboliques (métabolisme des glucides et lipides altéré). Ces changements physiologiques et homéostatiques sont pour la plupart inévitables. **Le vieillissement physiologique** correspond donc à une baisse globale et progressive de nos capacités fonctionnelles (capacités de réserves et d'adaptation) sans atteindre le seuil d'insuffisance (représenté en **1** sur la Figure 1). On parle ici de vieillissement cardiaque, vasculaire, rénal et cérébral qui n'aboutit pas à lui seul à une décompensation fonctionnelle (appelée également *seuil de dépendance*). L'expression « vieillir en bonne santé » est souvent utilisée pour identifier un état positif d'absence de maladie, qui fait une distinction entre des individus en bonne santé et des individus malades. Ce terme a été repris dans le rapport de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) définissant le « vieillir en bonne santé » comme étant « le processus de développement et de maintien des aptitudes fonctionnelles qui permet aux personnes âgées de jouir d'un état de bien-être ». D'ici 2050, l'OMS prévoit qu'en France plus de 30% de la population sera âgée de plus de 60 ans alors qu'en 2016 elle représentait 25%. Le vieillissement en bonne santé dépend de plusieurs facteurs regroupés en deux catégories

principales : i) l'environnement de l'individu (interactions sociales, activité, valorisation), et ii) les aptitudes fonctionnelles comprenant l'état de santé de la personne associée à ses capacités intrinsèques (physiques et mentales). Il paraît donc important de maintenir cet état de « bonne santé » en renforçant et en entretenant les capacités intrinsèques. Les personnes atteintes d'une ou plusieurs maladies chroniques telles qu'une hypertension artérielle, l'ostéoporose, un syndrome démentiel peuvent atteindre le stade d'insuffisance (représenté en 2). On parle alors de **vieillesse pathologique**. Dans le cas d'une maladie intercurrente comme un accident vasculaire cérébral (AVC) chez un patient hypertendu, la personne sera précipitée vers ce seuil (représenté en 3). Dans le cas contraire, au cours d'une affection chronique il peut y avoir un évènement positif (représenté en 4) à l'instar d'une mise en place d'une prothèse de hanche redonnant de la mobilité à la personne âgée permettant de la ramener vers la pente de déclin physiologique. Un facteur aigu de décompensation (représenté en 5) telle qu'une pathologie iatrogène, le décès d'un proche, une chute aboutissant à une fracture de la hanche, entraîne inévitablement la personne touchée vers le seuil de dépendance.

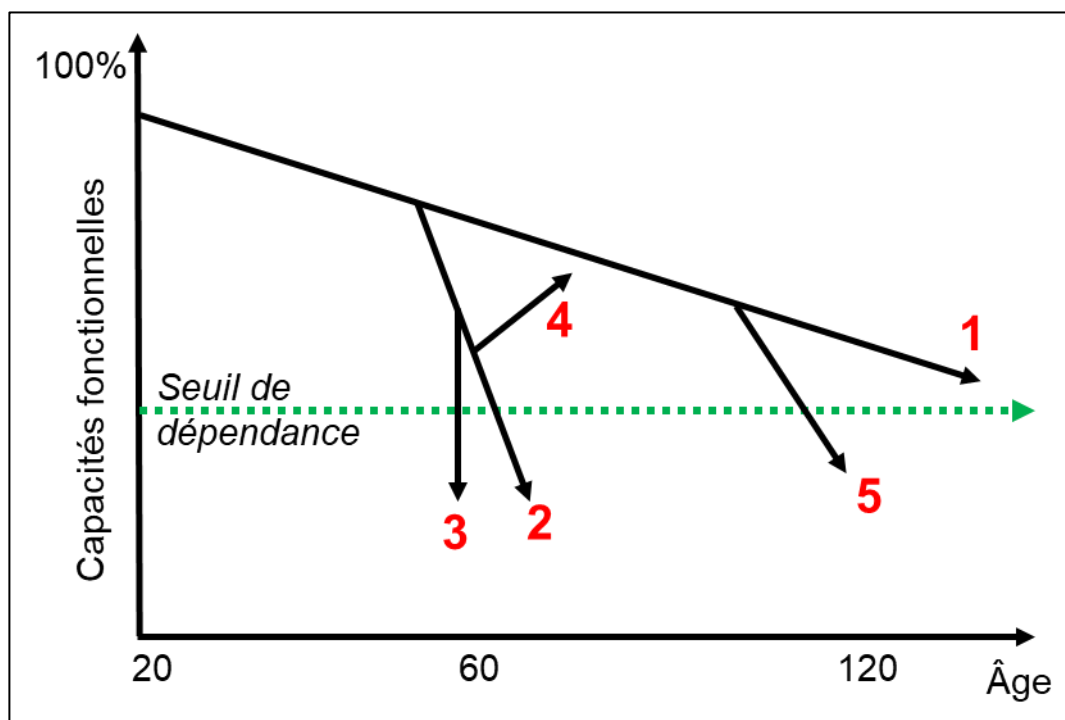


Figure 1 Les trajectoires du vieillissement

Schéma modélisant la décompensation fonctionnelle de la personne âgée, inspiré de la théorie 1+2+3 de J.P Bouchon, gériatre français.

En clinique, la prise en charge de ces personnes âgées se faisant souvent tardivement, il est difficile de revenir en arrière et de garantir un vieillissement réussi à la personne affectée. L'enjeu actuel de la recherche et de la clinique est donc d'agir au plus tôt, avant d'atteindre

ce seuil de dépendance. Il faut impérativement comprendre les causes et les mécanismes liés au vieillissement afin de mieux appréhender et prévenir les conséquences irréversibles de celui-ci. Pour cela, l'identification d'un état préalable à l'état de dépendance a pu être décrit : **la fragilité**.

II. La fragilité

Un grand nombre de personnes âgées traverse une période transitoire entre le moment du diagnostic de pathologies chroniques et celui où apparaît une dépendance fonctionnelle. Cette période est caractérisée par l'apparition d'une **fragilité** qui se traduit par une plus grande vulnérabilité aux situations de stress aiguës et une susceptibilité accrue au risque de complications. L'objectif actuel n'est donc pas de retarder le vieillissement indéfiniment ou de contourner cette étape, mais plutôt d'essayer de comprendre les mécanismes biologiques qui nous font vieillir. En l'absence de définition consensuelle, la mesure de la fragilité se réfère principalement à deux modèles : le phénotype de Fried et l'index de Rockwood.

1. Phénotype de fragilité de Fried

Celui-ci repose sur 5 aspects (Fried et al., 2001) représentés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 Les critères d'analyse de la fragilité de Fried

Indicateurs	Mesures associées
Amaigrissement	Perte de masse corporelle de plus de 4,5 kg ou ≥ 5 % par an
Faiblesse/fatigue/symptomatologie dépressive	Sensation d'épuisement 3-4 jours par semaine ou plus selon l'échelle d'autoévaluation US Center for Epidemiological Studies depression scale (Radloff, 1977)
Sédentarité	Dépense d'énergie : < 383 Kcal/semaine (homme) < 270 Kcal/semaine (femme)
Vitesse de marche lente	Temps de parcours de 4,57 m sans arrêt, modulé selon le sexe et la taille
Faible force de préhension	Force de préhension, modulée selon la taille et l'indice de masse corporelle

Les personnes ne satisfaisant aucun de ces critères sont considérés comme **non fragiles** (robustes). Celles présentant 1 à 2 critères sont définies comme **pré-fragiles**, ceux étant dans cette période de **fragilité** présentent 3 critères ou plus. Les sujets pré-fragiles se caractérisent par un risque intermédiaire qu'il est alors encore possible d'inverser, alors que les sujets fragiles ont une probabilité significativement plus élevée d'évoluer vers une dépendance fonctionnelle et d'être admis dans un hôpital ou un établissement de long séjour et de décéder (OMS).

2. Phénotype de fragilité de Rockwood

Rockwood détermine la fragilité grâce à l'accumulation de problèmes de santé, peu importe leur gravité et leur nature (Rockwood et al., 2005). Un index de fragilité (allant de 1 à 7) est calculé sur une trentaine de critères, avec un même poids attribué à chacun. Le Tableau 2 ci-dessous représente les différents index attribués en fonction de l'état de santé de la personne interrogée.

Tableau 2 Les critères d'analyse de la fragilité de Rockwood

Index	Etat de santé	Caractéristiques
1	Santé excellente	Personne active, énergique et motivée. Ces personnes ont une activité régulière et sont en meilleure forme que ceux de leur âge
2	Bonne santé	Sans maladie active mais en moins bonne forme que la catégorie 1
3	Bonne santé avec comorbidité traitée et asymptomatique	Traité pour maladie chronique avec symptômes contrôlés
4	En apparence vulnérable	Bien qu'indépendant, ces personnes ont des symptômes d'une maladie
5	Légèrement fragile	Dépendance limitée pour les activités instrumentales
6	Modérément fragile	Besoin d'aide à la fois pour les activités instrumentales et les gestes quotidiens
7	Sévèrement fragile	Complètement dépendant pour les activités de vie quotidienne ou en fin de vie

Aujourd'hui, la fragilité est considérée comme une notion indépendante à la comorbidité et à la dépendance. Ainsi, l'index de fragilité de Rockwood apparaît davantage comme un indicateur global de la santé des personnes âgées, et le phénotype de fragilité de Fried comme un indicateur spécifique de la fragilité. La capacité à détecter la fragilité et à la prévenir sera déterminante afin d'améliorer la qualité de vie de patients âgés en préservant leurs capacités fonctionnelles.

III. Maladies liées au vieillissement

Au fil des ans, on observe une longévité croissante de la population associée à une exacerbation des maladies, notamment chroniques, liées à l'âge. Ainsi, en Allemagne, on estime que 24 % des personnes âgées de 70 à 85 ans sont atteintes de cinq ou plus de cinq maladies simultanément (appelée « multi morbidité »). Il en est de même pour des études réalisées en Espagne et en Chine (Garin et al., 2014; Marengoni et al., 2011; Wang et al., 2014). Parmi ces maladies on dénote les maladies neurodégénératives, différents types de cancers, les maladies cardio-vasculaires et le diabète de type II. Ces pathologies liées au vieillissement sont aussi des accélérateurs et des facteurs de risque qui précipitent les personnes fragiles vers un état de dépendance. Par ailleurs, il existe des pathologies génétiques qui accélèrent les processus de vieillissement comme le syndrome de Werner, de Bloom, de Rothmund-Thompson, d'Hutchinson-Gilford (HGPS), de Down ou encore la maladie de Cockayne. Ces pathologies seront brièvement abordées dans le chapitre suivant afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au vieillissement.

1. Les maladies génétiques associées au vieillissement

Hayflick en 1961 a découvert que des fibroblastes humains provenant de la peau, de poumons et de muscles ont une durée de vie limitée et sont capables de se diviser une cinquantaine de fois avant de mourir (Hayflick and Moorhead, 1961). Ce n'est qu'en 1971 que le biologiste russe Alekseï Olovnikov relie cette limite de prolifération à la perte progressive de séquences d'ADN répétitives en bout de chromosomes appelés les **télomères** (Olovnikov, 1973). Ce sont des structures d'ADN composées de séquences répétées non codantes qui protègent contre la perte d'information génétique (Blackburn, 1991). Les télomères de mammifères sont organisés en structures protectrices appelées boucles T qui sont souvent complexes (Doksani et al., 2013). Une étape de désassemblage de ces structures est nécessaire à la réplication des télomères et est effectuée par les hélicases. Des mutations des hélicases entraînent une attrition des télomères associée à une accélération du vieillissement. Ces maladies sont appelées syndrome de Werner, de

Bloom et de Rothmund-Thomson. Par ailleurs d'autres mutations sur des gènes essentiels à la structure du noyau ou impliqués dans la réparation de l'ADN, engendrent une mort prématurée.

a. Syndrome des hélicases

i. Syndrome de Werner

Cette maladie, également appelée « progéria adulte », est causée par une mutation du gène *WRN* codant pour l'une des cinq hélicases RecQ, elle est autosomique récessive. La mutation peut être diverse : insertion, délétion ou substitution sur le gène *WRN*. Il en existe plus de 40 chez l'humain. La protéine *WRN* est très impliquée dans la réédition de l'ADN après la réparation par les ADN polymérases. Les fibroblastes humains normaux réalisent environ 50 doublements de population en culture (Hayflick and Moorhead, 1961), alors que les cellules provenant d'un patient atteint du syndrome de Werner n'atteignent qu'une vingtaine de doublements de population. Deux études ont montré que les cellules hétérozygotes pour une mutation sur le gène *WRN* sortaient de façon irréversible du cycle cellulaire à un rythme plus rapide que les cellules normales (Faragher et al., 1993; Thweatt and Goldstein, 1993). Ils ont proposé que le gène *WRN* soit un gène « comptage » contrôlant le nombre cycles cellulaires avant la différenciation terminale. Matsumoto et ses collaborateurs ont par ailleurs démontré que l'hélicase défectueuse dans le syndrome de Werner ne possédait pas le signal de localisation nucléaire (NLS) et que cela entraînait une altération de l'importation nucléaire comme facteur majeur contribuant à la pathologie (Matsumoto et al., 1997).

A la naissance, les patients ne présentent aucun symptôme. Ce n'est qu'entre 20 et 30 ans qu'ils apparaissent : cheveux gris et fins, petite taille, cataracte bilatérale, tâche de vieillesse (Epstein et al., 1966). D'autres anomalies liées au vieillissement sont visibles : ostéoporose, diabète de type II, tumeurs et athérosclérose. Izumino et ses collaborateurs ont analysé les effets métaboliques de la troglitazone, un médicament antidiabétique qui sensibilise à l'insuline, chez 5 patients atteints du syndrome de Werner. Après traitement avec 400 mg / jour de troglitazone pendant 4 semaines, la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline ont été améliorées de 26% et 43%, respectivement (Izumino et al., 1997). Cependant aucune précision quant à leur vieillissement accéléré n'a été renseignée.

ii. Syndrome de Bloom

Le syndrome de Bloom est causé par une mutation hétérozygote ou homozygote autosomique récessive du gène codant pour l'hélicase *RecQL3* ou *BLM*. Cette hélicase est

impliquée dans les phases G2 et S du cycle cellulaire lors de lésions à l'ADN. Les patients atteints du syndrome de Bloom ont des lésions érythémateuses de la face en forme de papillon suite à une exposition au soleil. Ils présentent également un tissu adipeux sous cutané très fin, une immunodéficience, et une prédisposition au développement de cancers.

iii. Syndrome de Rothmund-Thompson

Cette maladie est due à des mutations faux-sens qui affectent la structure de la protéine hélicase *RecQL4*. Elle est la seule des hélicases répliquatives à être retrouvée dans les mitochondries (Croteau et al., 2012). Il existe deux sous-types de ce syndrome avec des mutations homozygotes ou hétérozygotes (Piard et al., 2015; Siitonen et al., 2009). Les symptômes apparaissent dès le plus jeune âge avec une hypoplasie des pouces, une poikilodermie et une alopécie. Les patients présentent également une cataracte bilatérale précoce, une très forte prédisposition aux cancers tels que des ostéosarcomes et des mélanomes, signes d'un vieillissement précoce.

b. Syndrome d'Hutchinson-Gilford (HGPS)

Ce syndrome également appelé communément « progéria » a été décrit pour la première fois par Hastings Gilford et Jonathan Hutchinson (GILFORD, 1904; Hutchinson, 1886). Sa prévalence est de 1/4000000. Il est causé par une mutation autosomique dominante du gène *LMNA* (lamine A) (Chu et al., 2015). Ce gène code pour deux protéines différentes par épissage alternatif à savoir la lamine A et la lamine C. Une délétion de 50 acides aminés dans la prélamine A élimine le site de clivage endoprotéolytique. De ce fait, aucune *LMNA* mature n'est formée et une prélamine A mutante et farnésylée (appelée progérine) s'accumule. La lamina nucléaire est une matrice de protéine située au niveau de la membrane nucléaire interne. Pendant la mitose, cette structure est désassemblée quand les protéines de lamina sont phosphorylées. Celles-ci sont impliquées dans la stabilité nucléaire, la structure de la chromatine et l'expression de certains gènes. Au cours de la maladie d'Hutchinson-Gilford, la mutation remplace une cytosine par une thymine à la position 1824 (C1824T) ce qui provoque l'apparition rapide et spectaculaire du vieillissement dès l'enfance. Ce syndrome est un trouble rare caractérisé par une petite taille, une faible masse corporelle, une perte précoce des cheveux, une lipodystrophie, une sclérodermie, une mobilité articulaire réduite, une ostéolyse et des traits du visage qui ressemblent à ceux observés chez des personnes âgées. Souvent, un problème cardiovasculaire entraîne une mort prématurée. Afin d'étudier ce syndrome, une souris déficiente en *LMNA* qui résume les traits phénotypiques des patients a été créée (Mounkes et al., 2003).

c. Syndrome de Down

Cette maladie est connue sous le nom de « trisomie 21 ». En 1959, le médecin français Jérôme Lejeune a identifié le syndrome de Down comme une maladie chromosomique. Au lieu des 46 chromosomes habituels présents dans chaque cellule, Lejeune en a observé 47 dans les cellules des individus atteints du syndrome de Down. Il a été déterminé plus tard qu'une copie supplémentaire ou partielle du chromosome 21 entraîne une copie supplémentaire du gène APP (amyloid precursor protein), précurseur du peptide bêta amyloïde, responsable de la maladie d'Alzheimer, développé dans les pages suivantes (Korenberg et al., 1990). De plus, cette copie supplémentaire du chromosome entraîne une diminution des gènes codant pour des enzymes mitochondriales nécessaires pour lutter contre le stress oxydant comme SOD1 (Conti et al., 2015). Les adultes atteints du syndrome de Down connaissent donc un « vieillissement accéléré » cognitif dû à une mort cellulaire par apoptose des neurones provoqué par le stress oxydant (Busciglio and Yankner, 1995).

d. Syndrome de Cockayne

La transmission de cette maladie se fait de manière autosomique récessive et est généralement due à une mutation du gène *ERCC8* qui code pour une protéine (CSA) impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN. Son rôle n'est pas clairement défini, mais il semblerait qu'elle soit impliquée dans l'identification de zone d'ADN endommagée. Les patients présentant cette mutation sont atteints de nanisme cachectique et présentent une apparence progéroïde. Ils sont atteints de contractures aux articulations, d'une dégénérescence neurologique progressive sévère ainsi que d'une rétinopathie pigmentaire et une perte auditive.

2. Maladies développées avec l'âge

Les maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer et de Parkinson, sont des maladies qui entraînent la dégénérescence progressive et la mort des cellules nerveuses. La **maladie d'Alzheimer** affecte préférentiellement les personnes d'un âge très avancé (Schneider and Bennett, 2010). Pareillement, une corrélation positive a été démontrée entre le développement de la **maladie de Parkinson** et l'âge des patients (Wirdefeldt et al., 2011). Deux types de lésions signent le diagnostic de la maladie d'Alzheimer : la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques amyloïdes. L'APP subit plusieurs clivages par des sécrétases qui vont former le peptide bêta amyloïde conduisant à la formation de plaques amyloïdes qui provoquent un dysfonctionnement mitochondrial. Deux études ont montré chez un modèle murin surexprimant ce peptide, une expression élevée de gènes mitochondriaux aboutissant

à un métabolisme mitochondrial altéré et une formation d'ERO (Manczak et al., 2006; Reddy et al., 2004). De plus, Sirk et ses collaborateurs ont rapporté *in vitro* que le peptide bêta amyloïde bloquait l'entrée de protéines dans la mitochondrie, entraînant une production d'ERO (Sirk et al., 2007). De la même manière, la maladie de Parkinson est associée à un état inflammatoire élevé et des dysfonctions mitochondriales dans la substance noire, aboutissant à la mort neuronale de cette région ce qui provoque des mouvements incontrôlés (Reeve et al., 2013; Rodriguez et al., 2015).

Il a été démontré qu'avec l'âge l'incidence des **cancers** augmente (White et al., 2014). Une des causes résiderait en l'accumulation des mutations de l'ADN au fil des ans (Tucker et al., 1999), notamment dans les gènes qui contrôlent l'arrêt du cycle cellulaire (Vijg and Suh, 2013). De plus, une étude a montré qu'avec l'âge, des mutations de l'ADN s'accumulent dans des cardiomyocytes de souris âgés entraînant des modifications aléatoires de l'expression génique ce qui aboutit à une dysfonction des tissus (Bahar et al., 2006). Ces mutations à l'ADN sont associées à une augmentation du stress oxydant qui participe au développement de cancers. Dans ce sens, deux études ont montré une corrélation positive entre fragilité et inflammation chronique chez des personnes âgées atteintes de cancers (Collerton et al., 2012; Nishijima et al., 2017), soulignant l'importance des processus inflammatoires dans le développement de cancers.

Les maladies cardiovasculaires augmentent avec l'âge du fait d'une dysfonction des cellules endothéliales (Celermajer et al., 1994). Une des causes serait le stress oxydant retrouvé dans les cellules endothéliales humaines (Donato et al., 2007) et dans les artères de rats âgés de 80 semaines (Csiszar et al., 2002). Ces ERO produits diminuent l'expression et l'activité de la eNOS (endothelial NO synthase) produisant moins de NO (oxyde nitrique) qui est une molécule vasoprotectrice (Forstermann, 2006).

L'ensemble de ces maladies développées avec l'âge participe à entraîner l'individu d'un état de pré-fragilité ou de fragilité vers un état de dépendance. Plusieurs facteurs augmentent le risque de développer ces maladies *via* notamment le stress oxydant ou les dommages à l'ADN comme l'exposition aux UV, le tabac, ou une nutrition trop riche. La plupart conduisent vers un état d'arrêt du cycle cellulaire nommé **senescence**.

C. La sénescence : cause physiologique et pathologique du vieillissement

La **sénescence** (du latin *senex* : grand âge) est définie comme le processus cellulaire responsable du vieillissement. C'est un processus physiologique activé par les cellules en réponse à différents types de stress et conduisant à une dégradation des fonctions cellulaires puis de l'organisme. La sénescence peut survenir après une période de prolifération cellulaire (sénescence répllicative) ou de manière plus rapide en réponse à un stress aigu (sénescence oxydative). Une fois que les cellules sont entrées en sénescence, elles cessent de se diviser et subissent une série de changements morphologiques et cellulaires. Différents marqueurs cellulaires, moléculaires ou encore morphologiques que nous allons détailler par la suite permettent de les identifier. Enfin, l'élimination des cellules sénescents de souris âgées retarde l'apparition de dysfonctions liées à l'âge comme la sarcopénie, la cataracte, l'athérosclérose, la lipodystrophie et la tumorigénèse (Baker et al., 2011, 2016).

I. Causes et caractéristiques de la sénescence

Selon le type cellulaire et le stress que subit la cellule, différentes voies de signalisation peuvent induire la sénescence par arrêt du cycle cellulaire. Deux voies principales appelées voie p21/p53 et voie p16^{INK4A}/Rb en sont responsables en agissant de manière indépendante ou en concomitance.

1. Blocage du cycle cellulaire

a. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire comporte quatre phases consécutives, qui séparent deux divisions cellulaires : G1, S, G2 et M. Au cours de la phase S, les cellules procèdent à la réplication de l'ADN et exercent la mitose en phase M. Les deux autres phases G1 et G2 correspondent à des intervalles (Gap) au cours desquels les cellules effectuent leur croissance et intègrent les signaux pour effectuer correctement les phases suivantes du cycle cellulaire. Deux groupes de protéines, appelés **cyclines** et **kinases dépendantes des cyclines** (Cdk), sont responsables de la progression de la cellule à travers les différents points de contrôle. Les niveaux de protéines Cdk sont relativement stables tout au long du cycle cellulaire. Cependant, les concentrations de cycline fluctuent et déterminent la formation de complexes

Cdk/cycline. Les différentes cyclines et Cdk se lient à des points spécifiques du cycle cellulaire et régulent ainsi différents points de contrôle. Bien que les cyclines soient les principales molécules régulatrices qui déterminent l'avancement du cycle cellulaire, il existe plusieurs autres mécanismes qui affinent la progression du cycle en bloquant essentiellement la progression du cycle cellulaire jusqu'à réparation des dommages. En effet, plusieurs systèmes de régulation de l'activité des Cdk entrent en jeu :

- La fixation des Cdk aux cyclines ((1) sur la Figure 2). Les Cdk doivent être phosphorylées au niveau du site de fixation de l'ATP sur une thréonine pour être actives, ceci se fait grâce à la CDK activating-kinase (CAK). En absence de cycline, il y a formation d'une boucle en T qui bloque le sillon et empêche la fixation de l'ATP. En présence de cycline, il y a un changement de conformation de cette boucle en T qui va permettre la fixation de l'ATP et garantir l'activation du complexe. Ces complexes Cdk/cycline sont très spécifiques.

- Les phosphorylations inhibitrices permettent le suivi du cycle cellulaire. En effet, Wee1 est une kinase qui va phosphoryler la tyrosine des Cdk et entraîner une inactivation du complexe Cdk/cycline. Des phosphatases comme Cdc25 vont permettre à l'inverse de lever cette phosphorylation inhibitrice et activer le complexe Cdk/cycline ((2) sur Figure 2).

- Les molécules qui empêchent l'activation complète des Cdk sont appelées les **inhibiteurs de Cdk** (CDKI ou CKI). Chez les mammifères il existe deux familles de CKI : les Cip/Kip comprenant p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}, et les INK4 avec p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D} ((3) sur la Figure 2).

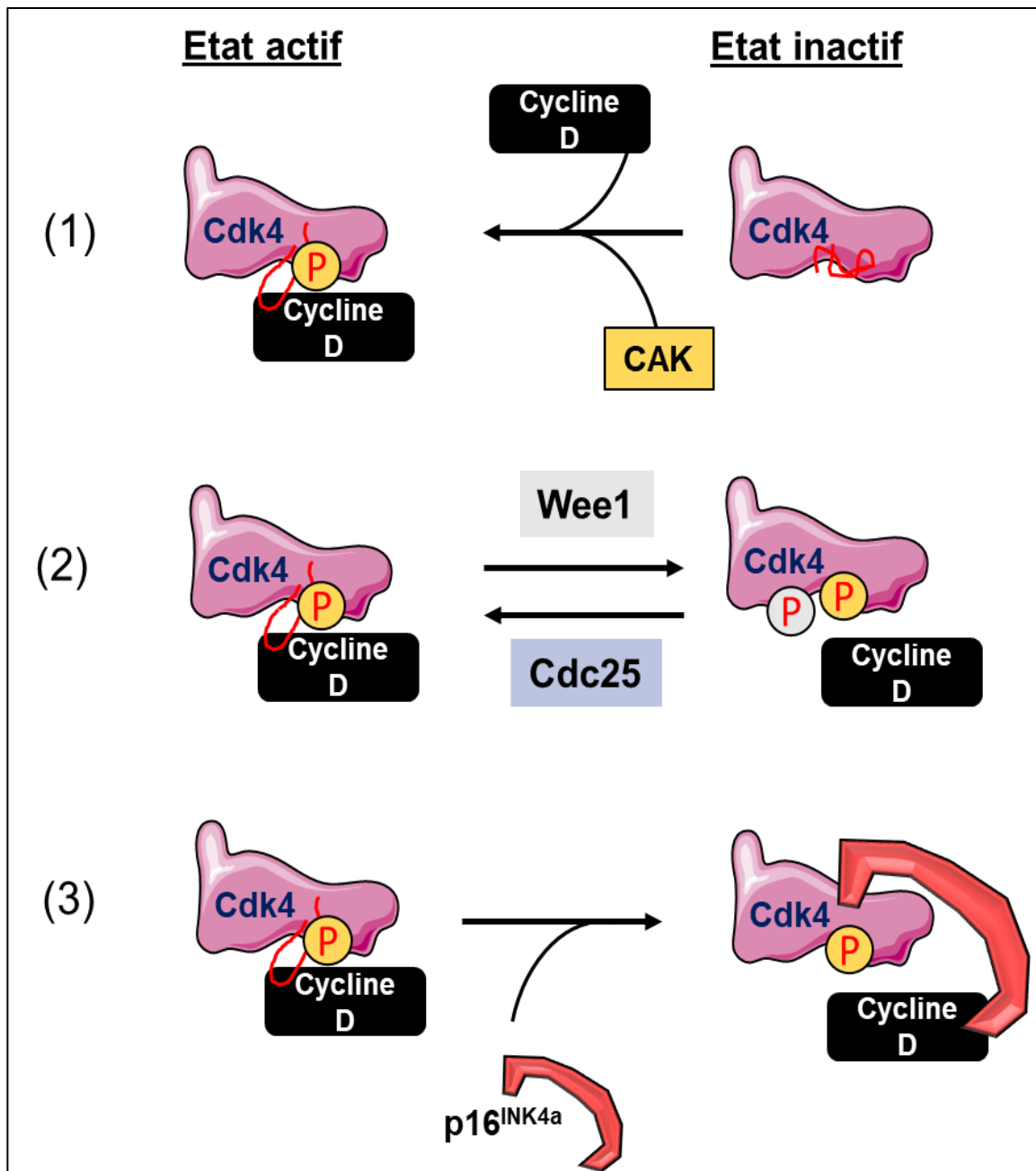


Figure 2 Régulation des Cdk et activation/désactivation des complexes Cdk/Cycline

(1) La fixation des Cdk aux cyclines : la cycline permet un changement de conformation de la boucle en T, permettant à la CAK (CDK activating-kinase) de phosphoryler le site de fixation de l'ATP sur une thréonine et ainsi d'activer la Cdk. (2) Wee1 va phosphoryler la tyrosine des Cdk et entraîner une inactivation du complexe Cdk/cycline. Au contraire, une phosphatase (Cdc25) permet de lever cette phosphorylation inhibitrice et activer le complexe Cdk/cycline. (3) Les CKI ou CDKI (inhibiteur de Cdk) comme p16^{INK4A} permet l'inhibition du complexe Cdk/cycline. Exemple du complexe Cdk4 avec la cycline D.

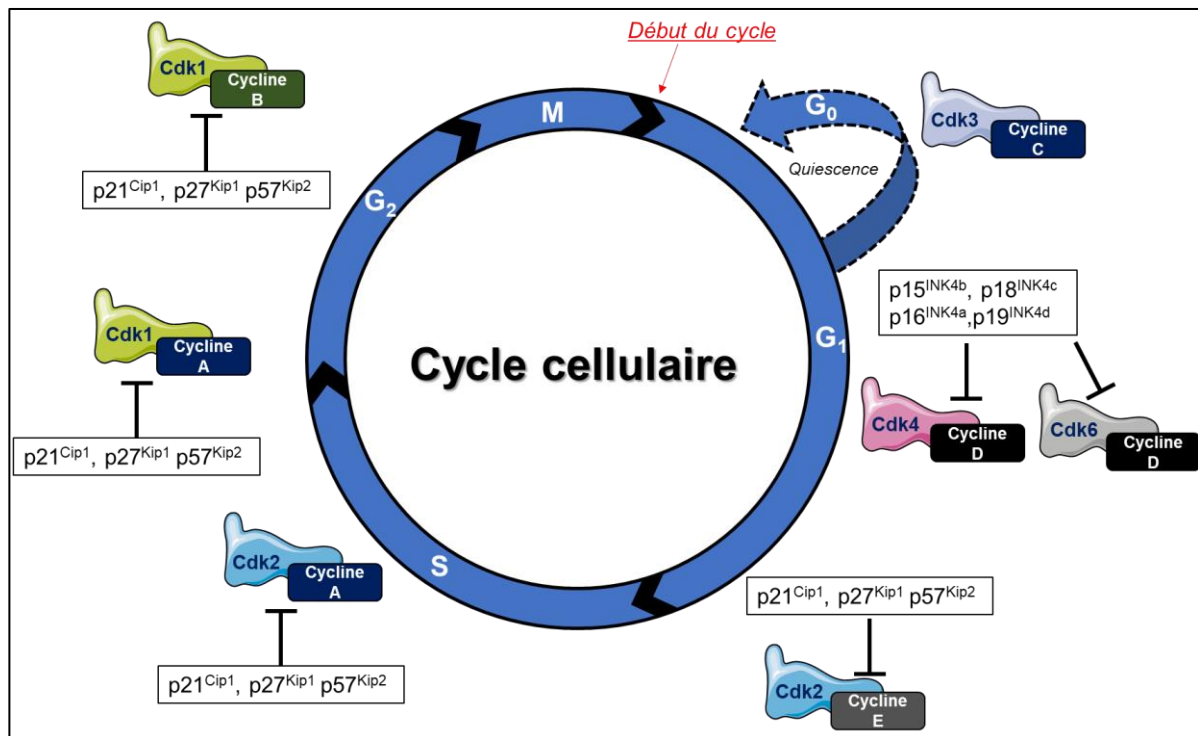


Figure 3 Le cycle cellulaire

Régulation de la progression du cycle cellulaire par les kinases cycline-dépendantes (CDK), les inhibiteurs de CDK (CKI ou CDKI). Un premier point de contrôle se fait au niveau de la phase G1/S. En réponse à des agents mitogènes et à l'activation de la voie RAS-MAP kinase, des cyclines D sont produites et les CDK4/6 sont activées. L'activité de CDK4/6 est inhibée par les membres de la famille INK4. Bien que la famille KIP/CIP inhibe largement les complexes cycline/CDK, ils sont plus actifs sur la cycline E/CDK2. Par ailleurs, pendant la phase G2, le complexe cycline B/CDK1 est inactivé par phosphorylation via les kinases Wee1. Au début de la mitose, CDK1 est déphosphorylé par Cdc25.

b. Voies impliquées dans le blocage du cycle

Une cellule sénescence sera bloquée en phase G1. L'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence implique une interaction entre deux voies suppressives de tumeur : la famille des protéines Rb (rétinoblastome) et p53. Le croisement de ces deux voies se produit à plusieurs niveaux et permet une modulation ou un renforcement de la sénescence. En conséquence, la plupart des cellules humaines nécessitent des défauts dans les deux voies pour contourner efficacement la sénescence. Parfois, l'inactivation de p53 ou de Rb est suffisante pour éviter la sénescence dans les fibroblastes embryonnaires de souris (Dannenberget al., 2000; Dirac and Bernards, 2003; Sage et al., 2000, 2003).

i. Voie Rb/p16INK4A

La protéine Rb joue un rôle crucial dans la régulation de la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire (Hatakeyama and Weinberg, 1995). L'absence ou la perte de fonction de Rb est associée à une progression du cycle cellulaire sans interruption fréquemment retrouvée dans la leucémie aiguë lymphoblastique (Horsthemke, 1992; Tsai et al., 1996). Sa

qualification de « suppresseur de tumeur » provient de sa capacité à réprimer et séquestrer les facteurs de transcription E2F lorsqu'il est déphosphorylé et ainsi à inhiber la transcription de gènes essentiels à la transition G1/S (Chellappan et al., 1991; Weintraub et al., 1992). Dans ce contexte, CDK4 et CDK6 jouent un rôle crucial dans la phosphorylation de Rb (Matsushime et al., 1992; Meyerson and Harlow, 1994). Lorsque la protéine Rb est phosphorylée par ces CDK, elle perd sa fonction et ne séquestre plus E2F, ce dernier peut ainsi induire la transcription de gènes essentiels au passage en phase S. En amont, les CKI comme p16^{INK4A} ou p19^{INK4D} se lient directement à CDK4 et CDK6 et inhibent leurs activités conduisant ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Il est intéressant de noter que le locus *INK4A/Arf* code deux protéines : p16^{INK4A} et p19^{ARF} (p14^{ARF} chez l'Homme) (Figure 4). L'architecture du locus est complexe, chaque protéine étant codée par un ARNm distinct initié par un promoteur différent. p16^{INK4A} est codé par le transcrit α contenant les exons 1 α , 2 et 3, tandis que p19^{ARF} est codé par le transcrit β constitué des exons 1 β , et 2 et sans doute l'exon 3 (Duro et al., 1995; Haber, 1997). Bien que l'exon 2 soit commun, les séquences protéiques de p16^{INK4A} et p19^{ARF} sont uniques car l'exon partagé est lu dans des cadres différents. Les deux protéines possèdent une activité biologique antiproliférative et interagissent avec les voies du rétinoblastome et du suppresseur de tumeur p53 par des mécanismes biochimiques différents. La liaison entre p16^{INK4A} et CDK4 ou CDK6 induit un changement de conformation qui perturbe l'interaction avec les cyclines D (Russo et al., 1996), promouvant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en G1 (Figure 3) (Ezhevsky et al., 2001).

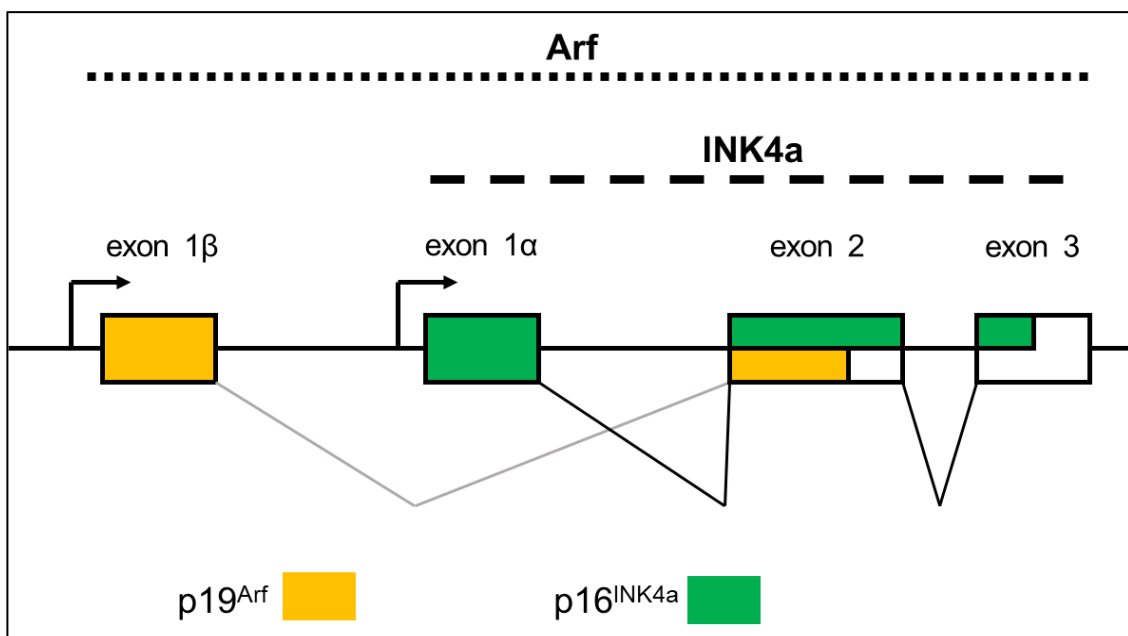


Figure 4 Structure du locus du gène INK4A/Arf

Ce locus pour deux protéines qui régulent la voie Rb : p16^{INK4A} et p19^{ARF}. A noter que ces derniers sont traduits à partir de l'exon 2 dans des cadres de lecture différents, et que p19^{ARF} se termine à l'exon 2 tandis que p16^{INK4A} est terminée dans l'exon 3. p19^{ARF} est donc codé par l'exon 1 (situé à 13Kb de l'exon 1) et par l'exon 2.

L'expression de p16^{INK4A} est également régulée par Rb puisque la phosphorylation de Rb entraîne une augmentation de l'expression de p16^{INK4A} qui inhibe CDK4 / 6, ce qui provoque une augmentation des taux de Rb hypophosphorylés, conduisant à une diminution de l'expression de p16^{INK4A} (Li et al., 1994). Cependant, l'expression de p16^{INK4A} est élevée dans les cellules Rb négatives indiquant d'autres mécanismes de régulation p16^{INK4A}.

Dans la littérature, il est décrit que des polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP pour Single nucleotide polymorphism) correspondant à une variation d'une seule paire de base, sont associés à une susceptibilité de développer certaines pathologies. Les gènes p16/CDKN2A, p15/CDKN2B et p14/ARF sont retrouvés au niveau du locus 9p21.3 et sont parfois délétés dans certaines maladies comme les mélanomes. Dans ce même locus se trouve le gène d'un long ARN non codant nommé ANRIL (pour Antisens Noncoding RNA in the INK4A Locus) qui est transcrit en un ARNm dans le sens opposé à celui des trois autres gènes du cluster. Grâce à des études sur génome entier (GWAS), nous savons que des SNP dans le gène ANRIL sont associés à l'apparition de certaines pathologies comme le diabète de type II, les maladies cardiovasculaires et les cancers, retrouvées au cours du vieillissement (Cunnington et al., 2010). Ainsi, étudier l'implication et le rôle d'ANRIL dans le vieillissement pourrait expliquer la régulation des trois gènes cités ci-dessus.

ii. Voie p21Cip/p53

La protéine p53 est actuellement le suppresseur de tumeur le mieux décrit du fait de mutations géniques présentes dans 50 à 55% des cancers (Hollstein et al., 1994). Suite à un stress entraînant des dommages à l'ADN et conduisant à un arrêt du cycle cellulaire, des complexes protéiques vont être recrutés afin de réparer ces cassures. Les protéines kinases ATM et ATR phosphorylent Chk1 et Chk2 (Gatei et al., 2003) qui, à leur tour, vont activer p53 en le phosphorylant (Banin et al., 1998; Hirao et al., 2000). De plus, p19^{ARF} diminue la dégradation de p53 en inhibant MDM2 (HDM2 chez l'homme) qui sert de principale ubiquitine ligase E3 pour la dégradation de p53. En effet, il a été montré que p19^{ARF} pouvait inhiber le transport de MDM2 du noyau vers le cytoplasme et donc stabiliser p53 dans le noyau (Tao and Levine, 1999). Ainsi activé, p53 permet la transcription de p21^{Cip1} (He et al., 2005) qui se fixe sur Cdk2 et empêche la formation du complexe Cdk2/CyclineE (Harper et al., 1995). p21^{Cip1} est également capable de se fixer sur Cdk4 (He et al., 2005) et ainsi stopper le cycle cellulaire en phase G1. Ceci montre bien une interrelation entre les voies p53 et p16^{INK4A} de par leur action sur les Cdk. En condition physiologique, p53 est une protéine à courte durée de vie qui subit continuellement une ubiquitination et une dégradation par le protéasome. MDM2, l'une des premières cibles de p53, forme ainsi une

boucle autorégulatrice négative pour maintenir le faible niveau d'expression de p53 (Haupt et al., 1997; Honda et al.). Récemment, Wiley et ses collaborateurs ont montré qu'après un traitement avec des inhibiteurs d'interaction de MDM2 avec p53 (nutlin-3a ou MI-63), des cellules humaines ont acquis un phénotype de cellule sénescence constituant ainsi un bon modèle d'étude (Wiley et al., 2018).

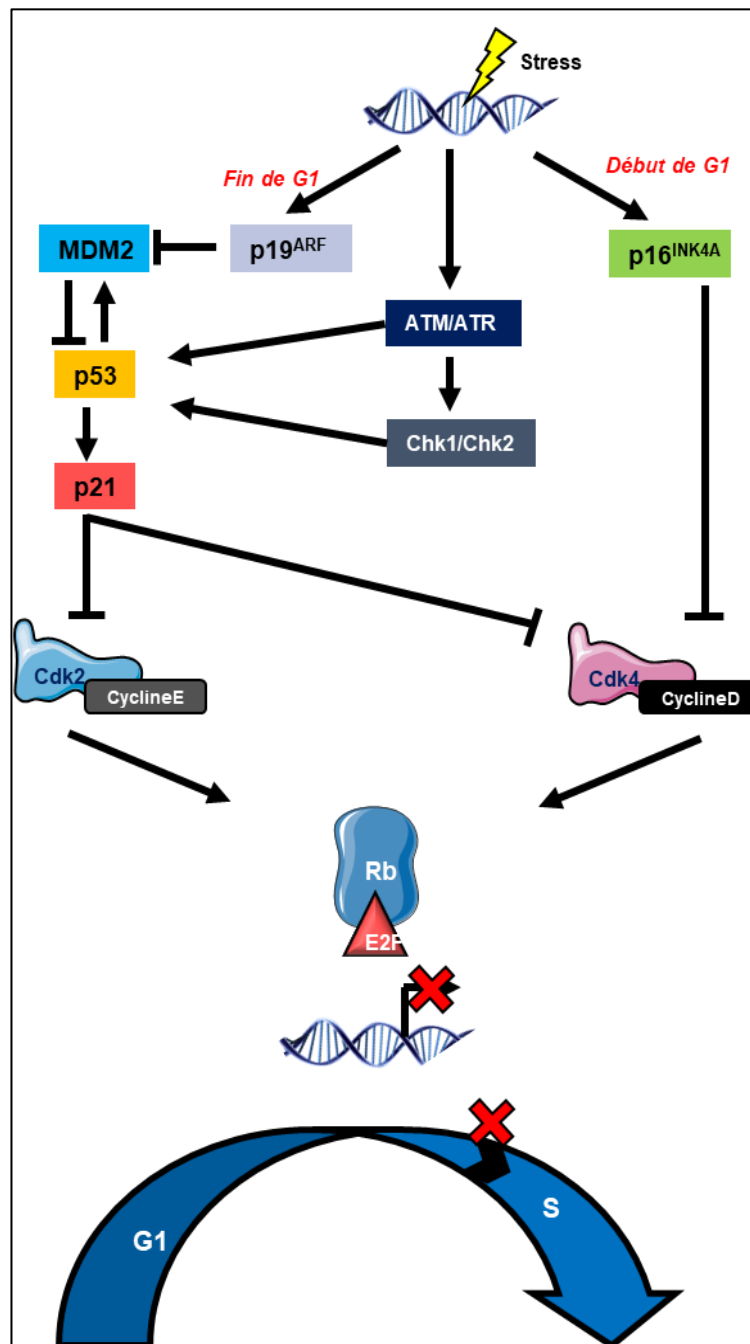


Figure 5 Les deux voies canoniques principales de la sénescence

Les deux voies sont $p16^{INK4A}/Rb$ et $p53/p21^{Cip1}$. En réponse à un stress, $p19^{ARF}$ inhibe MDM2 (E3 ubiquitine ligase permettant la dégradation de p53), induisant ainsi la libération de p53. Suite à des dommages à l'ADN, les protéines kinases ATM et ATR vont être recrutées et phosphoryler Chk1 et Chk2. Ces protéines vont à leur tour activer p53 en le phosphorylant, ceci permettant l'activation de $p21^{Cip1}$. Ce dernier pourra alors inhiber les complexes Cdk2/Cycline E et Cdk4/Cycline D et participer à l'arrêt du cycle cellulaire.

2. Attrition des télomères

Dans les cellules en prolifération, l'érosion progressive des télomères expose les extrémités chromosomiques à double brin libre non coiffée à la dégradation, déclenchant des dommages à l'ADN et un arrêt du cycle cellulaire (Fagagna et al., 2003). Les télomères déterminent ainsi la capacité de réplication cellulaire (Allsopp et al., 1992) comme le prétendait Hayflick. En effet, des études réalisées chez l'Homme ont montré une corrélation négative entre la longueur des télomères et l'âge (Vaziri et al., 1994; Weng et al., 1995). Une autre étude a montré une diminution de la taille des télomères dans les cellules de la peau, les leucocytes et les tissus synoviaux chez des patients âgés de 70 à 95 ans (Friedrich et al., 2000). Cependant, certains tissus n'ayant pas de grande capacité de prolifération présentent également une attrition des télomères comme le muscle squelettique et le TAB sous-cutané (Daniali et al., 2013).

3. Résistance à l'apoptose

Une cellule bien qu'endommagée ne va pas entrer directement dans un état apoptotique mais en senescence. Une hypothèse serait que les changements cellulaires pro-sénescents soient activement anti-apoptotiques et que les cellules sénescents soient résistantes à l'apoptose. Cette résistance a été initialement rapportée par Wang en 1995 qui a observé que des fibroblastes pulmonaires humains (WI-38) étaient résistants à la mort causée par une absence de sérum uniquement après avoir subi plusieurs cycles (58 passages) comparativement aux cultures WI-38 à moins de 15 passages (Wang, 1995). Plus tard, Seluanov et ses collaborateurs ont fourni des preuves solides de l'existence d'une résistance à l'apoptose dans les fibroblastes humains sénescents en relation directe avec l'activation de p53 (Seluanov et al., 2001). En effet, ils ont découvert que les cellules WI-38 subissaient une apoptose dépendante de p53 en réponse à l'actinomycine D ou une irradiation aux UVB, alors qu'une apoptose indépendante de p53 se produisait avec le cisplatine et l'étoposide à forte dose. De plus, lorsque les cellules deviennent sénescents avec des stimuli apoptotiques dépendants de p53, elles subissent une nécrose (Seluanov et al., 2001). Il semblerait donc que l'expression de p53 dans les cellules sénescents ait rétabli leur capacité à entrer en apoptose.

II. Caractérisation d'une cellule sénescence

La combinaison de plusieurs marqueurs est nécessaire à la caractérisation d'une cellule sénescence. Dans les prochains chapitres nous allons décrire ceux qui sont le plus souvent utilisés.

1. Morphologie cellulaire et stress lysosomal

La cellule sénescence adopte une morphologie plus large avec un cytoplasme important et un noyau souvent plus gros. Selon le type cellulaire étudié et le stress induit, sa morphologie peut cependant varier. En effet, l'activation de Raf dans des fibroblastes pulmonaires humains IMR90 présentent une forme très allongée (Zhu et al., 1998) . En 1995, un autre marqueur a pu être identifié : la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal) détectable à pH 6 (Dimri et al., 1995). L'activité SA- β -gal reflète en partie l'augmentation de la masse lysosomale qui est importante dans les cellules vieillissantes (Kurz et al., 2000). Cependant, ce marqueur peut être détecté de manière indépendante du vieillissement, par exemple dans des cellules cultivées dans des conditions de confluence pendant de longues périodes ou dans des structures tissulaires telles que les follicules pileux (Dimri et al., 1995). Néanmoins, ce marquage est augmenté avec l'âge dans des fibroblastes et kératinocytes humains. Par la suite, la détection des cellules sénescences *in vitro* mais également *in vivo* chez les rongeurs et les primates (babouins) (Herbig et al., 2006), le poisson zèbre *Danio rerio* (*D. rerio*) (Kishi et al., 2008) et *C. elegans* (Dmitrieva and Burg, 2007) a été mise au point.

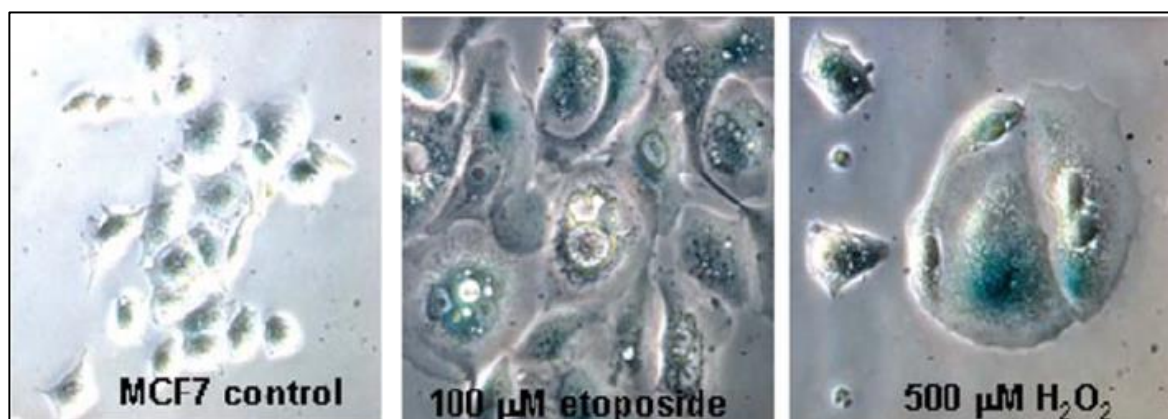


Figure 6 Marquage SA- β -galactosidase

MCF-7 induites en sénescence après traitement à 100 μ M d'etoposide ou 500 μ M d' H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène), deux inducteurs de la sénescence (Saretzki, 2010). L'acidification du cytoplasme de part l'acidification des lysosomes et les membranes lysosomales au cours de la sénescence, active l'enzyme SA- β -galactosidase qui en présence de son substrat, le X-gal, forme un précipité bleu.

2. Modifications moléculaires

a. Expressions de CDKI spécifiques et arrêt du cycle cellulaire

Selon les types cellulaires et les stress associés à l'état de sénescence, l'importance et donc l'expression de p21^{Cip1}/p53 et p16^{INK4A} diffère. En effet, Stein et ses collaborateurs ont montré dans des fibroblastes humains que l'arrêt du cycle des cellules sénescents se produisait avant l'accumulation de l'inhibiteur p16^{INK4A} (Stein et al., 1999) suggérant que p21^{Cip1} pouvait être suffisant pour cet événement. Généralement, la voie p21^{Cip1}/p53 est le médiateur principal de la sénescence induite par le raccourcissement des télomères et le stress génotoxique alors que la voie p16^{INK4A} est plutôt responsable des autres formes de sénescence. En effet, il a été montré que la cascade de signalisation p38MAPK / ESE-3 conduisant à l'activation du gène p16^{INK4A} était surtout impliquée dans la sénescence en réponse à un stress de type ERO, un stress osmotique et des facteurs de croissance (Iwasa et al.; Jung et al., 2004). *In vitro* et *in vivo* l'augmentation de l'expression de p16^{INK4A} et généralement de p21^{Cip1} et p53 est la signature moléculaire d'une sénescence cellulaire (Althubiti et al., 2014; Burd et al., 2013; Krishnamurthy et al., 2004; Zindy et al., 1997). L'expression génique et protéique ainsi que le marquage immunohistochimique des CDKI est habituellement analysé en laboratoire afin de déterminer si une cellule est sénescence (Figure 7a 7b 7c). Cependant, selon le type de stress qui induit la sénescence, la cellule peut se retrouver bloquée en phase G2. Le fait que p21^{Cip1} soit également impliqué dans la transition de la phase G2/M laisse à penser que son activation peut induire un arrêt du cycle en phase G2 (Waldman et al., 1996). En 2003, Baus et ses collaborateurs ont démontré qu'en réponse à des agents génotoxiques, les fibroblastes humains étaient arrêtés en phase G2 (Baus et al., 2003). Un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 permet de compléter l'expression des CDKI (Figure 7d). Pour cela les cellules sont incubées avec de l'iodure de propidium et le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle est déterminé par cytométrie en flux.

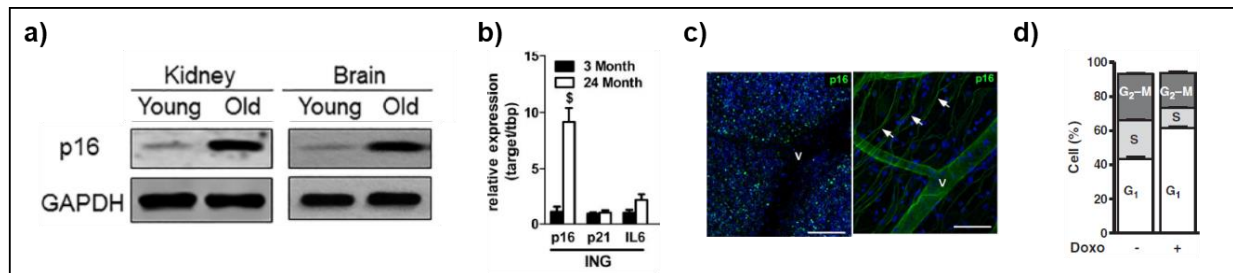


Figure 7 Expression de CDKI et arrêt du cycle cellulaire

a) Expression protéique de p16^{INK4A} dans du rein et cerveau de souris jeunes (3mois) et âgées (18mois) (Wang et al., 2017a). b) Expression génique de p16^{INK4A} et p21^{Cip1} dans du tissu adipeux inguinal de souris femelles jeunes (3mois) et âgées (24mois) (B Stout et al., 2014). c) Marquage p16^{INK4A} (vert) dans la rétine humaine provenant de patients âgés de 40ans (photo de gauche) ou de 85 ans (photo de droite) (López-Luppo et al., 2017). d) Cellules induites en sénescence par la doxorubicine arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire, analysé par cytométrie en flux (Lee et al., 2012)

b. Altération expression génique

Des modifications d'expression génique dans les cellules sénescents sont caractéristiques et spécifiques des types cellulaires et du stress induisant cet état de sénescence (Barradas et al., 2002; Trougakos et al., 2006). Ainsi, Mason et ses collaborateurs ont caractérisé les changements moléculaires et cellulaires se produisant dans des fibroblastes humains IMR90 devenus sénescents par l'induction de l'oncogène Ras (Mason et al., 2004). En plus d'une augmentation de p16^{INK4A}, p15^{INK4B} et p21^{Cip1}, l'expression des gènes mitotiques (topoisomérase II) et des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire comme les cyclines A et B sont diminués. Ceci est également retrouvé sur des cellules induites en sénescence par du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) connu pour induire du stress oxydant et des dommages à l'ADN (Barradas et al., 2002). Enfin, l'expression d'ARN non codant tels que les microARN est modifiée et eux-mêmes interviennent dans la régulation d'expression de régulateurs de la sénescence (Gorospe and Abdelmohsen, 2011) comme par exemple le miR-24 qui inhibe l'expression de p16 et empêche la sénescence cellulaire (Lal et al., 2008).

3. Modifications cellulaires

a. SAHF (foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence)

L'hétérochromatine est une structure dense dans laquelle l'ADN et les protéines histones sont condensées, aboutissant à une diminution de la transcription de gènes contenus dans ces régions. La sénescence s'accompagne d'une réorganisation de l'ADN qui se retrouve compacté autour de protéines histones et forme ce qui est appelé un **foyer**

d'hétérochromatine associé à la sénescence ou **SAHF**. Les SAHF sont constitués de plusieurs couches d'hétérochromatine successives, et participent à l'arrêt du cycle cellulaire en réprimant les gènes cibles comme E2F et ce, de manière dépendante de p16^{INK4A}/Rb (Narita et al., 2003). L'hétérochromatine contient des variants d'histones H2A appelé mH2A (macroH2A), des histones hypoacétylées, des histones méthylées (H3K9me2/3), des chaperonnes (H3.3), des histones d'architecture (HMGA) ou encore des histones se liant à l'hétérochromatine (HP1). Il a été suggéré qu'au cours de la sénescence, des variants d'histones spécifiques tels que la macroH2A ou H3.3 contribuaient à la sénescence (Duarte et al., 2014; Zhang et al., 2005). Cependant le rôle de SAHF dans les cellules sénescents reste controversé. En effet, Kosar et ses collaborateurs ont démontré que l'importance des SAHF variait en fonction du type cellulaire concerné et de la source de stress induisant l'état de sénescence (Kosar et al., 2011). De plus, il a été montré que des fibroblastes humains (IMR90) après plusieurs passages avaient une synthèse réduite des histones (O'Sullivan et al., 2010) et qu'une expression élevée des histones entraînait une prolongation de la durée de vie chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Feser et al., 2010).

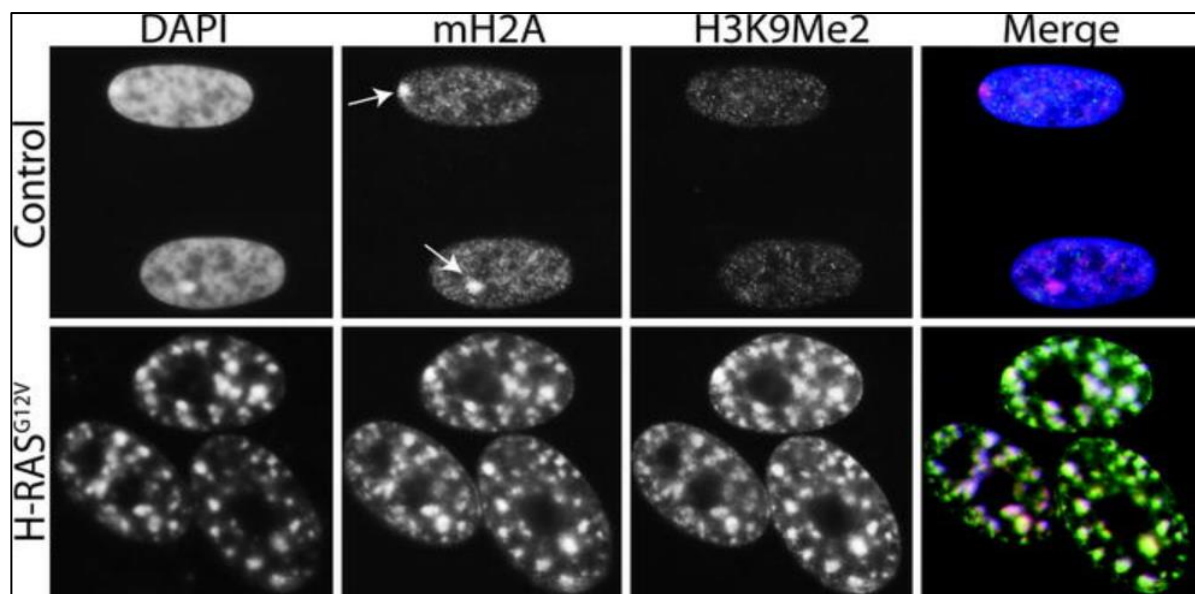


Figure 8 Marquage des foyers d'hétérochromatine

Marquage de mH2A et H3K9Me2, marqueurs de compaction de la chromatine suite à une induction de la sénescence par l'oncogène Ras. (Aird and Zhang, 2013)

b. Domages à l'ADN

Une cellule sénescence peut présenter des foyers de lésion de l'ADN (**Senescence associated DNA damage Foci ou SDF**) caractérisés par des foyers protéiques signalant

des dommages double brins d'ADN telles que les foyers γ H2AX (Figure 9) . Par exemple, lors de dommages à l'ADN, l'histone H2AX sera phosphorylée au niveau de la sérine 139 notamment par les kinases ATM et portera alors le nom de γ H2AX. En effet, le nombre de foyers γ H2AX augmente dans les cellules primaires sénescents de la souris et de l'Homme en culture (Nakamura et al., 2008) ainsi que dans les kératinocytes de primates âgés ou des lymphocytes humains (Herbig et al., 2006; Sedelnikova et al., 2004).

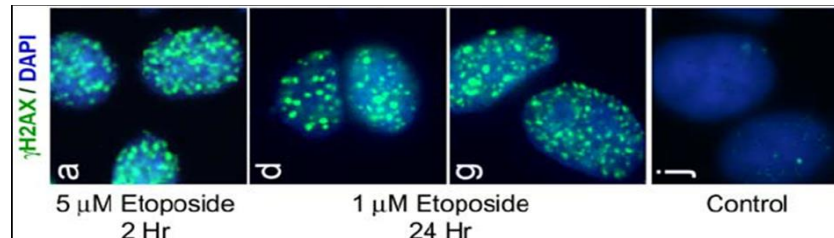


Figure 9 Marquage des cassures double brins

Marquage γ H2AX (vert), et des noyaux avec le DAPI (bleu) suite à un traitement à l'etoposide sur 2h ou 24h connu pour entrainer de la sénescence cellulaire (Cowell et al., 2007). Ce marquage témoigne de cassures double brins de l'ADN.

c. Enveloppe nucléaire

Comme évoqué plus haut, la surface interne de l'enveloppe nucléaire est bordée d'une couche protéique qui contribue à la taille, à la forme et à la stabilité du noyau. Les protéines structurales majeures sont les lamines nucléaires, qui sont des filaments intermédiaires. C'est donc une structure dynamique car chaque fois qu'une cellule entre en mitose, elle est désassemblée puis réassemblée dans le cycle cellulaire suivant (Gerace and Blobel, 1980). Les mutations de la lamine A conduisent à un ensemble de maladies appelées « laminopathies ». Les lamines de type B proviennent de deux gènes différents : **LMNB1** et **LMNB2**. L'une ou l'autre lamine de type B peut être suffisante pour la survie cellulaire (Broers et al., 1997). Les lamines B et A forment des réseaux distincts mais interagissent et influencent l'expression et l'organisation de l'autre. La lamine B1 semble être particulièrement intéressante dans la sénescence puisque son expression diminue avec le vieillissement (Figure 10) (Freund et al., 2012; Shah et al., 2013).

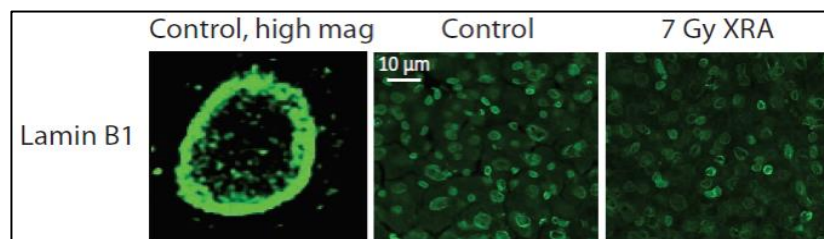


Figure 10 Marquage de l'enveloppe nucléaire

Marquage de la lamine B1 (vert) dans le noyau des cellules hépatiques, diminué suite à une irradiation, connue pour être un inducteur de la sénescence cellulaire (Freund et al., 2012).

d. La lipofuscine

En 1989, Sohal et Brunk ont été les premiers à montrer que la **lipofuscine**, un pigment résultant de la dégradation des organites cellulaires, pouvait être utilisée comme un marqueur du stress oxydatif et du vieillissement (Sohal and Brunk, 1989). Plus récemment, ceci a été confirmé *in vitro* et *in vivo* comme étant un marqueur de sénescence (Evangelou and Gorgoulis, 2017; Georgakopoulou et al., 2013).

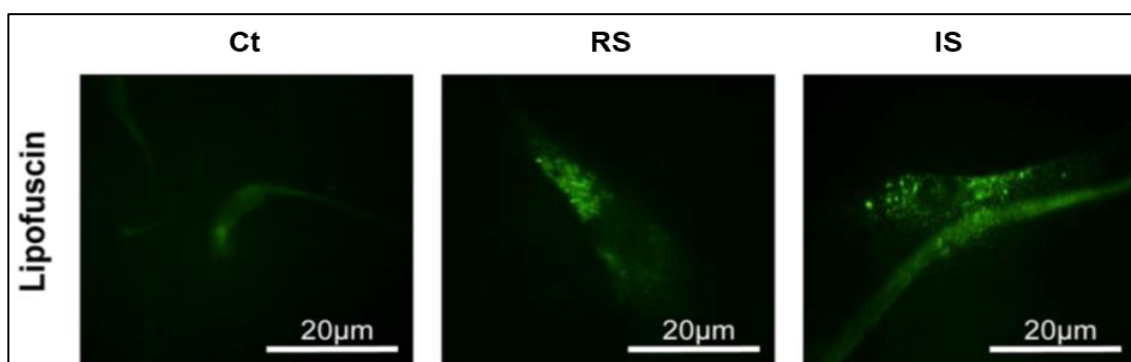


Figure 11 Marquage de la dégradation des organites

Marquage de la lipofuscine (vert) dans des fibroblastes pulmonaires humains contrôles (Ct) ou induits en sénescence par irradiation 12x4Gy (IS) ou après plusieurs passages (RS) (Georgakopoulou et al., 2013).

4. Résistance à l'apoptose

Comme déjà évoqué, la sénescence permet d'échapper à l'apoptose. Des études ont pu montrer que des cellules sénescents étaient résistantes aux traitements UV (120mJ) et à la staurosporine (35nM), ceci lié à une expression réduite de la caspase 3 (Marcotte et al., 2004). Des travaux ultérieurs utilisant des fibroblastes humains ont confirmé la résistance à la mort cellulaire induite par la staurosporine et démontré une résistance à la thapsigargine (jusqu'à 700 nM) (Ryu et al., 2007). La survie accrue des fibroblastes sénescents dans ces conditions a été attribuée à une incapacité à réguler à la baisse Bcl2 (anti-apoptotique) dans des conditions de stress cellulaire.

5. L'autophagie

L'autophagie est un programme responsable du renouvellement des protéines cellulaires et des organites endommagés. Ce processus conservé est caractérisé par la formation de vésicules cytosoliques appelées autophagosomes qui séquestrent le contenu cytoplasmique et le transmettent aux lysosomes. Plusieurs protéines font partie de ce processus dont LC3 qui est connue pour former une association stable avec la membrane des autophagosomes.

Young et ses collaborateurs ont défini l'autophagie comme un nouveau mécanisme effecteur de la sénescence (Young et al., 2009). En effet, ils ont montré que des fibroblastes humains induits en sénescence par expression de l'oncogène Ras présentent une activation des processus autophagiques grâce au marqueur LC3. Une autre étude publiée en 2011 a montré que des dysfonctions dans les processus d'autophagie induisent une sénescence des fibroblastes humains en culture (Kang et al., 2011). En effet, l'inhibition de gènes essentiels à ce processus comme Lamp2 (lysosomal-associated membrane protein 2) ou ATG7/12 (autophagy-specific gene) induit une augmentation du marqueur SA-β-Gal et de la lipofuscine. Ces résultats laissent à penser que l'autophagie peut dans certains cas induire la sénescence et dans d'autres permettre de contourner ce phénomène, ce qui montre que plusieurs paramètres doivent être considérés comme le type cellulaire et le type de stress imposé.

Tableau 3 Marqueurs de la sénescence cellulaire

	Senescence
Arrêt du cycle	Induit par le raccourcissement des télomères (répllicative)/Stress oxydant (oxydative). Phase G1
Effecteurs	p16 ^{INK4A} , p21 ^{Cip1} , p53, p19 ^{Arf} et Rb
Marqueurs	Expression de CDKI Changements morphologiques Dommages à l'ADN SAHF SA-β-gal Résistance à l'apoptose Autophagie

III. Sécrétions d'une cellule sénescence : SASP

En plus des changements morphologiques, il a pu être montré que les cellules sénescences sécrétaient des protéines spécifiques (souvent pro-inflammatoires) regroupées sous le terme de **SASP** pour « **Senescent Associated Secretory Phenotype** » (Coppé et al., 2008). Dans le microenvironnement de la cellule sénescence, ces sécrétions vont induire, par action paracrine, une communication avec les autres cellules conduisant à la propagation du stress (Nelson et al., 2012) (Figure 12). Les cellules sénescences présentent une augmentation de l'expression de gènes codant pour des cytokines inflammatoires, des chimiokines, des facteurs de remodelage de la matrice extracellulaire et des facteurs de croissance (Coppé et al., 2008; Purcell et al., 2014; Rodier et al., 2009; Shelton et al., 1999; West et al., 1996; Zhang et al., 2018). Par exemple, Purcell et ses collaborateurs ont comparé l'expression de gènes associés à différents types d'inducteurs de la sénescence comme l' H_2O_2 , le 5-Aza (5-Aza-2-deoxycytidine, qui induit des déméthylations de l'ADN), et l'adriamycine (qui est un agent intercalant de l'ADN) (Purcell et al., 2014). Des gènes tels que l'interleukine-1 α (IL-1 α), IL-1 β et IL-8 sont augmentés dans ces différentes conditions par rapport à des cellules non sénescences, avec des variations plus ou moins importantes selon l'agent inducteur de sénescence utilisé (Purcell et al., 2014). Les facteurs sécrétés dans le SASP varient donc selon le type cellulaire et les déclencheurs de la sénescence. Parmi les nombreux facteurs du SASP, certaines cytokines pro-inflammatoires majeures sont retrouvées telles que IL-1 α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 (Chien et al., 2011; Coppé et al., 2008; Kuilman et al., 2008). Ces facteurs seraient induits par de multiples mécanismes dépendant de certains facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire κB (**NF- κB**) (Chien et al., 2011), CCAAT/enhancer binding protein- β (**CEBP- β**) (Kuilman et al., 2008), **p38MAPK** (Freund et al., 2011), et **mTOR** (Herranz et al., 2015; Laberge et al., 2015) dans des cellules sénescences. En effet, il a été démontré que l'inhibition de la voie mTOR contribuait à la diminution de la production de certains de ces facteurs comme IL-6 ou IL-8 (Narita et al., 2011).

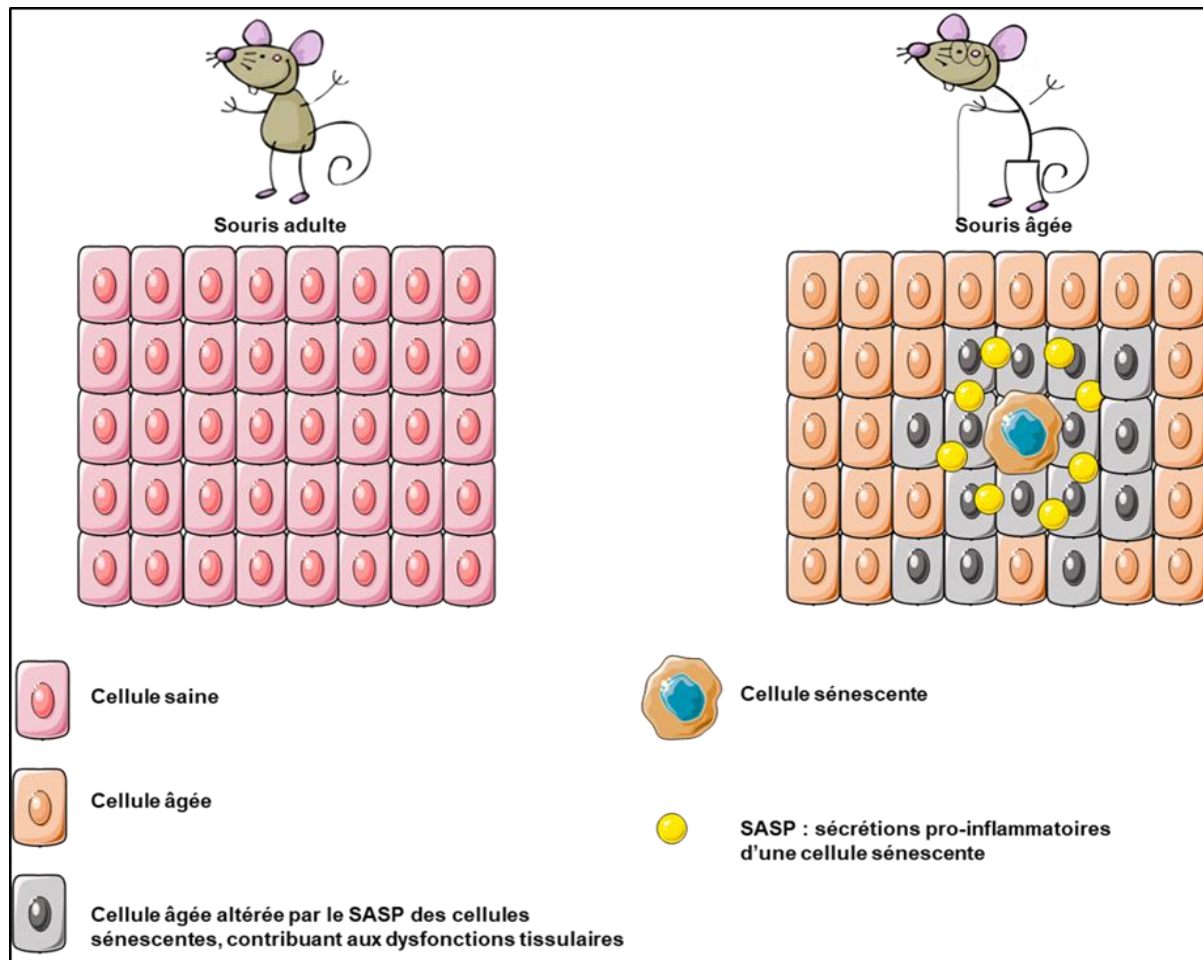


Figure 12 Le SASP

Schéma représentant un tissu adulte (à gauche - non sénescence) et âgé (à droite - sénescence) contenant des cellules sénescences qui sécrètent un SASP composé de molécules pro-inflammatoires. Ce sécrétome particulier de la cellule sénescence altère de manière paracrine les autres cellules de ce tissu aboutissant à une dysfonction de ce tissu.

Bien que le SASP soit associé à la sénescence, il paraît indépendant de l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, dans des fibroblastes humains et des cellules épithéliales mammaires, la surexpression de $p16^{\text{INK4A}}$ est suffisante pour induire l'arrêt du cycle associé à la sénescence sans aucun dommage à l'ADN observé, et sans SASP associé (Coppé et al., 2011). En revanche, les dommages à l'ADN conduisent à un SASP indépendant des niveaux de $p16^{\text{INK4A}}$. Ces données sont en accord avec d'autres études démontrant la nécessité de dommages à l'ADN médiée par ATM pour l'expression de gènes du SASP (Rodier et al., 2009). De plus, il a été démontré que le facteur de transcription GATA4, qui est un substrat de l'autophagie, est stabilisé dans les cellules sénescences de manière dépendante aux dommages à l'ADN mais indépendante de p53 ou $p16^{\text{INK4A}}$, et que GATA4 agit comme un activateur en amont de NF- κ B pour initier le SASP (Kang et al., 2015). D'autre part, il a été montré qu'une protéine liée à la chromatine appelée HMGB2 active la transcription d'IL-6 et IL-8 (Aird et al., 2016). Sa perte induit une diminution d'expression de ces cytokines mais

n'induit pas un arrêt du cycle cellulaire. Ces données nous amènent à penser que l'arrêt du cycle cellulaire et le SASP pourraient être régulés par des mécanismes différents. Cependant, HMGB1, une autre protéine de la famille HMGB, est un facteur sécrété qui induit un arrêt du cycle en phase G1, et cette sécrétion est dépendante de p53 (Davalos et al., 2013). D'autres régulateurs épigénétiques, jouent également un rôle important dans la régulation de l'induction du SASP (Capell et al., 2016). Plus récemment, une étude a montré que les cellules sénescences dépourvues de p53 présentaient un SASP exacerbé, suggérant que le SASP est contrôlé négativement p53 (Wiley et al., 2018). De plus, en augmentant l'activité de p53, causée par des inhibiteurs d'interaction entre p53 et MDM2 (nutlin-3a et MI-63), la production de cytokines inflammatoires comme celle de l'IL-6 et de l'IL-1 α est fortement diminuée. Ensemble, ces résultats suggèrent que le SASP, sans affecter l'arrêt du cycle cellulaire, pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour diverses maladies liées au vieillissement.

Le SASP participe à la propagation de cet état pro-inflammatoire dans un tissu endommagé (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008). En raison des altérations de l'immunité innée et adaptative associées au vieillissement (Douek et al., 1998; Ginaldi et al., 2000; Merino et al., 1998; Simon et al., 2015; Wikby et al., 1994), l'élimination des cellules sénescences par le système immunitaire pourrait ne pas remplir correctement ses fonctions d'épuration, entraînant l'accumulation de cellules sénescences dans les tissus âgés. Ainsi, il est possible que des niveaux accrus de cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules sénescences favorisent l'inflammation chronique, accélérant ainsi les maladies associées à l'âge comme l'arthrose, la fibrose pulmonaire, la maladie d'Alzheimer et le cancer.

IV. Les inducteurs de la sénescence répllicative et oxydatif

Les principaux inducteurs de la sénescence sont l'attrition des télomères, le stress oxydatif, le stress génotoxique et l'activation d'oncogène. Ces différents mécanismes provoquent et activent différentes voies de la sénescence en fonction du type cellulaire.

1. Stress oxydatif

Au cours du vieillissement, les cellules n'arrivent plus à maintenir un équilibre correct entre les mécanismes pro-oxydants et antioxydants du fait de leur métabolisme altéré et de systèmes antioxydants défaillants (Bratic and Larsson, 2013). Ce déséquilibre provoque une accumulation d'ERO qui sont générées en excès par le métabolisme de l'oxygène dans la

chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne mitochondriale (Figure 13). Des sources « exogènes » comme les produits chimiques, la pollution, les UV, le tabagisme et les carences nutritionnelles sont des situations également à l'origine d'une surproduction d'ERO (Dröge, 2002).

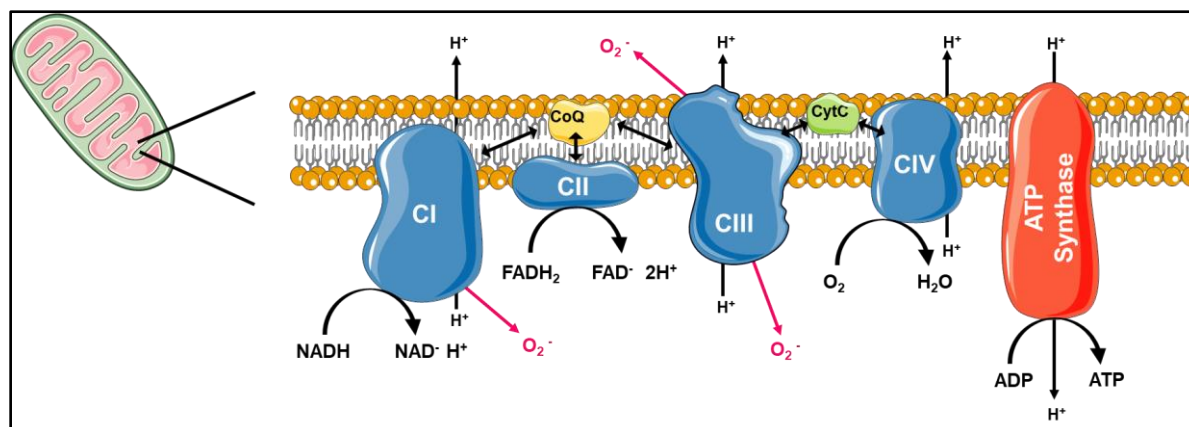


Figure 13 La chaîne respiratoire mitochondriale production d'ERO

L'ATP est générée par la phosphorylation oxydative accomplie par 4 complexes (CI à CIV) et à l'ATP synthase. De l'énergie est libérée par le transfert d'électrons de NADH et FADH₂ à l'O₂ et est utilisée pour faire sortir les protons (H⁺) en CI, CIII et CIV. L'ion superoxyde (O₂⁻) est formé par les CI et CIII. CoQ : Coenzyme Q ; CytC : Cytochrome C

Les ERO, en condition physiologique, sont essentiels car ils permettent de réguler les phénomènes d'apoptose ou de modifier l'expression de gènes codant pour des enzymes antioxydantes (Curtin et al., 2002; Duracková, 2010; Palmer and Paulson, 1997). Cependant, leur surproduction conduit à des lésions irréversibles sur les lipides, les protéines, les glucides et surtout l'ADN (phénomène appelé oxydation). La preuve de la relation entre senescence et stress oxydant a été faite lorsque l'induction de la sénescence dans les fibroblastes humains a été retardée de façon significative quand ils ont été cultivés dans une concentration d'oxygène tissulaire plus physiologique (3%) par rapport aux concentrations conventionnelles d'oxygène (20%) (Chen et al., 1998). De plus, une étude américaine de 2001 a montré une corrélation positive entre le stress oxydant et l'âge chez des hommes et des femmes, indépendamment du sexe (Trevisan et al., 2001).

2. Stress génotoxique

D'autres agents comme l'irradiation, les UV, les agents alkylants utilisés en chimiothérapie vont directement agir sur l'ADN et induire des dommages irréversibles. En effet, il a été démontré que des agents génotoxiques comme l'irradiation et la neocarzinostatin (agent anticancéreux) induisent une sénescence cellulaire accompagnée de cassure double brins d'ADN notamment au niveau des régions télomériques, sans pour autant induire un

raccourcissement des télomères (Fumagalli et al., 2012; Hewitt et al., 2012). D'autres génotoxiques peuvent cependant induire une sénescence par raccourcissement des régions télomériques comme l'irradiation de cellules par des UVA (Kawanishi Shosuke and Oikawa Shinji, 2006).

3. Activation d'oncogène

La sénescence induite par les oncogènes (processus appelé *oncogene-induced senescence* ou OIS) est une réponse de défense antiproliférative au stress oncogénique et constitue une barrière efficace à la progression tumorale. L'oncogène Ras est capable de transformer la plupart des cellules en un état tumorigène. Serrano et ses collaborateurs ont montré que l'expression de Ras dans des cellules humaines ou murines primaires entraînait certaines caractéristiques des cellules sénescents comme l'arrêt du cycle cellulaire et l'accumulation de p16^{INK4A} et p53 (Serrano et al., 1997). L'inactivation d'une de ces deux protéines empêche l'arrêt du cycle cellulaire en condition de surexpression de Ras, suggérant que le début de la sénescence cellulaire peut être activé prématurément en réponse à un stimulus oncogénique. De plus, il a été montré que l'expression de BRAF^{V600E} (autre oncogène) dans des mélanocytes humains est associée à un arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'à une augmentation de la protéine p16^{INK4A} (Michaloglou et al., 2005). Des résultats similaires ont été rapportés sur des biopsies tissulaires de nævi mélanocytaires (Gray-Schopfer et al., 2006). Dans un modèle murin où κ -Ras est activé de manière conditionnelle grâce au système Cre-recombinase, les animaux développent des adénocarcinomes dans les poumons qui sont positifs pour différents marqueurs de sénescence comprenant des marqueurs de dommages à l'ADN (Collado et al., 2005). Enfin, des souris transgéniques E μ -N-Ras (oncogène N-Ras activé dans les cellules hématopoïétiques) développent une multitude de lymphomes associés à de la sénescence cellulaire (Braig et al., 2005). Certaines expériences suggèrent que les ERO sont des médiateurs de la sénescence induite par les oncogènes. En effet, *in vitro*, des 3T3 NIH (fibroblastes murins) surexprimant Ras, produisent de grande quantité d'ion superoxyde (O₂⁻) ainsi qu'une activité mitochondriale élevée et une sénescence élevée (Irani et al., 1997; Lee et al., 1999). De plus, un traitement par de la N-acétyl-cystéine (inhibiteur d'ERO) diminue la sénescence induite par l'oncogène (Passos et al., 2010). Enfin, cette OIS semble être indépendante de l'attrition des télomères car en effet l'expression d'une télomérase active dans des fibroblastes surexprimant l'oncogène Ras ne permet pas de prévenir la OIS (Wei et al., 1999).

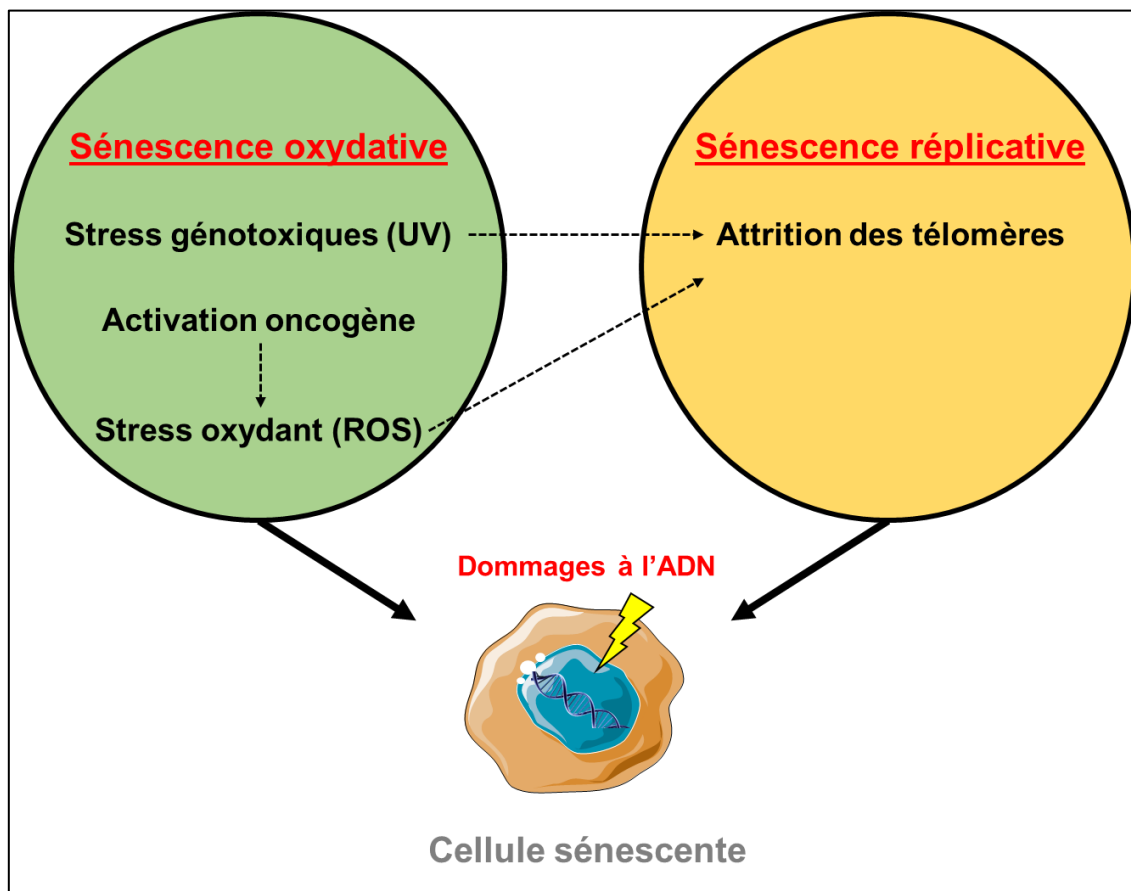


Figure 14 Les différents inducteurs de la sénescence cellulaire

On note deux types de sénescence : la sénescence répllicative qui correspond à la sénescence induite par l'attrition des télomères et la sénescence dite oxydative qui correspond à une sénescence induite par des stress génotoxiques (UV, irradiation, chimiothérapie), une activation d'oncogène (Ras) ou encore des stress oxydants qui impliquent une génération d'ERO élevé (O_2^- , H_2O_2). Cependant, un stress peut en déclencher d'autre (flèche en pointillée).

V. Cibler les cellules sénescentes

1. La clairance des cellules sénescentes *in vivo*

a. Génétique

Afin de montrer l'importance et le rôle que tiennent les cellules sénescentes, plusieurs études s'appuient sur l'utilisation de gène suicide inducible pharmacologiquement sous le contrôle du promoteur CDKN2A. Bien que ce promoteur code pour $p16^{INK4A}$, il code aussi pour $p19^{ARF}$. Ces deux gènes sont impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire mais leurs fonctions et leur rôle dans la sénescence ne sont pas identiques car en effet l'inactivation de $p19^{ARF}$ exacerbe la sénescence et le vieillissement chez les souris mutantes BubR1 alors que la suppression de $p16^{INK4A}$ atténue ces phénomènes (Baker et al., 2008). Dans le

tableau ci-après (Tableau 4), nous présentons quelques exemples de constructions géniques qui ont permis de mettre en évidence le rôle des cellules sénescents dans différentes pathologies associées au vieillissement.

Tout a commencé avec l'étude de Baker et ses collaborateurs en 2011 qui proposent d'utiliser un transgène pharmacologiquement inducible contenant, sous le promoteur CDKN2A, une caspase entourée d'une séquence FKBP permettant la dimérisation et une séquence IRES-GFP pour suivre l'intégration du transgène (Baker et al., 2011). Cette souris est appelée INK-ATTAC. Le système est activé suite à l'injection d'un composé nommé AP20187 qui permet la dimérisation et l'activation de la caspase ce qui tue par apoptose les cellules p16^{INK4A} positives, autrement dit les cellules sénescents. Cette construction est intégrée dans un modèle de vieillissement accéléré (BubR1^{-/-}), et une fois le complexe activé on observe une amélioration des fonctions musculaire et une augmentation de l'épaisseur du TAB (Baker et al., 2011).

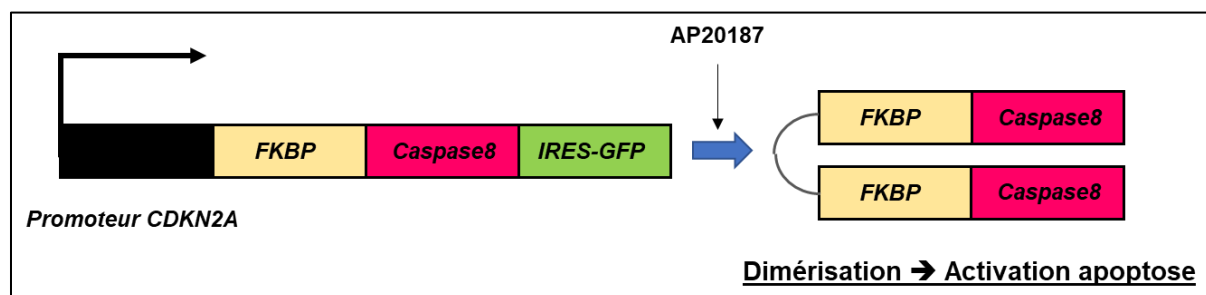


Figure 15 Construction génique souris INK-ATTAC

Le modèle murin INK-ATTAC permet l'élimination des cellules sénescents p16^{INK4A} positives et donc des cellules sénescents. Cette souris possède un transgène contenant : une caspase entourée d'une séquence FKBP permettant la dimérisation et une séquence IRES-GFP pour suivre l'intégration du transgène, le tout sous le promoteur CDKN2A. Suite à un traitement des souris par le composé AP20187, les cellules sénescents entrent en apoptose (Baker et al., 2011).

Dans un modèle de vieillissement physiologique, une administration prolongée de AP20187 permet au TAB de retrouver sa plasticité (Xu et al., 2015a), de diminuer la calcification de l'aorte (Roos et al., 2016), la stéatose hépatique (Ogrodnik et al., 2017), l'arthrose (Jeon et al., 2017) et d'améliorer les capacités physiques des souris âgées (Baker et al., 2016; Xu et al., 2018).

L'ensemble de ces études prouvent bien que les cellules sénescents tiennent un rôle très important voire déterminant dans le vieillissement et ses pathologies associées.

Tableau 4 Modèles murins transgéniques éliminant les cellules p16^{INK4A} positives

Nom souris	Transgène	Composé pharmacologique	Modèle	Tissu/cellules cibles sénescences	Conséquences	Ref
INK-ATTAC	FKBP-Casp8	AP20187	BubR1 ^{-/-}	Ubiquitaire	Retard d'apparition du vieillissement	(Baker et al., 2011)
INK-ATTAC	FKBP-Casp8	AP20187	12mois et 18mois	Ubiquitaire	Longévité augmentée +30%, Retard d'apparition du vieillissement	(Baker et al., 2016)
INK-ATTAC	FKBP-Casp8	AP20187	18mois	Ubiquitaire	Adipogénèse améliorée	(Xu et al., 2015a)
INK-ATTAC	FKBP-Casp8	AP20187	24mois	Ubiquitaire	Calcification aorte diminuée	(Roos et al., 2016)
INK-ATTAC	FKBP-Casp8	AP20187	24mois	Ubiquitaire	Diminution stéatose hépatique	(Ogrodnik et al., 2017)
INK-ATTAC	FKBP-Casp8	AP20187	12mois à 24mois	Ubiquitaire	Arthrose diminuée	(Jeon et al., 2017)
INK-ATTAC	FKBP-Casp8	AP20187	24mois	Ubiquitaire	Survie moyenne augmentée, endurance améliorée	(Xu et al., 2018)
p16-3MR	HSV1-TK	Ganciclovir	Irradiation	Ubiquitaire	Amélioration des fonctions des cellules souches musculaires	(Chang et al., 2016)
ARF-DTR	DTR	Toxine diphtérique	12mois	Ubiquitaire	Amélioration des fonctions pulmonaires	(Hashimoto et al., 2016)

b. Les sénolytiques

Les sénolytiques sont des molécules faisant partie des sénotherapeutiques (littéralement « soigner » les cellules sénescences) dont le rôle est d'induire en apoptose les cellules sénescences. Ces cellules sont métaboliquement très actives et bien qu'elles ne prolifèrent plus (contrairement aux cellules cancéreuses), il est possible d'inhiber les voies de la pro-survie afin d'induire leur mort. Les sénolytiques sont également utilisés dans le traitement de certains cancers, et un des effets toxiques est l'élimination des cellules non affectées. Pour pallier à ce problème, une étude de 2017 propose une plateforme de screening de molécules consistant à étudier dans un premier temps leur potentiel « sénotherapeutique » *in vitro*

(Fuhrmann-Stroissnigg et al., 2017). Suite à une première sélection (diminution de la sénescence, prolifération non modifiée), les auteurs s'assurent de ne cibler que les cellules sénescents et pas environnantes. Enfin, en mesurant le rapport $\frac{\text{nombre de cellules sénescents}}{\text{nombre de cellules totales}}$ suite au traitement, il sera possible de déterminer si ce composé est un **sénomorphe** (rapport >1) c'est-à-dire un composé qui diminue la sénescence sans tuer les cellules sénescents ; ou si ce composé est un **sénolytique** (rapport <1) c'est-à-dire un composé qui diminue la sénescence tout en éliminant les cellules sénescents.

i. Activeurs apoptose

Les voies Bcl-2 / Bcl-xL régulent l'apoptose dépendante des mitochondries. En général, les protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bak et BH3-only sont antagonisées par des molécules anti-apoptotiques tels que ceux de la famille de Bcl-2 (Bcl-W, Bcl-XL), présents à la membrane externe mitochondriale. En réponse à un stimulus apoptotique, les protéines BH3-only sont activées et empêchent les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 d'inhiber les membres pro-apoptotiques. Un changement conformationnel s'opère, pour Bax et Bak puisqu'ils s'oligomérisent et s'insèrent dans la membrane mitochondriale où ils forment des pores. En conséquence, des facteurs pro-apoptotiques sont libérés de la membrane mitochondriale interne dans le cytosol, tels que le cytochrome c qui contribue à la formation de l'apoptosome et à l'activation de la cascade de caspases.

Dans les cellules sénescents, les protéines de la famille de Bcl-2 (anti-apoptotiques) sont surexprimées. Plusieurs composés mimant l'action de BH3-only (BH3 mimétiques) paraissent prometteurs pour induire en apoptose les cellules sénescents. Le **Vénétoclax** (ABT-737) a fait ses preuves *in vivo* sur des souris atteintes de lésions pulmonaires induites par irradiation en permettant une activation de la voie des caspases ce qui active l'apoptose principalement dans les cellules sénescents et permet leur élimination. Le **Navitoclax** (ABT-263) s'est avéré plus intéressant que le Vénétoclax d'un point de vue administration et dose efficace. En 2016, plusieurs études ont pu montrer son efficacité sur différents modèles de souris présentant une sénescence ou une pathologie associée à la sénescence. En effet, ce traitement permet un rajeunissement des cellules souches musculaires (Chang et al., 2016) avec autant d'efficacité que celle obtenue lors d'une élimination génique des cellules (modèle murin p16-3MR, voir Tableau 4). De plus, dans un modèle de vieillissement accéléré provoqué par un traitement à la doxycycline où la reprogrammation des cellules souches est altérée, un traitement au Navitoclax restaure ces anomalies (Mosteiro et al., 2016). Ces études montrent bien que ces composés activant l'apoptose pourraient être utilisés pour lutter contre le vieillissement. Cependant, leur efficacité n'est pas linéaire et dépend du stress qui induit la sénescence et le tissu affecté. Ainsi, il a été montré que le

Navitoclax était très efficace sur des cellules sénescents de type HUVEC, IMR90 et des MEF mais qu'il était inefficace sur des pré-adipocytes (Zhu et al., 2016). D'autres molécules qui inhibent une protéine de la famille des Bcl-2 (Bcl-XL) se sont avérées efficaces sur les mêmes types cellulaires, mais pas sur les pré-adipocytes (Zhu et al., 2017). Ces résultats suggèrent donc que d'autres mécanismes compensatoires se mettent en place dans les pré-adipocytes sénescents, ce qui leur confère une résistance à ces composés. De la même manière que les BH3-mimétiques, la **piperlongumine** (dérivé du poivre) active la voie des caspases et permet l'apoptose de certains types cellulaires à l'instar des fibroblastes WI-38 quand la sénescence est induite par un oncogène, des irradiations ou la réplication (Wang et al., 2016). Cette molécule est très intéressante compte tenu de ses faibles effets secondaires, en comparaison avec les BH3-mimétiques. De ce fait, des analogues de cette molécule sont actuellement en développement (Liu et al., 2018). Comme déjà évoqué, le manque d'efficacité de ces molécules sur certains types cellulaires dépend du type de sénescence étudié. Le **curcuma** par exemple active l'apoptose de cellules épithéliales de la rétine pigmentaire (RPE) sénescents induite par l'H₂O₂ (Zhu et al., 2015a). La **fisétine** est un flavonoïde retrouvé dans la fraise qui elle est efficace pour induire en apoptose des cellules cancéreuses mammaires présentant une sénescence en activant les caspases 8 et 9 (Smith et al., 2016; Yang et al., 2012).

Tableau 5 Les sénolytiques : activateurs d'apoptose de cellules sénescents

Composé	Cibles	Modèle testé	Conséquences	Références
Navitoclax (ABT-263)	Bcl2/Bcl-XL	Différents types cellulaires	Apoptose certaines lignées sénescents	(Zhu et al., 2016)
		Souris traitées à la doxycycline	Reprogrammation cellulaire améliorée	(Mosteiro et al., 2016)
		Souris irradiée ou âgée de 24mois	Amélioration des fonctions des cellules souches musculaires	(Chang et al., 2016)
Vénéoclax (ABT 737)		Souris irradiée ou K5-rTA/tet-p14	Cellules pulmonaires fonctionnelles	(Yosef et al., 2016)
Piperlongumine	Caspases	Différents types cellulaires	Apoptose certaines lignées sénescents	(Liu et al., 2018; Wang et al., 2016)
A1331852	Bcl-XL	Différents types cellulaires	Apoptose certaines lignées sénescents	(Zhu et al., 2017)
A1155463				
Curcuma	Caspases	Cellules épithéliales pigmentaires rétinienne traitées H ₂ O ₂	Apoptose des cellules sénescents	(Zhu et al., 2015a)
Fisétine	Caspases	Différents types cellulaires	Apoptose certaines lignées sénescents	(Smith et al., 2016; Yang et al., 2012)

ii. Inhibiteurs des voies de la survie

Les différences métaboliques entre des cellules sénescents ou non pourraient être exploitées pour développer des sénolytiques. Ces cellules présentent un métabolisme exacerbé avec une augmentation de l'import des acides aminés et du glucose ainsi qu'une augmentation de la synthèse protéique permettant de préserver leur survie. Une étude a montré qu'*in vitro*, l'utilisation d'un faux substrat glycolytique, le 2-déoxyglucose (**2-DG**) entraîne l'apoptose des cellules en sénescence (Dörr et al., 2013). Dans cette même étude, l'utilisation d'inhibiteurs d'ATPases lysosomales (**Bafilomycine A**) tuent les cellules sénescents et augmentent la survie des souris traitées (Dörr et al., 2013). Ces approches paraissent très intéressantes mais compte tenu du contexte oncologique de cette étude, la sensibilité des cellules sénescents induites par un stress oxydatif reste à évaluer.

Le **Dasatinib** (D) est un inhibiteur de tyrosines kinases, déjà utilisé en cancérologie dans le traitement de certaines leucémies. Il est aussi capable de se lier au récepteur de l'Ephrine B1 (EFNBR) et ainsi activer indirectement l'apoptose. Cette molécule permet l'apoptose des pré-adipocytes sénescents mais pas des HUVEC (Zhu et al., 2015b), à l'inverse de la **Quercétine** (Q), un flavonol inhibiteur des PI3K, qui induit l'apoptose des HUVEC mais pas des pré-adipocytes sénescents. Par contre la combinaison des deux (**D+Q**) permet d'éliminer de manière plus efficace les pré-adipocytes, les cellules endothéliales et les MEF sénescents (Zhu et al., 2015b). Chez la souris âgée ou dans un modèle de vieillissement accéléré (*Ercc1^{-/-}*), la combinaison (D+Q) permet d'améliorer la fonction cardiaque (Zhu et al., 2015b). Ce cocktail permet de diminuer la stéatose hépatique de la souris âgée de 24mois (Ogrodnik et al., 2017). Très récemment, Xu et ses collaborateurs ont montré qu'un traitement de 4 mois de (D+Q) chez la souris âgée suffisait à améliorer le phénotype progéroïde de ces souris (inflammation diminuée, activité physique augmentée) associé à une augmentation de la longévité (Xu et al., 2018). Ces résultats montrent qu'il serait intéressant de tester en clinique cette association (D+Q) et d'évaluer ses effets sur le long terme.

Dans une étude de 2017, Fuhrmann-Stroissig et ses collaborateurs ont identifié un inhibiteur des HSP90 (protéine à choc thermique 90) appelé **Geldanamycine** (et son dérivé le 17-DMAG) comme médicament sénolytique (Fuhrmann-Stroissnigg et al., 2017). En effet, plusieurs traitements intermittents et répétés de 17-DMAG ont significativement retardé l'apparition de multiples symptômes liés à l'âge chez les souris *Ercc1^{-/-}*, conduisant à une amélioration globale de la santé associée à une réduction de 50% de l'expression de p16^{INK4A} dans le rein et le foie. Malgré leur faible hydrosolubilité et leur toxicité plutôt élevée, d'autres inhibiteurs de HSP90 pourraient être testés dans des essais cliniques pour leur capacité chimio thérapeutique, seuls ou en tant que sensibilisants médicamenteux associés

à d'autres médicaments. Ces médicaments inhibent la voie de la pro-survie Akt/PI3K qui de ce fait lève l'inhibition de Bak et Bax (pro-apoptotiques) et permettent l'apoptose.

iii. Inhibiteur d'interaction avec p53

FOXO (Forkhead) est une famille de facteurs de transcription activé par IGF-1. FOXO4, un membre cette famille, permet la viabilité des cellules sénescents et inhibe l'apoptose. Une isoforme D-rétro-inverso (DRI) de FOXO4 (**DRI-FOXO4**) est utilisé afin de se lier à p53 ce qui l'exclut du noyau. De cette manière, p21 diminue et l'apoptose est initiée (Baar et al., 2017). Par conséquent, chez des souris de 24 mois ou dans un modèle de vieillissement accéléré traités avec DRI-FOXO4, il a pu être observé une restauration de la fonction rénale, une diminution de l'alopecie et une augmentation de l'activité physique de ces souris. Un autre inhibiteur d'interaction est **UBX0101** qui inhibe l'interaction entre MDM2 et p53. Son utilisation dans un modèle d'arthrose montre une diminution de cette pathologie suite à un traitement chez la souris âgée (Jeon et al., 2017). Actuellement, un essai clinique est en cours dans le traitement de cette pathologie (NCT03513016).

2. Sénomorphiques

Les sénomorphiques sont des molécules qui éliminent la sénescence sans supprimer les cellules sénescents. Etant donné les effets délétères du SASP d'une cellule sénescence, cette stratégie permet de cibler les molécules contenues dans ces sécrétions ou les voies de signalisation assurant la production du SASP.

a. Inhibiteurs de NF-KB

Plusieurs voies ont été identifiées comme régulateurs du SASP en influençant NF-kB à différents niveaux. Celles-ci comprennent mTOR, la signalisation MAPK, la voie PI3K et l'autophagie. La voie mTOR est un modulateur clé du vieillissement et des maladies liées à l'âge chez différentes espèces. En effet, mTOR favorise la traduction de la cytokine IL-1 α pro-inflammatoire (Laberge et al., 2015) considérée comme un régulateur précoce du SASP qui entraîne ensuite les voies IL-6 / IL-8. L'interaction de l'IL-1 α à son récepteur (IL-1R) permet une boucle de rétroaction positive qui stimule leur propre expression par activation de la kinase du récepteur IL-1 (IRAK). Celui-ci régule l'activité de NF-kB (Orjalo et al., 2009). De plus, mTOR interagit avec la voie des MAPK en augmentant la traduction de la protéine kinase MK2 (également appelée MAPKAPK2), qui empêche la dégradation de nombreux facteurs du SASP (Herranz et al., 2015). À son tour, MAPKAPK2 est lui-même une cible en aval de p38MAPK (Freund et al., 2011), démontrant que le SASP dépend d'une multitude de voies de signalisation.

La rapamycine, un inhibiteur de mTOR, est capable de diminuer l'état de sénescence d'une cellule et ainsi diminuer l'inflammation (Harrison et al., 2009). En effet, de manière Nrf2 dépendante, la rapamycine est capable de diminuer l'expression de p16^{INK4A} et p21 (Wang et al., 2017b). Mais à elle seule cette molécule peut diminuer le SASP en diminuant la voie JAK/SAT (développé ci-après) (Wang et al., 2017b). De plus, l'inhibition de mTOR induite par la rapamycine réduit la traduction de l'IL-1 α diminuant ainsi les principales voies favorisant le SASP (Laberge et al., 2015). La rapamycine possède différents analogues, appelés *rapalogues* c'est-à-dire des inhibiteurs de mTORC1. Il serait intéressant d'approfondir ces mécanismes d'action afin d'étudier si cette famille de composés pourrait être efficace dans des thérapies anti-vieillessement (Leontieva and Blagosklonny, 2010). Une autre possibilité de diminuer le SASP est de moduler IL-1 α , en amont de NF- κ B. En effet, l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-IL-1 α ou des antagonistes recombinants de l'IL-1R, provoque une diminution de la boucle de rétroaction positive IL-1 α -NF- κ B ce qui empêche la sécrétion des cytokines IL-6 et IL-8 (Laberge et al., 2012; Orjalo et al., 2009).

Le cortisol et la cortisone sont deux glucocorticoïdes sécrétés en réponse à un stress. Elles sont de puissants anti-inflammatoires comme en témoigne leur utilisation médicale (allergie, cancers). Un traitement aux glucocorticoïdes démontre une diminution de la sécrétion de certains composants du SASP (Laberge et al., 2012). Cet effet est largement causé par la capacité des glucocorticoïdes à réguler négativement l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, suggérant que ces molécules pourraient exercer leurs effets bénéfiques en supprimant l'inflammation induite par le SASP. Malheureusement, ces médicaments induisent des effets secondaires et parfois les patients présentent une résistance à ces médicaments compromettant leurs applications cliniques.

L'interaction entre les voies mTOR et MAPK régule positivement la formation du SASP. De ce fait, des études se sont intéressées à cette cascade de signalisation. En 2011, l'utilisation d'un inhibiteur de p38MAPK (SB203580) sur des cellules sénescents induit une réduction du SASP de ces cellules, et ce de manière indépendante aux dommages à l'ADN suggérant que cet inhibiteur peut être utilisé suite à un stress oxydatif (Freund et al., 2011). Deux autres inhibiteurs de la génération suivante (BIRB796 et UR-13756) ont montré eux aussi leur efficacité sur des modèles cellulaires sénescents. De manière intéressante, BIRB796 est actuellement en phase d'essai clinique III avec une utilisation possible pour supprimer le SASP. Pour confirmer cela, *in vivo*, l'utilisation d'un autre inhibiteur de p38MAPK (SB202190) permet de restaurer les capacités des cellules souches sénescents préadipocytaires (Berry et al., 2017) et musculaires (Cosgrove et al., 2014) d'une souris âgée.

b. Statines

Les statines sont des inhibiteurs des HMG-CoA réductases, qui permettent la synthèse du cholestérol, et sont utilisées en médecine pour diminuer l'hypercholestérolémie et ainsi prévenir les risques de maladies et d'accidents cardiovasculaires (AVC). Bien que leur utilisation reste à ce jour controversée, plusieurs études ont démontré que les statines (Simvastatine et Lovastatin) permettent de diminuer l'inflammation des cellules sénescents retrouvées notamment au niveau des plaques d'athérome *in vitro* mais également *in vivo* (Liou et al., 2014; Liu et al., 2015; Rezaie-Majd et al., 2002; Sakoda et al., 2006). En effet, les statines sont capables d'inhiber la prénylation des protéines, modification post-traductionnelle permettant la greffe d'un acide gras facilitant ainsi la translocation vers le noyau. Mais avec l'âge, la dissociation entre la protéine et l'acide gras ne se fait plus correctement et engendre une accumulation de protéines mal conformées. Ainsi, un inhibiteur des farnésyl transférase permet de diminuer le syndrome progéroïde des souris atteintes de HGPS (Fong et al., 2006). Cependant, chez l'Homme une étude clinique de phase II a révélé que, malgré une augmentation de la densité osseuse, aucune amélioration concernant le vieillissement n'était observée suite au traitement (Gordon et al., 2012, 2016). L'utilisation des statines dans l'amélioration des pathologies associées au vieillissement ne semble pas être possible aujourd'hui.

c. Inhibiteurs de la voie JAK/STAT

La voie JAK/STAT est impliquée dans l'expression et la production de cytokines pro-inflammatoires. En effet, en réponse à l'IL-6, les protéines STAT3 sont phosphorylées suite au recrutement des protéines kinases JAK au niveau du récepteur tyrosine kinase. Ceci conduit à la dimérisation des STAT3 phosphorylées qui vont induire l'expression et la sécrétion de protéines pro-inflammatoires. La famille JAK se compose de 4 membres, dont JAK1, JAK2, JAK3 et de la tyrosine kinase 2 (TYK2). Leur expression dépend du type cellulaire. Fait intéressant, la voie JAK est plus fortement activée dans les TAB sénescents que dans les jeunes (Xu et al., 2015a). L'inhibition de la voie JAK dans les cellules sénescents par un traitement avec des inhibiteurs de JAK (Ruxolitinib) ou des siARN diminue le SASP de ces cellules sénescents. En effet, l'inhibition de la voie JAK a atténué le SASP dans les préadipocytes humains et les cellules endothéliales humaines (Xu et al., 2015a). Cela suggère que la voie JAK pourrait être une cible intéressante dans plusieurs types de cellules. De plus, chez une souris âgée de 22 ou 24 mois, l'administration de Ruxolitinib pendant 2 mois réduit l'inflammation systémique, augmente la capacité physique, préserve l'homéostasie des TAB et améliore les paramètres métaboliques (Xu et al., 2015a, 2015b). Fait intéressant, l'inhibition de cette voie provoque des effets bénéfiques chez les

souris âgées mais pas chez les plus jeunes ce qui suggère que des processus de vieillissement peuvent être ciblés avec ce type de composés. Cependant, plusieurs études ont rapporté des effets secondaires dus à l'impact de ces molécules sur le système immunitaire.

d. Anti-cytokines pro-inflammatoire

Enfin, il serait intéressant d'utiliser des agents neutralisant directement certaines molécules du SASP. En effet, leurs effets pro-inflammatoires délétères pour la cellule elle-même et le micro-environnement, font de certains composants SASP des cibles thérapeutiques intéressantes. Des anticorps monoclonaux dirigés contre l'IL-6 (Siltuximab) (Karkera et al., 2011) ou encore des anticorps neutralisants anti IL-6 (Kuilman et al., 2008) diminuent les effets du SASP de ces cellules *in vitro*. Il en est de même pour l'inhibition du récepteur CXCR2 (SB225002) qui inhibe la boucle de rétroaction positive de la sénescence de ces cellules (Acosta et al., 2008). Par contre, leur utilisation *in vivo* reste à tester. Le TGF β fait également partie du SASP de cellules sénescents (Wu et al., 2014). L'utilisation d'inhibiteur de cette molécule serait intéressante, compte tenu du fait de son utilisation et son efficacité pour certains cancers (Grütter et al., 2008).

Partie II : Un métabolisme bouleversé par les années

A. Altérations métaboliques liées à l'âge chez l'Homme

D'après l'OMS, l'espérance de vie en France à la naissance est de 85 ans pour les femmes et 81 ans pour les hommes en 2018, alors qu'en 1950 elle était de 70 ans et 63 ans les femmes et les hommes respectivement. Ce changement est attribuable à une diminution de la morbidité, ce qui fait que la proportion de la population âgée de plus de 65 ans serait de 22% en 2040. Comme décrit dans la première partie de ce manuscrit, le vieillissement/la sénescence est causé(e) par de nombreuses altérations comme l'instabilité du génome, l'attrition des télomères, les dommages à l'ADN ou encore les dysfonctions mitochondriales. Au niveau métabolique, des changements dans la régulation de l'énergie s'opèrent et peuvent accélérer le vieillissement avec le développement de maladies métaboliques telles que le diabète de type 2 (Umpierrez and Pasquel, 2017).

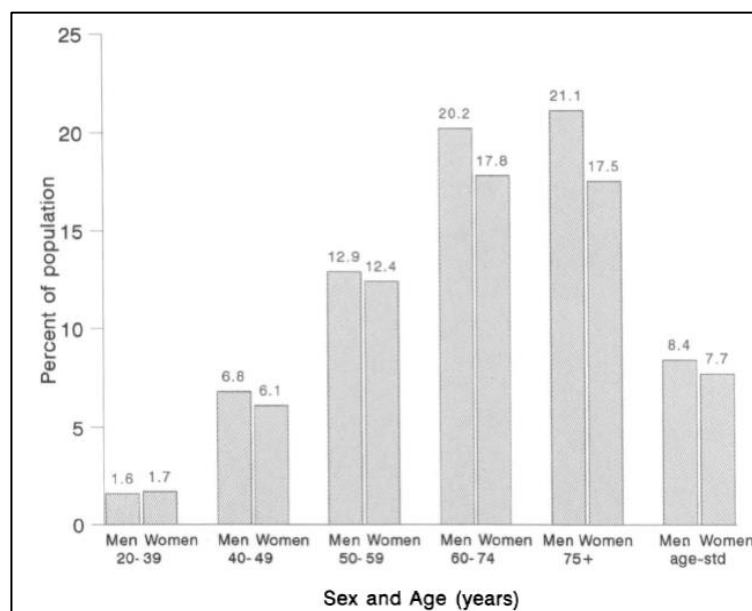


Figure 16 Prévalence du diabète chez les hommes et les femmes dans les années 1990

Statistiques basés sur la NHANES (The third national health and nutrition examination survey-1988-1994) sur la population américaine âgé d'au moins 20 ans. Le diabète comprend le diabète diagnostiqué et non diagnostiqué précédemment défini par la glycémie à jeun de 0,126 mg/dL. age-std, normalisé selon l'âge (Harris et al., 1998). Avec l'âge, l'apparition du diabète de type II est augmentée.

Plusieurs facteurs métaboliques sont à analyser afin d'essayer de comprendre les mécanismes sous-jacents conduisant à des altérations métaboliques chez la personne âgée.

I. Régulation de la consommation d'énergie

Roberts et ses collaborateurs ont réalisé des études séparées de suralimentation et de sous-alimentation pendant 21 jours, chez des hommes âgés de 25 ans ou de plus de 65 ans (Roberts et al., 1994). Les individus ont subi un excès (suralimentation) ou une diminution (sous-alimentation) calorique d'environ 950Kcal/jour. Des différences claires entre les groupes d'âge ont pu être observées au niveau de la masse corporelle après l'intervention (Figure 17). Alors que les hommes jeunes réagissaient à la suralimentation en diminuant l'apport énergétique et à la sous-alimentation en augmentant l'apport énergétique, les personnes âgées ne s'adaptaient plus quel que soit le challenge métabolique. En conséquence, les hommes de 25 ans avaient tendance à perdre la masse prise pendant la suralimentation, alors que les hommes de 65 ans et plus ont perdu seulement 29% de leur masse corporelle. Et enfin, les jeunes individus ont récupéré la masse perdue pendant la sous-alimentation, alors que le groupe plus âgé reprend seulement 64% du poids perdu.

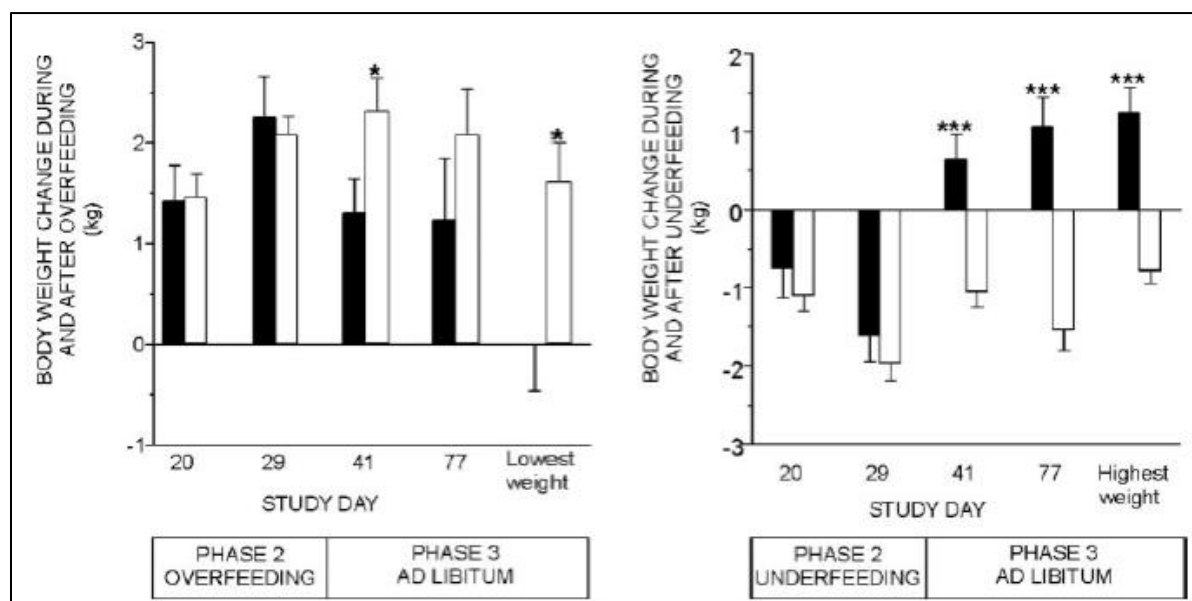


Figure 17 Changement de la masse corporelle avec l'âge

Individus soumis à une période de suralimentation suivie d'une période ad libitum (gauche) ou une période de sous-alimentation suivie d'une période ad libitum (droite). En noir les sujets jeunes en blanc les sujets âgés (Roberts et al., 1994). Quel que soit le challenge calorique imposé (suralimentation ou sous-alimentation), les personnes âgées de plus de 65 ans ont des difficultés à réguler leurs apports énergétiques aboutissant à une perte ou à un gain de masse corporelle plus faible après la période de suralimentation ou de sous-alimentation respectivement.

Une étude du même groupe réalisée sur 6 mois a montré que les personnes âgées n'arrivaient toujours pas à reprendre la masse corporelle perdue après les 5 semaines de sous-nutrition essentiellement à cause d'une sensation de faim fortement diminuée d'après les auteurs (Moriguti et al., 2000). En effet, Clarkston et ses collaborateurs ont démontré que les personnes de plus de 70 ans présentaient une sensation de faim moins importante que des jeunes adultes d'environ 40 ans après un jeûne sur la nuit (Clarkston et al., 1997). De plus, en situation post-prandiale la sensation de satiété est plus grande chez les aînés et ceci s'accompagne d'une vidange gastrique, tant pour les liquides que pour les solides, diminuée indépendamment du transit intestinal. L'explication de ce retard de vidange gastrique pourrait résider dans des anomalies au niveau du système nerveux autonome avec les afférences du nerf vague dysfonctionnelles. Les sensations de faim et de satiété paraissent donc précéder la perte de masse corporelle et les altérations métaboliques associées au vieillissement.

II. Régulation de la dépense énergétique et de l'utilisation des substrats

Le métabolisme de base (BMR pour *basal metabolic rate*) est la dépense énergétique d'un individu au cours d'un jeûne de 12h pendant une période de repos physique et mental dans un environnement à thermoneutralité. Le BMR reflète l'utilisation énergétique de l'organisme pour des fonctions de base. En général, le BMR représente 50 à 70% des dépenses totales pour des adultes (Kreymann et al., 2009). Une étude longitudinale a montré une baisse du BMR avec l'âge de 1 à 2% par décennie soit une réduction de BMR de 400 kJ/jour entre 20 et 70 ans. De plus, la baisse du BMR associée à une activité physique diminuée, entraîne une diminution de la dépense énergétique totale (TEE) avec l'âge. Pour évaluer ce paramètre, on utilise la méthode de l'eau doublement marquée (H_2^{18}O et $^2\text{H}_2\text{O}$). Le taux de disparition de $^2\text{H}_2\text{O}$ reflète le flux d'eau, tandis que celui de H_2^{18}O reflète le flux d'eau plus le taux de production de dioxyde de carbone. La différence entre les deux est utilisée pour quantifier le taux de production de dioxyde de carbone, à partir duquel la TEE peut être calculée.

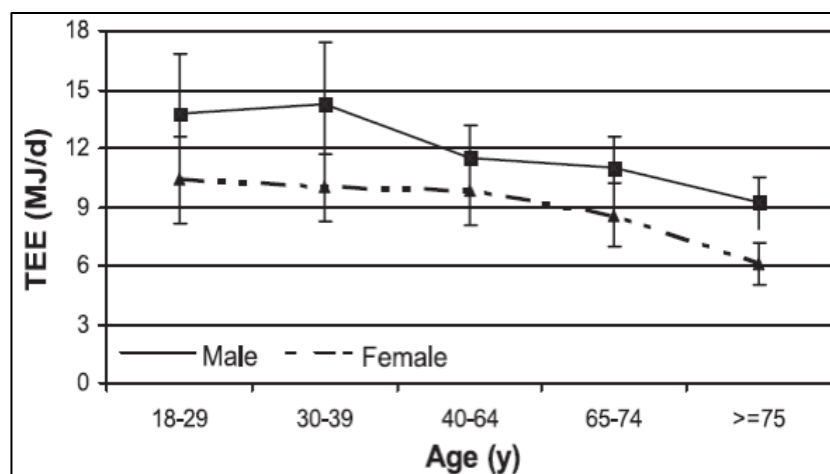


Figure 18 Dépense énergétique totale à différents âges chez l'homme et la femme

Le graphique a été préparé avec les données de (Black et al., 1996). La TEE (dépense énergétique totale) diminue avec les années tant pour les hommes que pour les femmes.

De plus, la capacité de l'organisme à oxyder les graisses alimentaires est un déterminant essentiel d'une régulation de l'énergie corporelle. Il a été démontré que les personnes âgées présentaient une augmentation de l'oxydation des glucides et une diminution de l'oxydation des lipides (Levadoux et al., 2001; Rising et al., 1996). Ainsi, Melanson et ses collaborateurs ont remarqué que des femmes âgées d'environ 70 ans possédaient une oxydation des graisses diminuée suite à un repas de 4184 kJ (Melanson et al., 1998). Cette même étude démontre en revanche que pour un repas moins calorique (entre 1000 et 2000 kJ) il n'y a pas de différence dans l'utilisation des lipides. Cette diminution de l'oxydation des lipides serait principalement due à deux facteurs : une baisse de la masse musculaire (connue pour oxyder la majorité des graisses) associée au vieillissement ainsi qu'une modification de la localisation du tissu adipeux principalement au niveau viscéral.

III. Régulation de la glycémie et de l'insulinémie

Selon les critères de sélection, les tranches d'âge des patients comparés, et les techniques utilisées, les analyses glycémiques et insulinémiques varient fortement. Globalement, les personnes âgées de plus de 65 ans non obèses et non diabétiques ne présentent pas de différence de glycémie à jeun comparée à de jeunes adultes. Cependant, après une charge orale (50g ou 75g) ou intraveineuse (4mg/kg/min) de glucose, la tolérance au glucose chez la personne âgée est fortement diminuée indépendamment du sexe des individus (Fink et al., 1983; McConnell et al., 1982). Parallèlement à l'intolérance au glucose, les sujets âgés présentent également des taux d'insuline plus élevés lors de ces tests avec un pic de sécrétion décalé de 30 à 60 minutes quel que soit le sexe (Fink et al., 1983; McConnell et al., 1982). Enfin, lors de tests de sensibilité à l'insuline il a pu être mis en évidence que la

quantité d'insuline perfusée aux personnes âgées afin de normaliser leur glycémie devait être deux fois supérieure à celle de individus jeunes suggérant que les sujets âgés présentaient une insulino-résistance (Robert et al., 1982). Pour confirmer cette hypothèse, deux études ont montré qu'après un clamp euglycémique hyperinsulinémique les sujets âgés de plus de 60 ans présentaient un turn-over de glucose diminué associé à une utilisation du glucose altérée par les tissus périphériques (Fink et al., 1983, 1986).

Par ailleurs, chez l'individu jeune, l'insuline est sécrétée de manière pulsatile et coordonnée afin de réguler la production de glucose par le foie. Chez la personne âgée sans diabète, plusieurs études ont pu montrer une sécrétion d'insuline pulsatile désordonnée quel que soit le statut nutritionnel des individus (à jeun ou au cours d'une hyperglycémie prolongée) (Meneilly et al., 1999; Scheen et al., 1996).

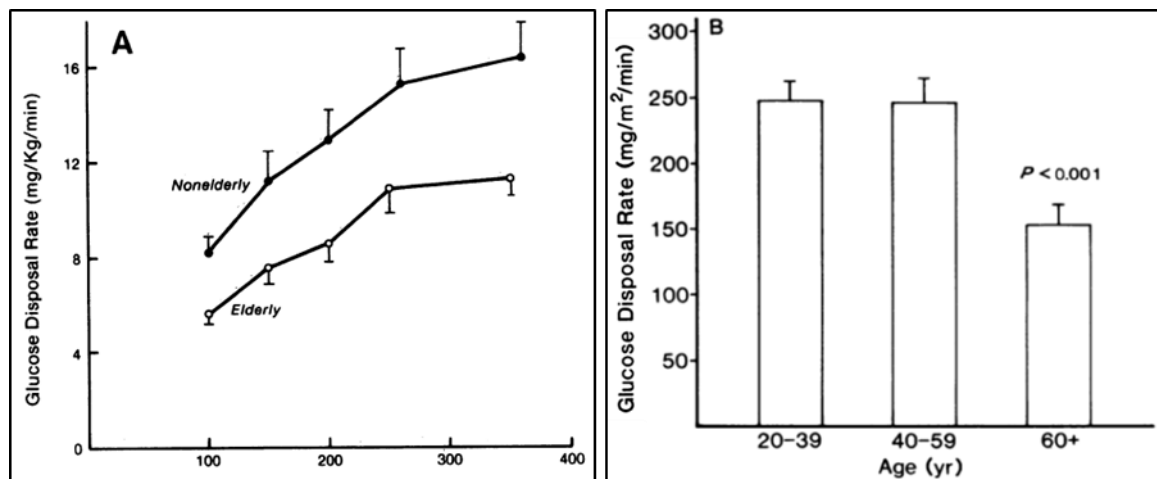


Figure 19 Utilisation du glucose en fonction de l'âge

(Gauche) Utilisation du glucose (GDR) en mg/kg/min en fonction de la glycémie en mg/dL chez des sujets jeunes (nonelderly) entre 20 et 40 ans et âgés (elderly) de 65ans, pendant une perfusion d'insuline à 40mU/m²/min. (Fink et al., 1986). (Droite) Moyenne de l'utilisation du glucose pendant une perfusion d'insuline à 40mU/m²/min selon trois groupes : 20 à 39ans, 40 à 59ans et plus de 60ans. (Fink et al., 1983).

Les possibles explications de la perte de sensibilité à l'insuline au cours du vieillissement sont diverses comme, une diminution de l'activité physique, les changements hormonaux et l'augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation liés à la nutrition.

IV. Interventions visant à améliorer le métabolisme

Des changements conséquents de l'homéostasie métabolique et l'environnement inflammatoire chronique aggravent le déclin fonctionnel physiologique au cours du vieillissement, créant un état permissif pour l'incidence et la progression de certaines

maladies. De plus, compte tenu des preuves que l'obésité fournit un riche réservoir de réactions inflammatoires, les interventions nutritionnelles visant à contrôler la masse corporelle seront probablement également efficaces. De même, l'exercice est proposé pour réduire la morbidité en améliorant les paramètres métaboliques.

1. Exercice physique

Selon les gériatres, la durée optimale de chaque exercice par jour devrait être comprise entre 30 et 45 minutes pour les personnes âgées fragiles et entre 45 et 60 minutes pour les adultes pré-fragiles (Theou et al., 2011). La durée appropriée dépend de l'état de fragilité, de l'âge et de la cohérence de la participation à l'exercice. Les participants doivent considérer leur entraînement comme un engagement à long terme, car les personnes âgées fragiles peuvent rapidement perdre des gains de forme physique à la fin de l'exercice (Cadore et al., 2014). L'OMS recommande aux personnes âgées de plus de 65ans de pratiquer une activité modérée de 150 min ou une activité intense de 75 min au moins 3 jours par semaine afin de maintenir leur santé. Par ailleurs, une méta-analyse de 2012 a révélé que des exercices physiques chez les personnes entre 60 et 85 ans, définies comme fragiles ou pré-fragiles, sont bénéfiques (de Vries et al., 2012).

Afin de déterminer quels sont les mécanismes ou voies de signalisation impliquées dans ces améliorations physiques et métaboliques, des études ont été effectuées chez l'animal. Lors d'un exercice physique le rapport $\frac{NAD^+}{NADH}$ augmente, activant ainsi la SIRT1 qui désacétyle PGC1 α , qui lui active la glycolyse et l'oxydation des lipides au niveau du foie (Rodgers et al., 2005). En parallèle, le rapport $\frac{AMP}{ATP}$ augmente ce qui active l'AMPK et permet l'activation de Nfr1 impliquée dans la biogenèse mitochondriale (Bergeron et al., 2001). De plus l'AMPK permet la translocation de GLUT4, notamment au niveau du TAB permettant une meilleure utilisation du glucose (Yamaguchi et al., 2005). Ces deux premières voies de signalisation permettent donc une meilleure utilisation des substrats par les tissus métaboliques.

Au cours du vieillissement, l'ADN mitochondrial devient instable, et l'exercice physique semble prévenir cette instabilité chez la souris atteinte de progéria (Safdar et al., 2011). De plus, chez le rat et l'Homme, l'exercice permet d'améliorer l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN (Parise et al., 2005; Radák et al., 2002). Comme évoqué dans la Partie I de ce manuscrit, avec l'âge on observe une diminution de la longueur des télomères, ce phénomène serait prévenu par l'exercice physique dans les leucocytes chez le sujet âgé (LaRocca et al., 2010), ainsi que dans les cellules cardiaques chez la souris (Werner et al., 2008) suggérant un retardement de la sénescence répllicative.

En 2013, une modification du profil épigénétique dans les cellules du TAB de sujet âgé a été démontrée. Ce profil a pu être totalement « rajeuni » suite à 6 mois d'exercice physique avec des modifications particulièrement importante au niveau métabolique (Rönn et al., 2013). L'exercice physique est inversement corrélé à la quantité d'ARNm de p16^{INK4A} (Liu et al., 2009). Schafer et ses collaborateurs ont montré que dans un contexte d'obésité l'exercice physique permet d'améliorer la tolérance au glucose et diminuer la masse grasse viscérale, associé à une diminution de la sénescence et du SASP dans le TAB viscéral (Schafer et al., 2016). Enfin, il a été montré qu'après 12 semaines de nage quotidienne chez le rat âgé, la sénescence et l'inflammation diminuent surtout au niveau du foie, suggérant une amélioration métabolique et une meilleure fonctionnalité de ce tissu (Huang et al., 2013). L'exercice physique permet donc de diminuer l'état de sénescence et le SASP associé, ce qui améliore les paramètres métaboliques globaux.

2. Aspect nutritionnel

Les premières études reliant la restriction calorique et le vieillissement ont été effectuées chez l'animal et ont concerné uniquement la longévité. En effet, chez le *C.elegans*, la restriction calorique augmente la durée de vie (Wei et al., 2008). Il en est de même pour *S. cerevisiae*, mais il s'est avéré que diminuer la teneur en glucose suffisait pour obtenir ces effets (Ocampo et al., 2012). Chez l'Homme, de nombreuses études ont montré les effets bénéfiques de la restriction calorique chez des personnes en surpoids non obèses non diabétiques. C'est le cas de l'étude CALERIE-1 qui propose une restriction calorique de 20% sur 6 mois et les premiers résultats montre une baisse de l'insulinémie à jeun (Heilbronn et al., 2006). Une récente étude a montré que deux années de restriction calorique de 15% chez l'Homme permettait de diminuer l'inflammation systémique et ainsi améliorer la santé de ces personnes (Redman et al., 2018). Une étude très intéressante menée chez le singe Rhesus (*Macaca mulatta*), a montré les bienfaits de la restriction calorique (Colman et al., 2009). En effet, dès l'âge adulte (entre 7 et 14 ans) une restriction alimentaire progressive de 30% permet d'augmenter la survie de ces animaux associée à une amélioration considérable de l'homéostasie du glucose. Une étude quasi similaire menée au NIA (National Institute of Aging) ne montre pas d'avantage lié à la restriction calorique et ceci serait dû à une plus faible teneur en sucrose et une initiation de la restriction calorique décalée par rapport à l'étude précédente (Mattison et al., 2012). Cependant, la restriction calorique induit un retard significatif de l'incidence de la morbidité liée à l'âge (Mattison et al., 2017). Ces études montrent que la diminution des voies métaboliques associées à l'utilisation du glucose permet d'augmenter la longévité. Mais chez la *D. melanogaster*, une diminution de la quantité d'acides aminés suffit à allonger sa durée

de vie (Min and Tatar, 2006), au contraire une augmentation la diminue (Grandison et al., 2009), supposant que l'inhibition de la voie mTOR (activée par les acides aminés principalement) par de la rapamycine serait un excellent mimétique de la restriction calorique. Ces résultats ont été confirmés chez la souris très récemment où le contenu en protéines apparaît aussi déterminant pour la longévité que le contenu en carbohydrates (Solon-Biet et al., 2014; Yoshida et al., 2018). Dans plusieurs modèles cellulaires, une forte concentration en glucose induit une sénescence cellulaire (Prattichizzo et al., 2018) alors que la restriction en glucose sur des cellules humaines permet de diminuer l'expression de p16^{INK4A} via une augmentation de l'expression de SIRT1 (Li and Tollefsbol, 2011).

Les effets de la restriction calorique chez l'Homme de 30 à 60 ans et le rat de plus d'un an ont été comparés en termes de profil de génique, afin d'étudier les voies métaboliques impliquées (Mercken et al., 2013). La restriction calorique induit un profil transcriptomique plus « jeune » au regard du métabolisme énergétique (cycle de Krebs, glycolyse et chaîne respiratoire mitochondriale) et une diminution de la voie de l'insuline/IGF-1. Une autre étude menée sur un an chez des personnes âgées de 50 à 60 ans montre une amélioration des paramètres métaboliques associée à une diminution du TAB viscéral, confirmant que la masse TAB viscéral est inversement corrélée à une bonne santé (Racette et al., 2006). Chez la *D. melanogaster* il existe 7 insulin-like-peptide (dilp1 à 7), avec dilp6 qui est fortement exprimé par le TAB à l'âge adulte. Lors d'un jeûne, FOXO est induit, permettant la transcription de dilp6. Ce dernier agit comme un agoniste biaisé du récepteur à l'insuline (IR) et permet ainsi un allongement de la longévité associé à une augmentation de la masse du TAB (Bai et al., 2012).

L'ensemble de ces résultats montrent qu'au cours du vieillissement, la modulation de différentes voies impliquées dans le métabolisme comme celles de l'insuline, de FOXO ou encore de mTOR permet d'améliorer les fonctions métaboliques et poussent les recherches vers de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'opérer un meilleur contrôle métabolique au cours du vieillissement.

V. Voies métaboliques impliquées dans la longévité

1. Axe GH/IGF-1

L'hormone de croissance (GH), aussi appelée somatotropine, est une molécule synthétisée par la glande pituitaire chez les mammifères et est essentielle à la croissance

jusqu'à l'adolescence. Elle dépend de la sécrétion de la GHRH au niveau de l'hypothalamus. L'action de la GH passe par la sécrétion d'IGF-1, sécrétée au niveau du foie. La sécrétion de GH est maximale au milieu de la puberté, et s'accompagne de taux d'IGF-1 circulants très élevés. Chez l'Homme, on observe un déclin des sécrétions de GH et d'IGF-1, à partir de l'âge adulte pour atteindre de très bas niveaux aux alentours de 60 ans, connu sous le nom de **somatopause** (Iranmanesh et al., 1998; Zadik et al., 1985). A l'inverse, une stratégie de supplémentation par un traitement sous-cutané de 1 ou 4 mg de GHRH recombinante humaine pendant 3 mois entraîne une diminution de la graisse viscérale abdominale, une augmentation de la masse maigre et une amélioration des capacités physiques (Veldhuis et al., 2004, 2005). Cependant, une diminution de l'axe GH a été montrée comme augmentant la longévité chez différentes espèces comme le ver (*C.elegans*), la drosophile (*D. melanogaster*), la levure (*S.cerevisiae*) et la souris (Fontana et al., 2010). En effet, les souris mutées pour un facteur de transcription pituitaire (Pit-1) (souris **Snell**) présentent des manquements en GH, prolactine et hormones thyroïdiennes (TSH). Ceci est associé à un phénotype particulier : dès l'âge de deux semaines leur croissance est arrêtée (phénotype dit *dwarf*), elles sont infertiles, et présentent une augmentation de la masse grasse, associée à une amélioration du métabolisme du glucose et une résistance aux stress (Brooks et al., 2007; Eicher and Beamer, 1980; Snell, 1929). De la même manière dans les années 1990, il a été montré que la mutation dans le gène codant une protéine nécessaire à la transcription de Pit-1, Prop-1 (souris **Ames**), entraîne le même phénotype dwarf, associé à une amélioration du métabolisme et un allongement de la longévité d'environ 65% chez la femelle et 50% chez le mâle (Brown-Borg et al., 1996; Buckwalter et al., 1991). Plus en amont, la GHRH se lie à son récepteur, GHRHR, au niveau de l'hypophyse, induisant la sécrétion de GH. Une mutation sur ce récepteur chez la souris (**lit/lit**) induit également un phénotype similaire aux souris Ames et Snell associé à une longévité augmentée de 25% pour les deux sexes (Donahue and Beamer, 1993; Dörr et al., 2013; Godfrey et al., 1993). De la même manière, les souris délétées pour le GHR (**GHR^{-/-}**), présentent une longévité augmentée associée à des améliorations métaboliques et un développement de la masse grasse au niveau sous-cutané (Berryman et al., 2010; Coschigano et al., 2003; Zhou et al., 1997). Enfin, la délétion de GHR après la puberté (**aGHRKO**) conduit à des améliorations métaboliques et une longévité maximale augmentée surtout chez la femelle (Junnala et al., 2016). A l'inverse, des souris surexprimant la GH présentent une insulino-résistance et une diminution de la durée de vie de 35% (Bartke, 2003).

L'absence d'IGF-1 chez la souris (IGF1^{-/-}) entraîne une létalité plus ou moins tardive selon les lignées de souris utilisées, associés à des défauts de croissance osseuse et musculaire (Beck et al., 1995). Ceci est principalement dû à l'hypersécrétion de la GH n'induisant pas le rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. La sécrétion

d'IGF-1 provenant majoritairement du foie, des modèles murins déficients en IGF-1 dans le foie ont été créés. Le premier KO d'IGF-1 hépatique nommé **LID** (Liver-specific IGF-Deficient) (Yakar et al., 1999) a montré une diminution des problèmes cardiaques alors que leur longévité n'est pas améliorée (Li et al., 2008). Par contre, un KO conditionnel d'IGF-1 dans le foie (souris **LI-Igf1^{-/-}**) à partir de 12 mois, permet de diminuer la masse grasse et d'augmenter faiblement la longévité chez la femelle probablement grâce à une augmentation de la dépense énergétique (Svensson et al., 2011). Par ailleurs, les souris hétérozygotes pour le récepteur à l'IGF-1 (**IGFR1^{+/-}**) présentent également un allongement de la durée de vie de 16% associé à une amélioration de la tolérance au glucose (Holzenberger et al., 2003). Chez l'Homme une mutation du gène IGFR1 est associée à une longévité (Suh et al., 2008). Récemment, une étude a montré l'intérêt de cibler IGFR1 en traitant des souris de 18 mois avec un anticorps monoclonal dirigé contre IGFR1 (m-Ab IGFR1) (Mao et al., 2018). Les souris, en particulier les femelles, présentent un allongement de leur durée de vie associé à une amélioration des fonctions cardiaques, des performances musculaires, une diminution de l'apparition des cancers sans agir sur l'homéostasie glucidique ni la composition corporelle. Ces améliorations seraient dues à une diminution de l'inflammation systémique. Cependant une étude plus ancienne démontre les effets néfastes de l'utilisation de m-Ab IGFR1 dans une population jeune atteinte de cancer, incluant une insulino-résistance provoquée par une élévation de GH en réponse au traitement (Ma et al., 2014).

L'ensemble de ces études montrent bien que l'axe GH/IGF-1 est essentiel à une longévité augmentée associée à une amélioration de l'état de santé, surtout lorsqu'il est diminué à l'âge adulte. Désormais, il est nécessaire de comprendre quels sont les mécanismes moléculaires mis en jeu en aval de cet axe au cours du vieillissement.

2. Voie de l'insuline/Foxo

Au même titre que des mutations sur IGFR1, des études sur le *C.elegans* et la *D. melanogaster* montrent qu'une mutation des homologues du récepteur à l'insuline (IR) ou IGFR1 (*daf-2* et *CHICO* respectivement), provoque un allongement de la durée de vie (Clancy et al., 2001; Tatar et al., 2001). La voie de l'insuline est donc impliquée positivement dans les étapes de développement mais son activation dans des périodes plus tardives de la vie semble être délétère. Des mutations du IR dans différents tissus métaboliques ont été menées, mais seule la délétion du IR dans le TA (souris **FIRKO**) entraîne une augmentation de la longévité associée à des améliorations métaboliques : diminution de la masse grasse viscérale, insulino-résistance basse, meilleure tolérance au glucose sans modification de la prise

alimentaire (Blüher et al., 2002, 2003). Récemment, des souris déficientes pour IR uniquement dans les adipocytes (sous contrôle du promoteur adiponectine) (souris **AIRKO**) ont été créés (Friesen et al., 2016). Friesen et ses collaborateurs ont montré que ces souris AIRKO jeunes présentent une insulino-résistance qui disparaît avec l'âge et une réduction de leur longévité. Ces résultats suggèrent donc que la signalisation à l'insuline dans les adipocytes est essentielle à un jeune âge, mais peut devenir délétère par la suite.

Suite à la liaison de l'insuline ou d'IGF-1 sur leurs récepteurs, plusieurs voies cellulaires sont initiées. En effet, il a été montré que des mutations des homologues de cette voie chez le *C.elegans* provoquent un allongement de la vie (Kenyon et al., 1993; Morris et al., 1996). Les protéines PI3K puis Akt (ou PKB pour Protéine Kinase B) sont activées et cette dernière permet la phosphorylation de facteurs de transcription de type *Forkhead* qui comprend plusieurs familles dont FOXO. Cette phosphorylation conduit à la séquestration de celui-ci dans le cytoplasme, ne pouvant plus activer la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la détoxification des radicaux libres. Lorsque les niveaux d'insuline ou d'IGF-1 sont faibles, FOXO est donc capable d'induire la transcription de ces gènes impliqués dans la réponse au stress. L'ensemble de cette voie est très conservé au sein des espèces. Chez le nématode, les mutations d'un homologue de l'IR (DAF-2), ou de PI3K (AGE) ou encore de FOXO3 (DAF-16) sont associées à une longévité augmentée (Lin et al., 1997; Ogg et al., 1997). Par ailleurs, au cours de l'obésité, du vieillissement et même de cancer, une inflammation chronique de bas bruit s'installe. En réponse au $TNF\alpha$, la protéine I kappaB kinase (IKK β) est activée et phosphoryle FOXO3 ce qui inhibe la transcription de gènes impliqués dans la réponse au stress (Hu et al., 2004). Toutes ces études montrent que FOXO3 est donc un facteur de transcription clef dans les voies de signalisation de la longévité. Enfin, une mutation d'Akt chez la levure (Sch9) (Fabrizio et al., 2001) ou chez la souris (Nojima et al., 2013) induit une longévité accrue des animaux dans un bon état de santé, appuyant l'importance de cette voie. Akt a des actions pléiotropes sur la prolifération cellulaire et la tumorigénèse en inhibant la transcription de certains gènes *via* la phosphorylation de FOXO3, ou encore en inhibant directement un facteur pro-apoptotique (Bad) (Datta et al., 1997). De manière intéressante, des études ont montré qu'à une augmentation de la longévité est associée un polymorphisme sur FOXO3 (Anselmi et al., 2009; Li et al., 2009; Willcox et al., 2008) suggérant que ce polymorphisme, *via* l'activation de régions régulatrices, induit une quantité ou une activité supérieure à la normale de FOXO3. Dans ce sens, il a été montré qu'à une augmentation de l'état de sénescence (vieillesse) était associée une activité accrue d'Akt concourant à des altérations métaboliques liées à l'âge et l'obésité sur des cultures de cellules endothéliales humaines (Miyauchi et al., 2004).

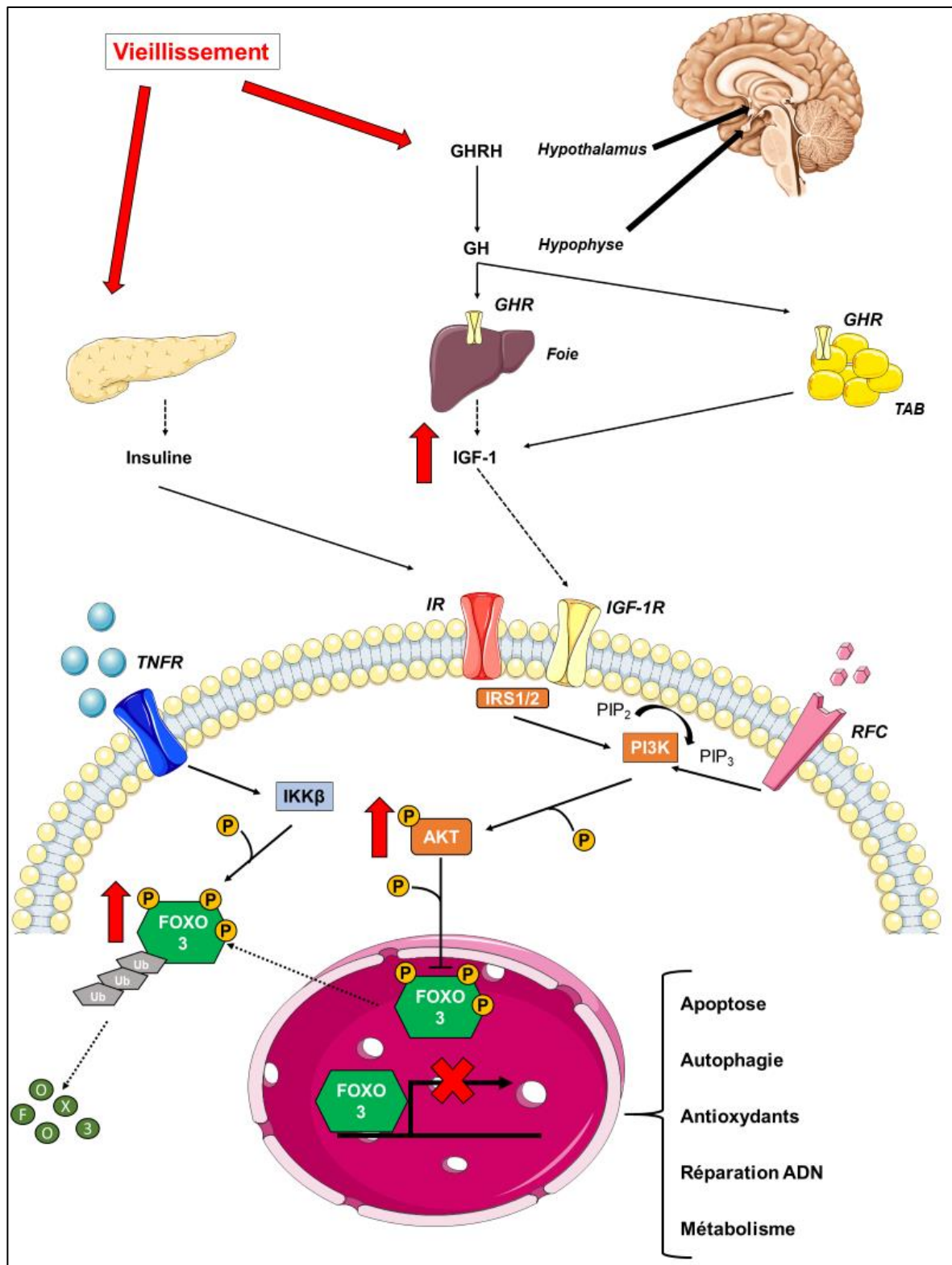


Figure 20 Voie GH/IGF-1 et Insuline/FOXO

Régulation des voies GH/IGF-1 et Insuline/FOXO au cours du vieillissement. Avec l'âge, l'axe GH augmente (flèche rouge) entraînant une augmentation d'IGF-1 qui suractive la voie de l'insuline, ne permettant plus à FOXO3, via sa phosphorylation par Akt, d'induire la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose, l'autophagie, la réponse au stress etc (croix rouge). Par ailleurs une augmentation du $TNF\alpha$ est observée au cours du vieillissement, participant à la dégradation de FOXO3 via IKK β qui active son ubiquitination.

3. Voie mTOR

La *mammalian target of rapamycin* ou mTOR est une enzyme serine/thréonine kinase qui régule l'apoptose, la survie, le cycle cellulaire en réponse à des nutriments. Des études ont montré qu'une déficience en mTOR permettait d'allonger voire de doubler la longévité du ver *C.elegans*. Cette fonction de mTOR en fait une enzyme clef entre le métabolisme et le vieillissement. Deux complexes protéiques existent : mTORC1 et mTORC2, chacun composé de composants variables nécessaires à leur activité. Suite à une activation du IR, de l'IGFR1 ou d'un récepteur à un facteur de croissance, la PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PI[3,4,5]P₂) pour générer du phosphatidylinositol-3,4,5-triposphate (PI[3,4,5]P₃). Ceci permet le recrutement et l'activation d'Akt *via* sa phosphorylation sur la thréonine 308 par la protéine kinase dépendante du 3-phosphoinositide (PDK1). mTORC2 est également activé par la PI3K et phosphoryle Akt sur la sérine 473. A son tour, Akt phosphoryle TSC2 (qui forme un dimère avec TSC1) ce qui va bloquer l'activité GTPase-activating (GAP) de TSC2 ce qui augmente l'activité GTPase de la protéine Rheb et active ainsi mTORC1 dans le lysosome. L'activation de mTORC1 se fait en présence de différents nutriments (lipides, glucose, acides aminés) *via* l'activation de différents complexes protéiques au niveau du lysosome.

Les complexes mTORC1 et mTORC2 fonctionnent de manière indépendante mais également de manière croisée ce qui en fait une voie paradoxale dans le vieillissement. En effet, les premières études sur le nématode *C.elegans* menées en 2003 montrent que l'inhibition de mTOR entraîne un allongement de la longévité (Vellai et al., 2003). Au contraire, chez la drosophile *D. melanogaster*, une étude a montré qu'une surexpression d'inhibiteurs de mTORC1 et mTORC2 entraînait une extension de la longévité (Kapahi et al., 2004) et qu'une diminution de la voie mTOR dans le TAB suffit à ces effets, montrant l'importance de cette voie dans le TAB. Quelques années plus tard, il a été montré que la rapamycine (un inhibiteur de mTOR) est capable d'allonger la longévité de 14% et 9% chez la souris femelle et mâle respectivement, même si le traitement ne commence qu'après 600 jours de vie (Harrison et al., 2009). Ces résultats montrent qu'une inhibition de mTOR chez la personne âgée serait suffisante pour augmenter la longévité. Paradoxalement, un traitement chronique à la rapamycine induit également une insulino-résistance (Houde et al., 2010) et les souris déficientes en mTORC2 présentent une insulino-résistance et une intolérance au glucose (Lamming et al., 2012). Les effets indésirables de la rapamycine sur l'homéostasie glucidique dépendraient donc de mTORC2, et plus précisément de mTORC2 hépatique (Lamming et al., 2012). Récemment, il a été montré que mTORC2 du TAB joue un rôle important dans les processus de lipogenèse, processus bénéfique corrélée positivement à la sensibilité à l'insuline (Eissing et al., 2013; Herman et al., 2012). En effet, des souris

déficiences pour mTORC2 dans l'adipocyte présentent une réduction de la lipogenèse dans le TAB associée à une altération de la sensibilité à l'insuline au niveau du foie suggérant que mTORC2 du TAB participe lui aussi activement à l'homéostasie du glucose dépendant de mTORC2 (Tang et al., 2016). Pour appuyer ces hypothèses, plusieurs études ont montré l'importance de mTORC1 et pas de mTORC2 dans la longévité. Une première étude en 2012 a réussi à dissocier les effets de la rapamycine sur la longévité et sur le dérèglement de l'homéostasie du glucose (Lamming et al., 2012). En effet, des souris ayant seulement une réduction de l'activité de mTORC1 (**mtor**^{+/-} **mlst8**^{+/-}) montrent un allongement de la longévité maximale et moyenne tout en gardant une homéostasie glucidique normale, montrant bien l'importance de mTORC1 dans les processus de longévité seulement. De plus, une délétion du substrat de mTORC1 (protéine kinase 1 S6 ou S6K1) augmente la longévité et améliore la santé des souris (Selman et al., 2009). Cette kinase est impliquée dans l'activation d'une protéine ribosomale (protéine S6) qui stimule la traduction des protéines. De manière surprenante, la diminution de la traduction des protéines faciliterait donc la dégradation ou la réparation des protéines endogènes ce qui permettrait de préserver une homéostasie cellulaire correcte face aux stress oxydatifs au cours du vieillissement.

Par ailleurs, l'autophagie diminue avec l'âge et mTORC1 active une sérine thréonine kinase (ULK1) qui régule la formation des autophagosomes. Lorsque ULK1 est active, donc phosphorylée par mTORC1, il y a une inhibition de la formation de ces complexes. Ceci suggère donc qu'en inhibant mTORC1, les processus autophagiques se réactivent ce qui permettrait un meilleur nettoyage des protéines et des mitochondries dysfonctionnelles.

Enfin en avançant dans l'âge, le système inflammatoire joue un rôle important tant positif que négatif. Des études ont montré que mTORC1 a un rôle indirect sur l'inflammation, en jouant sur les processus de sénescence par exemple. En effet il a été montré que la rapamycine réduisait le phénotype de vieillissement accéléré observé dans des fibroblastes humains provenant de patients atteints de progéria (HGPS) (Cao et al., 2011). Le mécanisme moléculaire n'est pas encore élucidé mais la rapamycine semblerait agir sur les voies de la sénescence répllicative, en activant l'expression ou l'activation de p53 (Astle et al., 2012; Lee et al., 2007; Leontieva and Blagosklonny, 2010). De plus, mTORC1 semble également impliqué dans la production du SASP au cours du vieillissement. En effet, la rapamycine est capable de diminuer l'expression de IL1 α entraînant une diminution de la transcription de gènes pro-inflammatoires comme NF- κ B (Laberge et al., 2015). De plus, Herranz et ses collaborateurs ont montré que mTOR active une sérine thréonine kinase appelée MK2 (MAPKAPK2) en aval de la MAPK p38 (Herranz et al., 2015). Cette dernière est connue pour être un inducteur de la sénescence (Freund et al., 2011). La protéine MK2 induit l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, un traitement à la

rapamycine permet donc de diminuer ce SASP. Cependant dans ces études, il a été prouvé que la rapamycine agissait uniquement sur le SASP et non sur l'arrêt du cycle cellulaire, suggérant que ces deux mécanismes clef de l'état de sénescence peuvent être régulés de manière indépendante.

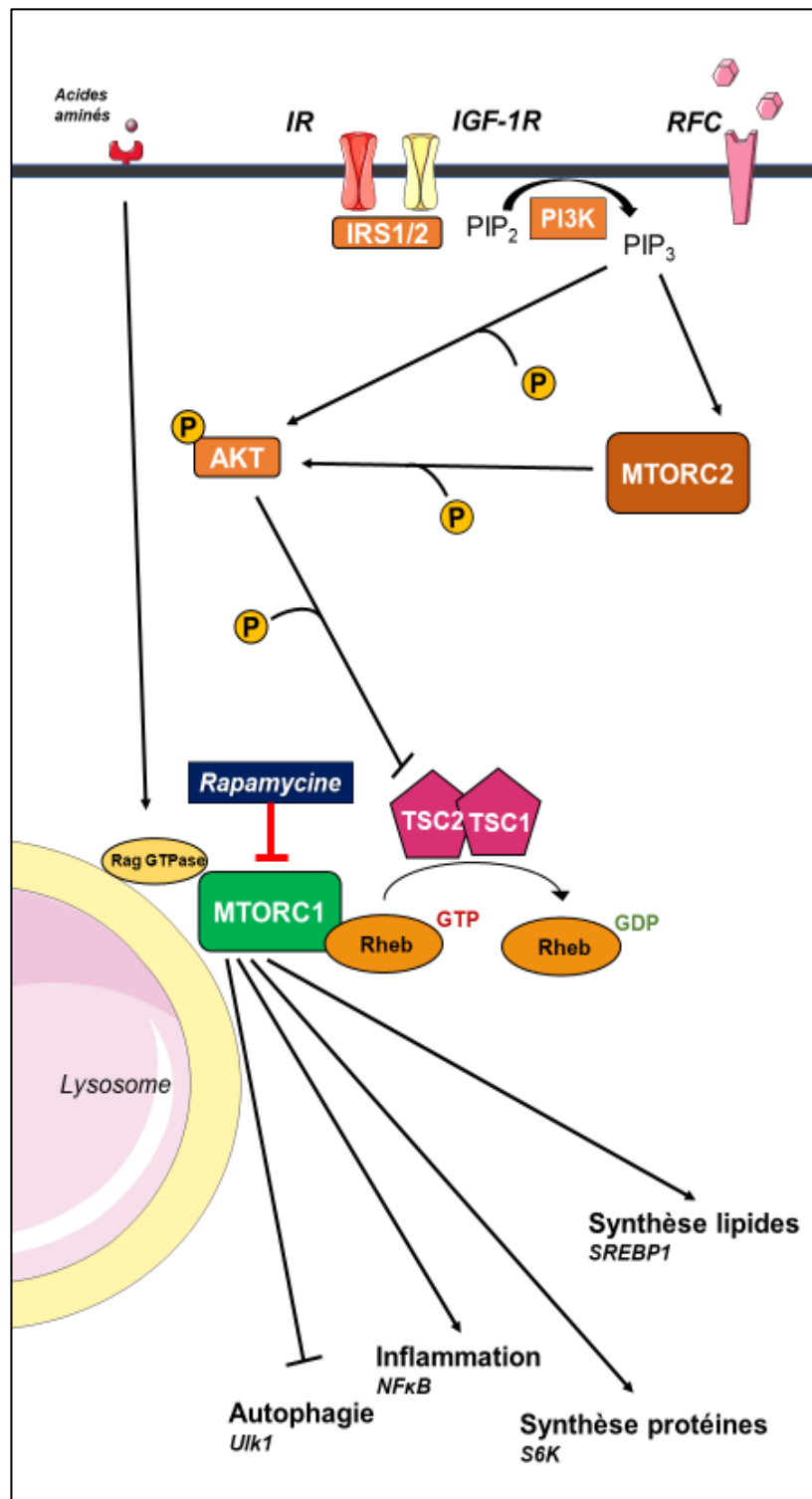


Figure 21 Voie mTOR

4. Voie des Sirtuines

Le NAD⁺ (Nicotinamide adénine dinucléotide) est un substrat essentiel aux réactions cataboliques (glycolyse, lipolyse, cycle de Krebs) au cours desquelles il est réduit en NADH qui lui sera transporté à la mitochondrie pour générer de l'ATP. De plus, le NAD⁺ joue un rôle essentiel en tant que substrat d'enzymes consommant du NAD⁺ telles que les poly-ADP-ribose polymérases (PARP), CD38 et les **sirtuines**. Ces enzymes jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus cellulaires métaboliques. Le NAD⁺ catalyse l'élimination des groupes acétyle ou acyle (réaction de démalonylation, désuccinylation, ou de déproprionylation) des protéines substrats des sirtuines, accompagnée de leur transfert en ADP-ribose.

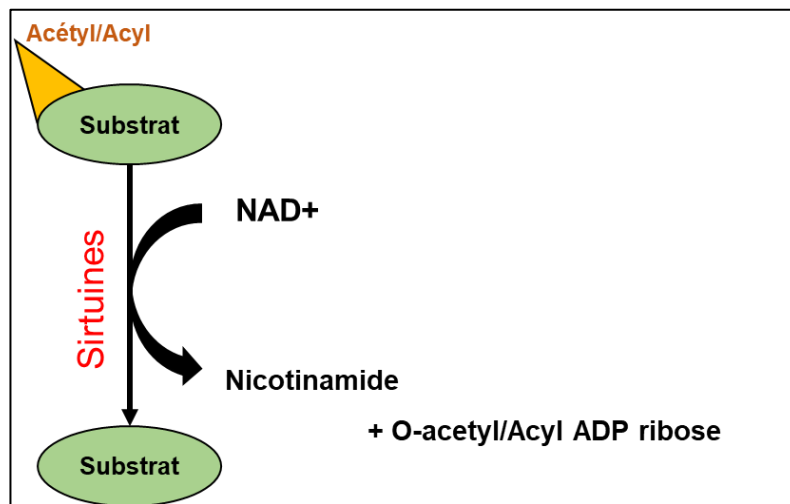


Figure 22 Réaction des sirtuines

Réaction en deux étapes : la sirtuine clive le NAD en nicotinamide (NAM) et, par la suite, un groupe acétyle / acyle est transféré du substrat à la partie ADP-ribose de NAD ; ceci se traduit par la formation de 2'-O-acétyl-ADP-ribose et d'un substrat désacétylé.

Les sirtuines sont une famille de désacétylases/désacylases NAD⁺ dépendantes qui jouent un rôle central dans la traduction des modifications NAD⁺ dans la régulation de nombreuses protéines régulatrices du métabolisme, de la réparation de l'ADN, de la réponse au stress, du remodelage de la chromatine et autres processus cellulaires. Les sirtuines font parties de la famille des histones désacétylases de classe III (HDAC). La première étude effectuée chez la levure *S. cerevisiae* a montré que l'enzyme Sir2 (orthologue sirtuines des mammifères) suffisait à allonger la durée de vie de l'animal (Kaeberlein et al., 1999). La surexpression d'un orthologue de Sir2 chez le *C.elegans* (Tissenbaum and Guarente, 2001) et la *D. melanogaster* (Rogina and Helfand, 2004) induit le même effet, montrant une grande corrélation entre l'expression des sirtuines et la longévité. Mais chez les mammifères, les effets positifs des sirtuines sont divergents du fait de l'existence de 7 sirtuines différentes (SIRT1-7) réparties différemment dans la cellule (cytoplasme/noyau/mitochondrie). A l'heure

actuelle, seules les SIRT1 et SIRT6 sont directement impliquées dans l'allongement de la longévité, c'est pourquoi dans la suite de ce chapitre je m'attarderai plus précisément sur leur implication respective.

a. SIRT1

Une surexpression dans le corps gras chez la drosophile suffit à allonger la longévité (Banerjee et al., 2012) suggérant l'importance de SIRT1 dans ce tissu.

SIRT1 active la transcription de l'adiponectine dans le TAB *via* FOXO1, ce qui améliorerait la sensibilité à l'insuline au cours du vieillissement (Qiao and Shao, 2006). Cette activation de FOXO1 permet également d'inhiber la triglycéride lipase ATGL, inhibant donc la lipolyse (Chakrabarti et al., 2011). Dans un modèle de souris surexprimant SIRT1 dans le TAB et le tissu adipeux brun ainsi que dans le cerveau (SIRT1-KI), des améliorations métaboliques sont à noter avec une cholestérolémie diminuée, une meilleure tolérance au glucose, une diminution de la masse grasse et une insulinémie diminuée (Bordone et al., 2007).

Chez le rongeur, la surexpression (modérée) de SIRT1 améliore leur état général sur le plan métabolique avec pour conséquence des animaux moins prônes à développer des cancers du foie et une diminution de marqueurs de la sénescence tels que p16^{INK4A} dans plusieurs tissus (Herranz et al., 2010). Par ailleurs, une étude a montré que SIRT1 inhibait la transcription de certains composés du SASP comme l'IL-6 et l'IL-8 *via* la désacétylation des histones (Hayakawa et al., 2015). Enfin, SIRT1 diminue l'inflammation chronique présente au niveau du TAB au cours de l'obésité et du vieillissement, permettant une meilleure fonctionnalité de celui-ci (Gillum et al., 2011).

Les causes possibles de la diminution de NAD⁺ associé au vieillissement qui sont la diminution de sa biosynthèse et une augmentation de la consommation de NAD⁺ se sont révélées vraies. Une étude a montré que des souris de 22mois traitées avec du NMN, précurseur de NAD⁺, présentent une amélioration de la sensibilité à l'insuline au niveau des muscles, suggérant une meilleure utilisation des substrats (Gomes et al., 2013). Enfin, il existe 3 isozymes du NMNAT (NMNAT 1-2-3) permettant la conversion du NMN en NAD⁺ au niveau du noyau, du cytoplasme et de la mitochondrie respectivement (Berger et al., 2005). Dans un contexte d'obésité ou de vieillissement, une surexpression de NMNAT3 chez la souris induit une augmentation de NAD⁺ dans certains tissus métaboliques comme le TAB et le muscle (pas le foie), ce qui améliore leur tolérance au glucose, leur sensibilité à l'insuline, diminue l'insulinémie à jeun, et la cholestérolémie (Gulshan et al., 2018). D'autre part, des anti-oxydants tels que le curcuma, le thé vert et leurs dérivés entraînent une activité accrue de SIRT1, sans pour autant augmenter la longévité (Strong et al., 2013), diminuent

l'inflammation et la sénescence (Kitani et al., 2007; Sahin et al., 2016; Sun et al., 2015) et améliorent certaines fonctions notamment métaboliques. Des études ultérieures devront déterminer le mécanisme d'action de ces molécules.

b. SIRT6

De manière intéressante, un polymorphisme de SIRT6 serait associé à la longévité et un vieillissement réussi (Hirvonen et al., 2017), mais cela n'est pas le cas dans toutes les ethnies (Lin et al., 2016). Dans un modèle de souris surexprimant SIRT6 (souris **MOSES**), les souris âgées de 22 à 26 mois présentent une amélioration de la tolérance au glucose et d'autres paramètres métaboliques malgré une composition corporelle similaire (Roichman et al., 2017). Ceci pourrait être dû à modifications du TAB qui présente une grande diminution de l'inflammation, malgré le fait que l'état inflammatoire plasmatique reste inchangée. Ces résultats suggèrent que l'action locale de SIRT6 sur le TAB suffirait à améliorer l'insulinorésistance. Dans ce modèle surexprimant SIRT6, p16^{INK4A} ne se retrouve pas diminuée dans le TAB de souris âgée (Roichman et al., 2017) bien qu'une diminution de l'inflammation et une amélioration de ce tissu soient observées. En effet, SIRT6 protège de la sénescence mais d'une sénescence plutôt répllicative avec une diminution de l'attrition des télomères, des dommages à l'ADN et de la voie p21 (Cardus et al., 2013; Nagai et al., 2015). A contrario, une délétion de SIRT6 (**SIRT6KO**) entraîne une mort précoce des souris due à une hypoglycémie (glucose et IGF1 bas), suggérant un rôle important de cette sirtuine dans l'homéostasie glucidique (Mostoslavsky et al., 2006). De plus, SIRT6 régule l'expression de TNF α à la baisse (Van Gool et al., 2009), et est capable d'interagir avec un composé du complexe NF- κ B ce qui inhibe l'expression de gènes cibles de celui-ci et ainsi diminue l'inflammation (Kawahara et al., 2009). Il est donc possible que cet état inflammatoire chez les souris SIRT6KO participe grandement à la mort prématurée de ces animaux.

5. Rôle de l'AMPK

L'adénosine monophosphate-protéine activée (AMPK) est un senseur métabolique qui adapte les cellules à des états de faible énergie pour soutenir la production d'ATP. La signalisation AMPK agit pour contrôler un réseau de signalisation complexe comprenant plusieurs voies de la longévité, telles que la signalisation FOXO, mTOR, et SIRT1. La théorie du « taux de vie du vieillissement » (appuyée plus tard par la théorie radicalaire) souligne que le métabolisme énergétique maintient l'homéostasie dans l'organisme, alors que la consommation excessive d'énergie accélère le processus de vieillissement. Dans ce sens, une surexpression d'un orthologue de l'AMPK chez le *C.elegans* et *D. melanogaster* augmente la longévité (Apfeld et al., 2004; Funakoshi et al., 2011). Chez le rat, un traitement

avec de la metformine, un activateur de l'AMPK, dès l'âge de 3 mois permet d'augmenter la durée de vie des animaux lorsqu'il est débuté assez tôt (Anisimov et al., 2011). Cette étude suggère que l'AMPK est essentielle dans les premières étapes de la vie. Zwerschke et ses collaborateurs ont montré que des cellules sénescentes présentaient un taux d'AMP 30 fois plus élevé, certainement dû à une glycolyse exacerbée (Zwerschke et al., 2003). Dans ce sens, l'AMPK s'hyperactive du fait d'un ratio AMP/ATP augmenté, et phosphoryle p53 (Jones et al., 2005), qui augmente fortement cette sénescence puis induit l'apoptose (Okoshi et al., 2008).

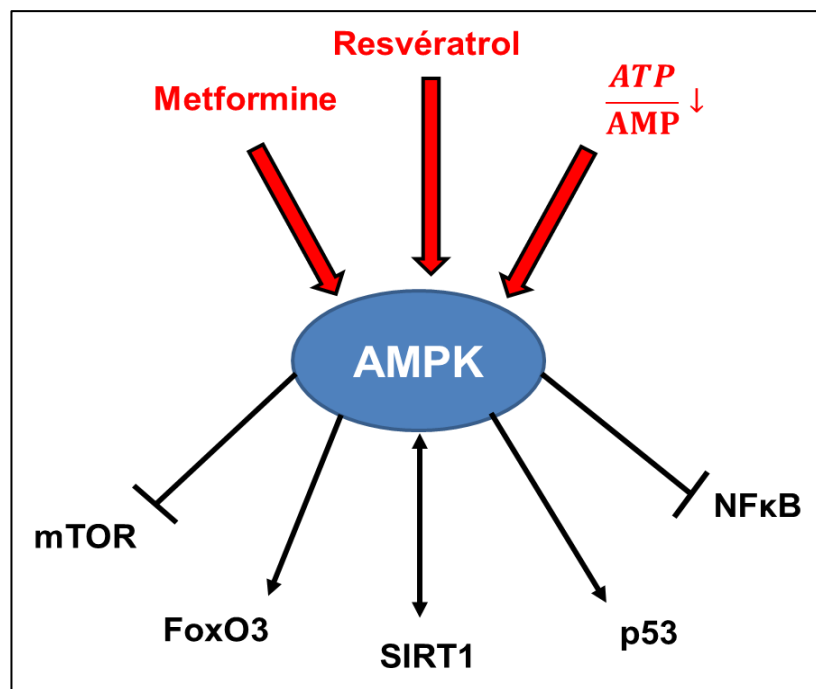


Figure 23 Les effets pléiotropes de l'AMPK

Du fait de ses actions pléiotropes, des études cliniques sont en cours afin d'évaluer les effets d'une activation de l'AMPK sur les pathologies associées au vieillissement. Actuellement deux études devraient être terminées en 2018 et 2019 : **MILES** (Metformin in longevity study NCT02432287) qui est une étude randomisée de prévention qui propose de traiter oralement des patients âgés de plus de 60ans avec 1700mg/jour de metformine, afin d'étudier si ce traitement suffit à restaurer un profil génique « jeune » et réverser l'intolérance au glucose débutante. Une étude plus récente nommée **TAME** (Targeting aging with metformin) s'intéresse aux effets de cette molécule sur le développement des cancers, des maladies cardiovasculaires et aussi de la maladie d'Alzheimer chez la personne âgée de 65 à 79 ans non diabétique.

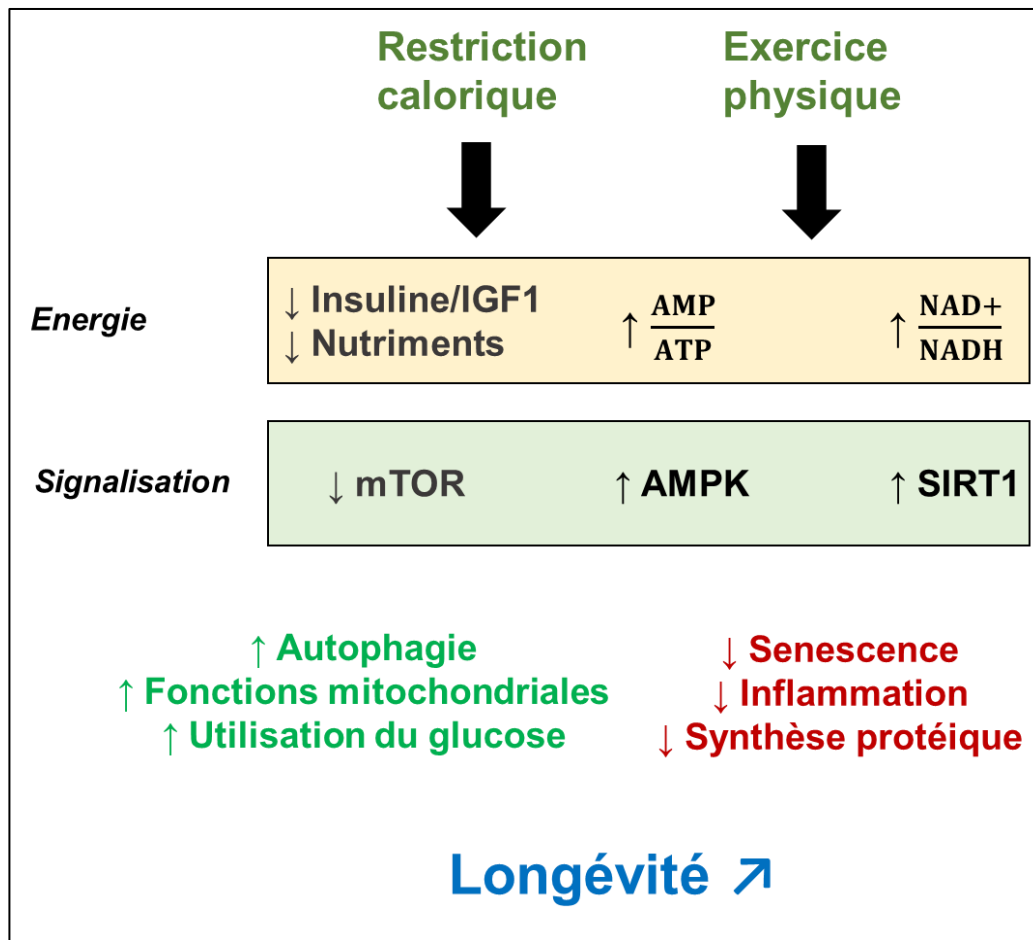


Figure 24 Effets de la restriction calorique et de l'exercice physique

B. Evolution du tissu adipeux blanc au cours du vieillissement

I. Localisation du TAB

Chez l'homme et la femme on note différents dépôts de tissus adipeux : des dépôts profonds ou viscéraux (périrénal, gonadique, mésentérique), et des dépôts superficiels ou sous-cutanés (interscapulaire, abdominal, fémoral, glutéal). Les capacités métaboliques et endocrines du TAB diffèrent d'une localisation anatomique à l'autre. Selon les sexes, les dépôts présentent une distribution différente. Chez l'homme, le tissu adipeux s'accumule préférentiellement au niveau viscéral (profil androïde), alors que chez la femme, il s'accumule préférentiellement au niveau glutéal et fémoral (profil gynoïde). L'obésité de type gynoïde semble n'entraîner aucune conséquence néfaste sur la santé (mise en réserve

d'énergie en vue de la gestation et de la lactation) alors que l'obésité androïde est corrélée à une augmentation du risque de pathologies cardio-vasculaires. De plus, il a été montré qu'une augmentation du TAB sous-cutané semble améliorer la sensibilité à l'insuline chez l'Homme comme chez la souris (Kim et al., 2007; Porter et al., 2009). Enfin, une transplantation de TAB sous-cutané semble être métaboliquement bénéfique (moins d'inflammation, meilleure tolérance et utilisation du glucose) (Tran et al., 2008). Ces résultats appuient l'hypothèse que le TAB sous-cutané est bénéfique, contrairement au TAB viscéral qui serait délétère. Pour appuyer cette hypothèse, une étude effectuée chez le rat âgé de 15 mois a montré qu'une ablation du TAB viscéral (périgonadique et périrénal) était bénéfique avec une amélioration de l'action périphérique et hépatique de l'insuline, ainsi qu'une diminution de l'expression du $TNF\alpha$ dans le TAB sous-cutané, alors qu'une ablation du TAB sous-cutané n'engendrait aucune amélioration de ce paramètre (Gabriely et al., 2002).

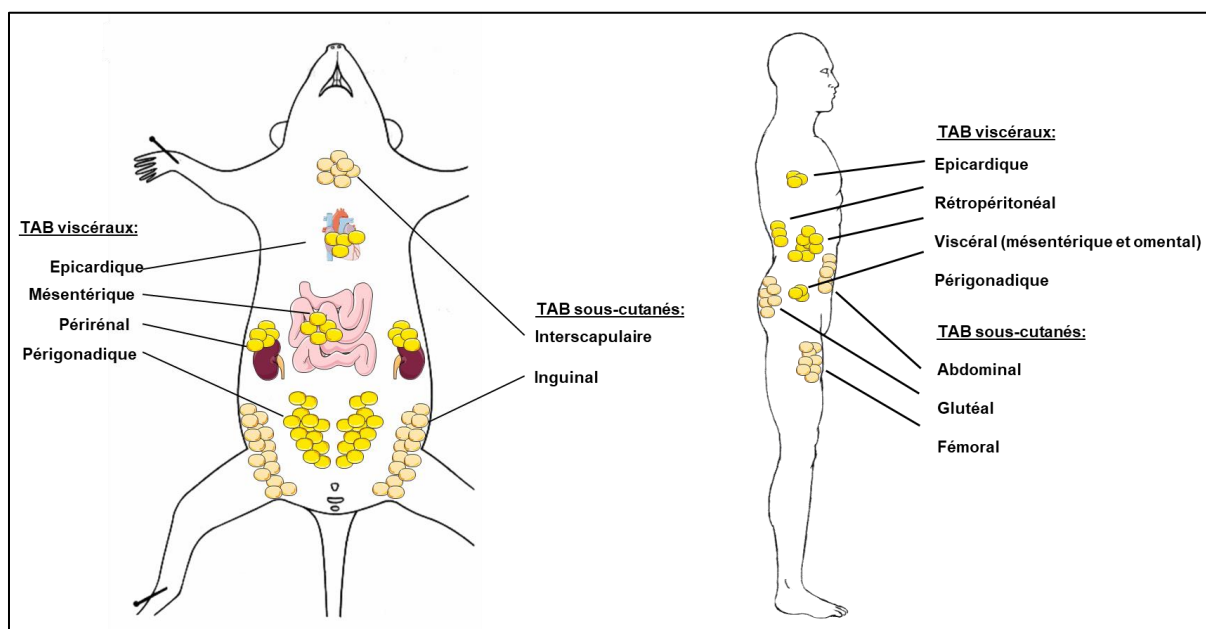


Figure 25 Les différents dépôts adipeux chez la souris et l'Homme

Ces deux espèces présentent des TAB viscéraux et sous-cutané. Selon leur localisation, ces TAB portent différents noms. On note les TAB épicaudique, mésentérique, périrénal et périgonadique pour les TAB viscéraux de la souris et aussi de l'Homme. On parle également de TAB omental et mésentérique pour le TAB viscéral humain. Les TAB sous-cutané de la souris se limitent aux TAB inguinal et interscapulaire. Chez l'Homme on en note trois principaux : l'abdominal, le glutéal et le fémoral.

Afin d'évaluer la composition corporelle, on utilise fréquemment en clinique le calcul de l'IMC (Indice de masse corporelle ; masse corporelle/taille²). Cependant, pour une personne âgée, ce standard ne devrait plus être utilisé car, comme le suggère Calle et ses collaborateurs, le vieillissement est associé à une diminution de la masse spécifiquement musculaire de 20 à 40% entre 20 et 80 ans (Calle et al., 1999). Ainsi, afin de pouvoir évaluer les modifications de composition corporelle chez la personne et l'animal âgé, on préférera

l'utilisation de la résonnance magnétique (DEXA). Comme le montre la Figure 26, on observe chez l'Homme une redistribution du TAB du compartiment sous cutané vers le viscéral au cours du vieillissement. Ceci est associé au développement du syndrome métabolique et de la résistance à l'insuline (Abraham et al., 2015). La distribution du tissu adipeux paraît plus importante que la quantité de tissu adipeux elle-même dans la sensibilité à l'insuline. En effet, il a été montré qu'il n'y avait aucune différence de quantité de graisse corporelle au niveau du tronc chez des personnes âgées insulino-résistantes et insulinosensibles (Gavi et al., 2007). Par contre, on observe une diminution du ratio graisse des membres/graisse du tronc chez les individus insulino-résistants. En revanche, chez des personnes âgées obèses, ce ratio ne représente plus un marqueur de risque cardiométabolique (Saunders et al., 2009).

Chez l'animal, des études transversales pratiquées chez le rat ont démontré un comportement différent de celui de l'Homme. En effet, la masse corporelle totale augmente pendant 85% de la vie et diminue ensuite dès l'âge de 18mois (Bertrand et al., 1980; Yu et al., 1982). De plus, la masse corporelle maigre croît pendant les premiers 75% de la vie et reste constante jusqu'au déclin. Cependant, la masse grasse augmente pendant les premiers 70% de la durée de vie puis diminue dans les 30% restants. Par conséquent, l'ampleur de la diminution de la masse grasse au cours du vieillissement se produit plus tôt et est plus étendue que la perte de masse corporelle maigre.

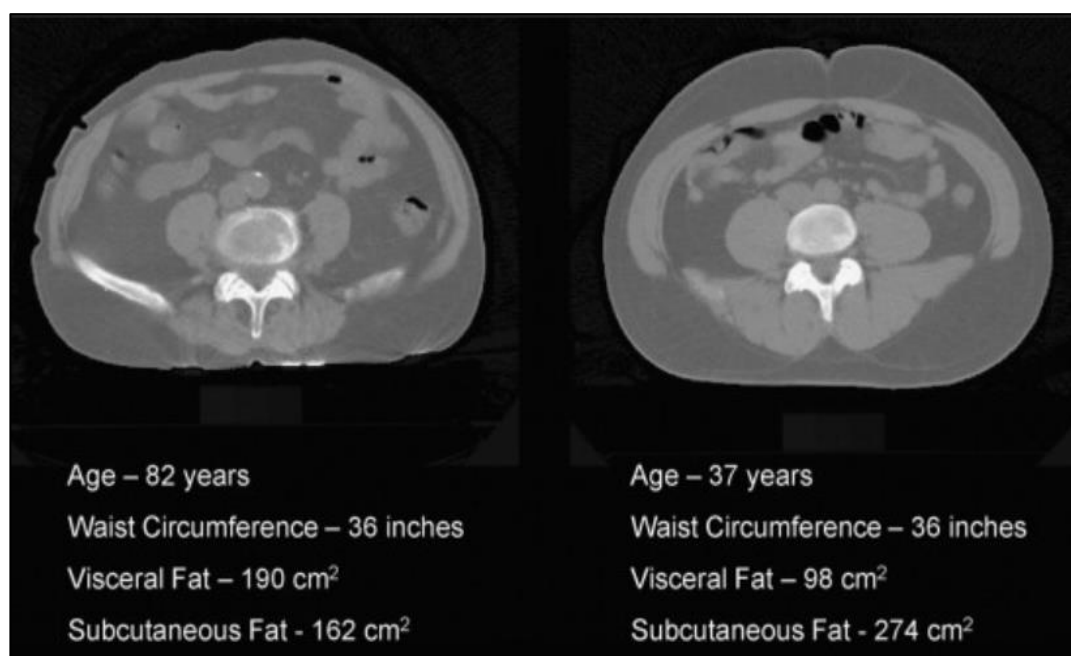


Figure 26 Distribution du TAB chez l'Homme avec l'âge

Le TAB viscéral chez un individu de 37ans comparé à un de 82 ans est moins important alors qu'avec l'âge on perd du TAB sous-cutané. Les deux individus présentent un même tour de taille (waist circumference) (Kuk et al., 2009).

II. Composition du tissu adipeux

1. Fraction stroma-vasculaire (FSV)

La FSV constitue la niche ou le microenvironnement du TAB. Elle est composée entre autres de cellules endothéliales, de péricytes, de cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes...), de cellules progénitrices (ou préadipocytes) et de cellules mésenchymateuses (CSM). Elle est obtenue après digestion du TAB par de la collagénase, lavages, filtration et centrifugations. Ces cellules constituent la niche des adipocytes, différente selon le TAB considéré (viscéral ou sous-cutané), la localisation, et la sensibilité à différents stress (par exemple, la surcharge pondérale). La FSV joue un rôle important pour l'homéostasie du TAB. En effet, les péricytes et les cellules endothéliales permettent une bonne vascularisation du tissu. Les préadipocytes peuvent se différencier en adipocytes matures afin de permettre le renouvellement des adipocytes, et participer aussi à l'expansibilité du tissu adipeux (en cas d'obésité par exemple).

a. Les préadipocytes

Les préadipocytes d'individus âgés présentent une réduction de leur fonction d'adipogénèse (mesurée entre autres par l'expression de CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α et de PPAR γ diminuée) par rapport à des individus jeunes (Caso et al., 2013; Karagiannides et al., 2001). De plus, il a été montré que la gestion des acides gras par les préadipocytes change avec le vieillissement, avec une susceptibilité accrue à la lipotoxicité et une altération de l'adipogénèse et de la bêta-oxydation induite par les acides gras (Guo et al., 2007). Une explication de ses dysfonctions résiderait dans l'état de sénescence. En effet, au cours du vieillissement, Xu et ses collaborateurs ont montré que les préadipocytes en culture d'individus âgés de 70 ans sont sénescents, comparés à des individus jeunes de 30 ans (Xu et al., 2015a). Le SASP de ces préadipocytes affecte la fonction adipogénique en sécrétant entre autres de l'activine A (famille des TGB β) (Xu et al., 2015b). En bloquant *in vitro* ou *in vivo* ce peptide ou la voie cellulaire JAK (Ruxolitinib), une restauration de l'adipogénèse, une diminution de la lipotoxicité et une amélioration de la sensibilité à l'insuline sont observées (Xu et al., 2015a, 2015b). De manière intéressante, chez une souris génétiquement modifiée et âgée ne possédant pas de cellules sénescents (souris INK-ATTAC, voir Figure 15), l'activine A plasmatique est diminuée, montrant ainsi l'importance des sécrétions des cellules sénescents comme cibles thérapeutiques potentielles (Xu et al., 2015b). L'élimination des cellules sénescents pourrait donc faciliter l'expansion du tissu adipeux, en même temps qu'une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

b. Les cellules immunitaires

Les cellules immunitaires telles que les macrophages jouent le rôle de « cellules nettoyeuses » en éliminant les adipocytes nécrotiques. Contrairement à l'obésité, les macrophages ne semblent pas être une source majeure de cytokines pro-inflammatoires avec le vieillissement dans les TAB puisque leur nombre et leur profil ne changent pas avec l'âge (Harris et al., 1999; Jerschow et al., 2007; Wu et al., 2007).

c. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Enfin, les CSM du TAB sont actuellement étudiées car elles possèdent une capacité d'auto-renouvellement, de prolifération et de pluripotence, suggérant une future utilisation clinique dans le cadre d'une autogreffe lors d'un infarctus du myocarde (Rigol et al., 2010), de greffe de peau (Chavez-Munoz et al., 2013; Edwards et al., 2018), d'une dystrophie musculaire (Gomes et al., 2018) ou d'une maladie rénale (Wang and Sun, 2018). Cependant lors du vieillissement, les capacités de régénération des CSM du TAB sont moindres (Liu et al., 2017; Marędziak et al., 2016).

2. Adipocytes

Les adipocytes sont les cellules spécialisées dans le stockage des lipides sous forme de triglycérides. Sa structure est ronde et extensible du fait du stockage des graisses dans une seule vacuole lipidique, poussant le noyau et les organites vers l'extérieur. Sa taille moyenne est d'environ 70 à 120µm chez l'humain, mais il peut atteindre les 250µm au cours de l'obésité.

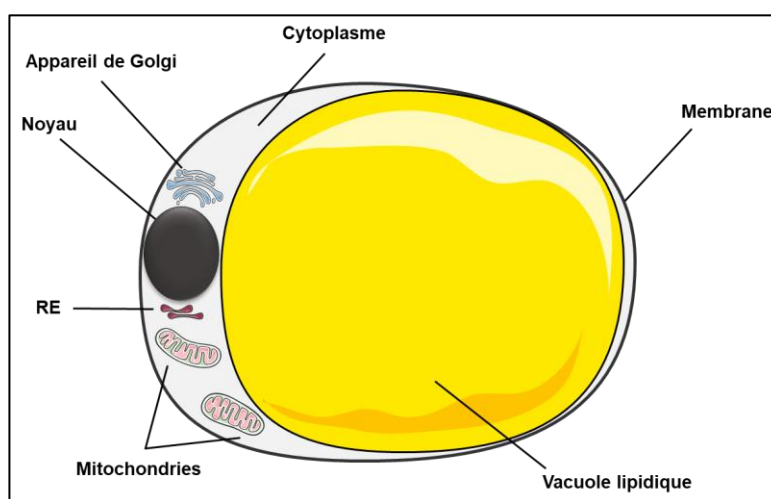


Figure 27 Morphologie et composants d'un adipocyte du TAB

Les deux fonctions principales du TAB sont de stocker l'énergie excédentaire sous forme de triglycérides, dans de grandes gouttelettes uniloculaires (**lipogenèse**), mais aussi de libérer les triglycérides sous la forme d'acides gras libres (**lipolyse**), au cours d'un jeûne par exemple. La lipogenèse est médiée par les enzymes lipogéniques comme l'acyl-CoA synthase (ACS), ATP citrate lyase (ACL) ou encore la fatty acid synthase (FAS) et la glycerol-3-phosphate déhydrogénase (GPDH). Ce processus dépend de la disponibilité en acides gras et en glucose. La lipogenèse dépend donc de la présence de transporteur d'acides gras (CD36) et de glucose (passif Glut1 ; et dépendant de l'insuline Glut4). L'insuline augmente la translocation de Glut4 et active donc la lipogenèse. Les adipocytes contiennent également des « lipases » qui décomposent les triglycérides en glycérol et en acides gras (FFA) qui peuvent ensuite être transportés dans le sang vers le foie, les muscles et autres, où ils sont utilisés (oxydation des acides gras). Cependant, le glycérol et les FFA relargués peuvent être réestérifiés dans les adipocytes, ce qui permet de réguler de manière aiguë le flux d'acides gras.

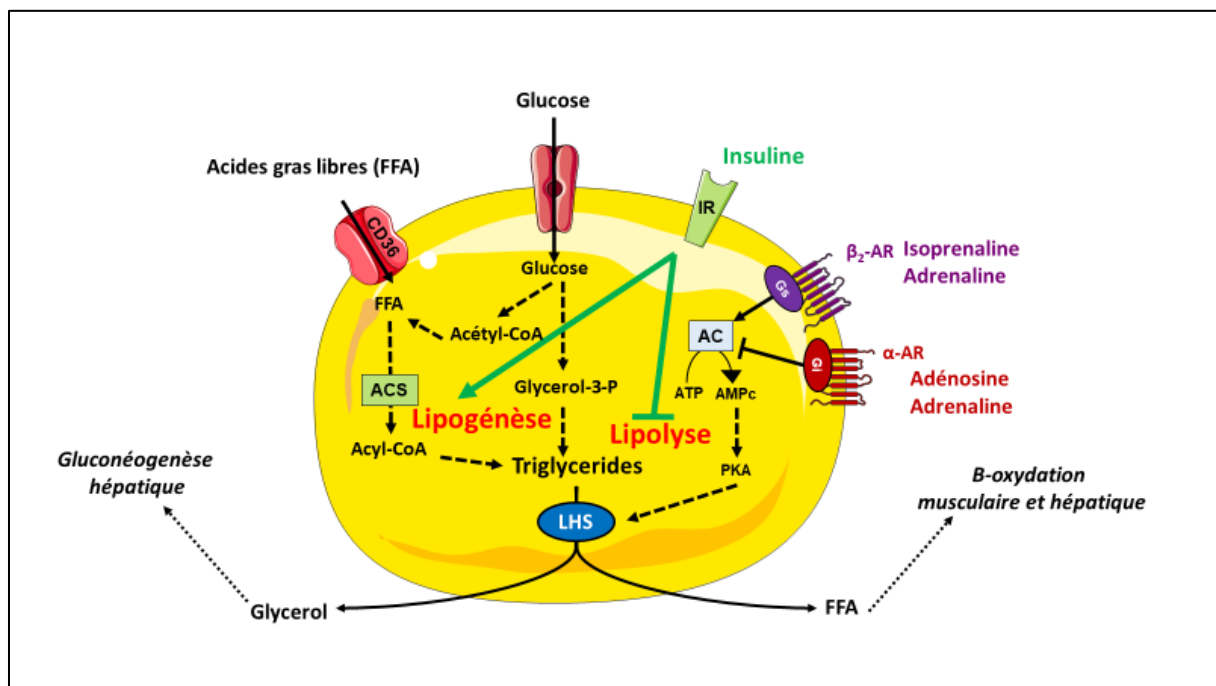


Figure 28 Le métabolisme dans les adipocytes du TAB

L'adipocyte arbitre la lipogenèse [conversion de FFA en triglycérides pour le stockage] et lipolyse (dégradation des triglycérides en FFA et glycérol). Il est également sensible à l'évolution des indices nutritionnels. Par exemple, il est sensible à l'insuline [l'insuline stimule l'absorption du glucose et la lipogenèse et inhibe la lipolyse] et est sujet à une régulation adrénérgique [stimule la lipolyse]. ACS, acyl-CoA synthase; AC, Adénylate cyclase ; AR, récepteur adrénérgique; IR, récepteur de l'insuline ; LHS, lipase sensible aux hormones; PKA : Protéine Kinase A

III. Altérations des fonctions métaboliques au cours du vieillissement

Au cours du vieillissement, un dysfonctionnement du TAB dans ses fonctions de stockage et relargage de lipides est généralement observé. Cependant des résultats parfois contradictoires sont retrouvés dans la littérature car cela semble dépendre de l'espèce (rat, lapin, humain), du TAB étudié (viscéral ou sous-cutané), de sa localisation (péri-rénal, omental, sous-cutané), ainsi que de l'âge des animaux ou patients comparés (3mois/12mois/24mois ou 20ans/55ans/90ans) (Gregerman, 1994).

1. La lipogenèse

Nogalska et ses collaborateurs ont démontré que des rats âgés de 20 mois présentent une diminution d'expression de gènes lipogéniques tels que ACC, FAS, ACL, et GPDH), comparés à des rats de 2 mois associée une diminution de la lipogenèse (Nogalska et al., 2003). Chez les animaux âgés, Glut4 est également diminué suggérant une diminution de l'action de l'insuline. Dans ce sens, une étude sur du TAB sous-cutané humain d'individus âgé de 55 ans a montré une diminution du nombre de récepteurs à l'insuline associée à baisse de la réponse de celle-ci avec le vieillissement (Bouder et al., 1983). L'effet anti lipolytique de l'insuline est similaire quel que soit l'âge mais le nombre de récepteurs et leur activité sont diminués, ce qui pourrait participer à la résistance à l'insuline chez la personne âgée et entraîner des dépôts ectopiques de lipides dans les autres organes métaboliques.

Une autre explication viendrait d'une augmentation de la leptine chez les rats âgés aussi bien plasmatique que dans le TAB (Nogalska and Swierczynski, 2004; Nogalska et al., 2003). En effet, en administrant de la leptine chez des rats jeunes de 2 mois afin d'augmenter la leptinémie retrouvée chez des rats âgés, la lipogenèse du TAB est diminuée principalement due à une diminution de l'expression de SREBP1c (observée chez le rat âgé également), régulant l'expression génique de la FAS et ACC (Nogalska et al., 2005). Dans ces études, la source du TAB n'est pas précisée alors que d'autres travaux ont montré l'importance de distinguer les différents dépôts adipeux. En effet, Wronska et ses collaborateurs ont observé que des rats âgés de 24 mois montraient une diminution de l'expression de la FAS et de l'ACL dans les TAB rétro-péritonéal et sous-cutané, par contre aucune différence n'est observée dans le péri-gonadique concernant la FAS (Wronska et al., 2015).

2. La lipolyse

Avec l'âge, selon Lönnqvist et ses collaborateurs la lipolyse basale des TAB sous-cutané humains est identique voire un peu diminuée et la stimulation par des catécholamines décline également et serait dû à une diminution de l'activation de la LHS (Lönnqvist et al., 1990) ou d'une diminution du nombre de récepteur β -adrénergiques (Lönnqvist et al., 1992). Une autre étude montre une diminution de la capacité des agonistes β -adrénergiques à activer la lipolyse au cours du vieillissement, et serait due à une amplification de la voie α -adrénergique qui inhibe la lipolyse (Hoffman et al., 1984a, 1984b). Dans ce sens, chez des rats Fischer 344 âgés de 2, 12 et 27 mois, aucune différence n'a pu être observée sur du TAB périgonadique en termes de stimulation à la lipolyse par de l'isoprotérénol (beta pur) (Twersky et al., 1991). A l'inverse des adipocytes provenant de rats Fischer 344 stimulés par de l'épinéphrine montrent une diminution de la lipolyse (Gregerman, 1994). Cette étude appuie l'importance de l'effet inhibiteur de la voie α -adrénergique qui serait plus activée. Deux études ont montré une diminution de la lipolyse entre des rats Sprague-Dawley âgés de 2 ou 12 mois, mais pas chez les rats Fischer 344, démontrant que le fond génétique des animaux utilisés est primordial pour l'analyse des voies de la lipolyse (Hoffman et al., 1984a; Twersky et al., 1991). Une autre étude de 1994 montre que selon la localisation du TAB, la réponse à l'épinéphrine au regard de la lipolyse est différente entre le TAB périgonadique et le périrénal (Carraro et al., 1994).

Par ailleurs, la lipodystrophie du TAB sous-cutané (observée lors du vieillissement) induit une diminution de sa capacité à capturer les acides gras libres (Uranga et al., 2005), ce qui pourrait expliquer les difficultés de stockage des adipocytes des personnes âgées. En conséquence, des concentrations plus élevées d'acides gras libres circulants conduisent à une accumulation excessive de lipides dans les graisses non sous-cutanées notamment dans les tissus maigres. Ainsi, les augmentations de l'adiposité viscérale, de la graisse hépatique, des lipides musculaires et d'autres dépôts ectopiques habituellement associés au vieillissement peuvent être attribuables en partie à un dérèglement lié au vieillissement du métabolisme des lipides.

Ainsi, la diminution de la masse grasse avec l'âge ne serait pas due à une diminution du nombre d'adipocytes ou préadipocytes mais à la diminution de la taille des adipocytes matures (Bertrand et al., 1980; Spalding et al., 2008).

IV. Altération de la fonction endocrine

L'adipocyte est capable de sécréter de nombreuses molécules qui peuvent avoir des effets autocrines, paracrines mais également endocrine. Les facteurs sécrétés sont de diverses

origine : peptidique, lipidique, cytokines pro-inflammatoires, facteurs de la coagulation etc. Ces sécrétions provenant de l'adipocytes sont appelées **adipokines** et permettent le maintien de l'homéostasie du TAB lui-même mais également d'autres organes métaboliques tels que le pancréas, le foie et le muscle mais également le cerveau. L'équipe de Scherer en 2005 montre l'importance des adipokines sécrétées par le TAB en utilisant la souris FAT-ATTAC (pour *Fat apoptosis through targeted activation of caspase 8*) (Pajvani et al., 2005). Cette souris ne possède plus de TAB suite à l'activation pharmacologique de l'apoptose des adipocytes matures (Pajvani et al., 2005). En absence de TAB, ces souris présentent de faibles taux d'adipokines circulantes ce qui impacte négativement la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline. De plus, l'ablation de tous les dépôts adipeux ne présenteraient pas un avantage chez des souris ob/ob (Pajvani et al., 2005)

L'**adiponectine** est une adipokine sécrétée exclusivement par les adipocytes. Elle permet la régulation de l'homéostasie glucidique et lipidique (Scherer et al., 1995) en augmentant par exemple la sensibilité à l'insuline, en diminuant la production hépatique de glucose ou encore en régulant la prise alimentaire. De plus, les niveaux d'adiponectine diminuent avec le vieillissement, mais sont corrélés positivement à la longévité. De manière intéressante, des taux plasmatiques élevés d'adiponectine sont retrouvés chez les centenaires en bonne santé (Atzmon et al., 2008; Bik et al., 2006, 2013). L'adiponectine produite par les adipocytes matures est bénéfique pour la différenciation des adipocytes et la sensibilité à l'insuline. Par ailleurs, cette protéine peut aussi représenter un biomarqueur de processus cataboliques défavorables chez les personnes âgées (c'est-à-dire la cachexie et la sarcopénie) (Baker et al., 2018).

La **leptine** est une autre adipokine importante. Elle est, majoritairement sécrétée par les adipocytes, plus particulièrement du TAB sous-cutané, et est positivement corrélée à la masse grasse. Dans certaines conditions comme le vieillissement ou l'obésité on retrouve de fortes concentrations plasmatiques de leptine, suggérant qu'il existerait une résistance à cette adipokine et donc à ces effets bénéfiques aussi bien chez l'homme (Bonin-Guillaume et al., 2006) que chez le rongeur (Gabriely et al., 2002; Li et al., 1997; Wang et al., 2001). Cependant, la perfusion sous-cutanée de leptine chez des rats âgés ne parvient pas à améliorer certains paramètres métaboliques comme la distribution de la masse grasse, l'action périphérique et hépatique de l'insuline, par rapport à des rats jeunes perfusés. Ceci suggère donc que la leptine jouerait un rôle causal dans le déclin métabolique observé au cours du vieillissement (Ma et al., 2002).

Par homologie à l'obésité, le vieillissement est associé à une augmentation de l'inflammation dans les TAB et à une sécrétion de **cytokines pro-inflammatoires** comme le $TNF\alpha$ et l'IL-6

(Morin et al., 1997; Wu et al., 2007). Il en est de même chez l'Homme bien que seul le TAB sous-cutané soit documenté (Ortega Martinez de Victoria et al., 2009). La sécrétion d'adiponectine par le TAB induit une polarisation anti-inflammatoire des macrophages (Ohashi et al., 2010), appuyant l'hypothèse que la sécrétion d'adiponectine au cours du vieillissement est diminuée. La leptine régule l'expression ou la production de certaines cytokines comme IL-2 et l'interféron- γ (IFN γ) (Lord et al., 1998) ainsi que du récepteur à l'IL-1 (IL-1R α) sur les macrophages (Faggioni et al., 1999), participant à l'inflammation chronique de bas bruit. Ceci est cohérent avec la possibilité que les adipocytes et les préadipocytes des TAB soient les principales sources de cytokines et de chimiokines inflammatoires des TAB avec vieillissement. Par ailleurs, au cours du vieillissement comme de l'obésité on observe un stress du réticulum endoplasmique (RE) notamment au niveau des cellules de la FSV du TAB, qui contribue à l'inflammation de ce tissu (Ghosh et al., 2015). Enfin, des études portant sur des centenaires en bonne santé ayant une faible masse adipeuse notamment viscérale et une sensibilité élevée à l'insuline ne démontrent pas de profil inflammatoire important, ce qui suggère que des dysfonctions adipocytaires peuvent être un déterminant plus important de l'inflammation que le vieillissement lui-même (Bik et al., 2013).

Hypothèses et objectifs de travail

Cette revue de la littérature montre l'impact et l'importance que pourrait avoir le vieillissement du TAB dans l'établissement de maladies liées à l'âge. Selon notre hypothèse, la sénescence du TAB conduirait à une dysfonction métabolique impactant les autres organes métaboliques tels que le foie et le muscle participant à l'insulino-résistance systémique retrouvée chez l'individu âgé. Ceci aurait pour conséquence une accélération du vieillissement et de ses pathologies associées. Dans ce contexte, supprimer les cellules sénescents, notamment du TAB, serait une bonne stratégie thérapeutique à envisager chez l'homme. Cependant, il est impossible à l'heure actuelle de cibler et d'éliminer génétiquement les cellules sénescents chez l'Homme et l'utilisation de sénolytiques/sénomorphiques ne permet pas de maîtriser l'impact d'une telle élimination sur l'organisme. En effet, bien que depuis plus d'un an le screening de molécules potentiellement sénomorphiques/sénolytiques est plus rapide *in vitro*, la preuve de concept *in vivo*, les effets chez l'Homme ainsi que l'identification des effets secondaires risquent de prendre un certain temps. Une autre stratégie alternative consisterait donc à cibler des composants spécifiques de la cellule sénescence en focalisant notre attention sur le SASP. Comme expliqué dans l'introduction de ce manuscrit, le TAB tient une place importante dans l'établissement de maladies métaboliques liées à l'âge et pourrait y participer *via* ses sécrétions. On sait par exemple qu'avec l'âge, les préadipocytes contenus dans la FSV sont sénescents et qu'à cette sénescence est associée une perte de fonction (l'adipogénèse), due à la sécrétion d'Activine A impactant négativement l'état général métabolique. On sait également qu'au cours du vieillissement, d'autres composants du TAB comme les adipocytes matures présentent un état de sénescence associées à des sécrétions de types pro-inflammatoires qui vont impacter de manière autocrine les fonctions du TAB. C'est ainsi que mon projet de thèse s'est articulé autour de deux axes :

1/ Etudier les conséquences de la senescence adipocytaire sur le fonctionnement du tissu adipeux au cours du vieillissement.

Pour cela nous avons décidé de comparer des souris C57Bl6J de 12mois et 24mois afin d'analyser ce qu'il se passe au cours de la transition fragilité-dépendance, période charnière dans le développement de maladies métaboliques. Des paramètres métaboliques ont été évalués au niveau plasmatique ainsi qu'une analyse profonde du TAB viscéral et

sous-cutané pour expliquer les changements métaboliques observés. L'état de sénescence de ce tissu, et plus spécifiquement dans les adipocytes, semble participer à ces modifications. Une mise au point sur un modèle *in vitro* d'adipocyte sénescence nous a permis de mimer ce qu'il pourrait se passer *in vivo* et ainsi confirmer ce lien entre l'état de sénescence et modifications métaboliques.

2/ Caractérisation du sécrétome de l'adipocyte sénescence : rôle et régulation de l'haptoglobine dans la perte de fonction de l'adipocyte liée à l'âge

Dans ce deuxième objectif nous avons identifié une molécule sécrétée spécifiquement par l'adipocyte viscéral sénescence du TAB au cours du vieillissement, participant à la détérioration de ses fonctions.

Pour ce faire, nous avons procédé à une étude protéomique à large spectre sur du plasma de souris jeune (3mois), adulte (12mois) et âgée (24mois), en collaboration avec le plateau de protéomique de l'Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale de Toulouse (IPBS). L'analyse de ce travail a montré qu'une quinzaine de protéines varient significativement (Fig. 3a de la partie Résultats expérimentaux) dans le plasma avec l'âge. En effet, les concentrations plasmatiques de ces molécules augmentent ou diminuent de manière linéaire entre 3, 12 et 24 mois. Le but de cette première expérience a été de comparer, parmi les différents candidats, ceux variant de la même façon dans le plasma et au sein du tissu adipeux blanc viscéral. L'expression et la variation de ces protéines ont donc été vérifiées par transcriptomique dans les TAB entiers viscéral et sous-cutané, la FSV et les adipocytes isolés puis nous avons sélectionnés les protéines variant de la même manière que dans le plasma (augmentation ou diminution, Fig. 3b, 3d, 3e de la partie Résultats expérimentaux). Seules trois protéines augmentent tant dans le plasma que dans le TAB viscéral et les adipocytes isolés, mais pas dans la FSV : **S100A4** (Calcium binding protein A4 ou métastatine), **Tenm3** (Teneurin-3) et **Hp** (Haptoglobine). Une recherche bibliographique a été effectuée afin de sélectionner une seule molécule parmi ces trois et étudier son rôle sur les adipocytes au cours du vieillissement.

1) S100A4

S100 représente une famille de 20 protéines, exprimées de manière ubiquitaire. S100A4, la première de ces protéines, a été découverte par Moore en 1965 (Moore, 1965) comme étant sécrétée par le système nerveux. S100A4 joue un rôle important dans les cancers en promouvant l'invasion et les métastases (Ebralidze et al., 1989). Une augmentation de

l'expression de S100A4 a été détectée dans plusieurs maladies non malignes telles que la fibrose tissulaire hépatique (Chen et al., 2015), la polyarthrite rhumatoïde (Senolt et al., 2006), le psoriasis (Zibert et al., 2010) et les maladies auto-immunes (Sun et al., 2017). De plus, sa surexpression en tant qu'indicateur d'un mauvais pronostic et d'un potentiel métastatique élevé a été proposée pour la première fois dans le cancer du sein (Rudland et al., 2000). Peu à peu, sa surexpression a également été observée dans d'autres métastases cancéreuses humaines, telles que celles du foie, du colon (Taylor et al., 2002) et du cerveau (Zakaria et al., 2016). S100A4 est un oncogène inducteur de métastases mais non initiateur de tumeurs, car il n'influence pas la tumorigénèse. En effet, la surexpression (Davies et al., 1995) ou la délétion (Naaman et al., 2004) de S100A4 n'induit pas un phénotype particulier chez la souris. Par contre la surexpression S100A4 favorise les métastases des tumeurs primaires chez ces animaux comme des métastases pulmonaires (Ambartsumian et al., 1996) ou mammaires (Davies et al., 1996). Cette protéine sécrétée peut se multimériser dans le plasma et médier sa réponse cellulaire via les récepteurs de types RAGE, TLR4, impliqués dans l'inflammation. Son rôle dans le TAB n'a été que très récemment étudié. En effet, une étude publiée en 2018 a identifié S100A4 comme potentiel biomarqueur de l'insulinorésistance du TAB hypertrophié chez les individus obèses (Arner et al., 2018). Cependant, aucun des récepteurs cités ci-dessus ne sont présents dans leurs modèles, et un traitement sur adipocytes différenciés avec cette molécule n'affecte ni les processus adipogéniques, ni la lipolyse, ni l'état inflammatoire. Cette protéine semble être seulement un biomarqueur de l'insulinorésistance associée à l'obésité. De plus, il a été récemment démontré que S100A4 était principalement exprimée par les cellules stromales du TAB et très peu par les adipocytes (Hou et al., 2018). Cette information peut expliquer le fait d'une absence d'effet de S100A4 sur adipocytes isolés (Arner et al., 2018) même si d'autres travaux suggèrent que S100A4 protégerait les souris de l'obésité et de l'intolérance au glucose soumises à un régime gras (Hou et al., 2018). Enfin, dans un contexte de maladie métabolique, le déficit en S100A4 a aggravé l'inflammation et l'accumulation de lipides hépatiques.

2) Teneurine-3

Les teneurines (Tenm) sont une famille de protéines transmembranaires (Tenm1 à 4). C'est une famille très conservée au cours de l'évolution. En effet, elles sont présentes chez la *D. melanogaster* (Levine et al., 1994), le *C.elegans* (Wilson et al., 1994) le poisson zèbre (*D. rerio*) (Mieda et al., 1999), la souris (Ohashi et al., 1999) et chez l'Homme (Minet and Chiquet-Ehrismann, 2000a). La Tenm3, impliquée dans le développement du système nerveux central de l'embryon, est également exprimée dans certaines régions du cerveau à l'âge adulte (Zhou et al., 2003). Les études se limitent principalement au cerveau. Par

exemple, la Tenm3 est impliquée dans la vision binoculaire (Leamey et al., 2007). Ces protéines possèdent un domaine extracellulaire qui peut être clivé et ainsi se retrouver dans la circulation sanguine (Rubin et al., 1999). Cependant, l'expression, la sécrétion et le rôle de la Tenm3 dans le métabolisme ainsi que le TAB restent inconnus à ce jour.

3) Haptoglobine

a) Définition et fonction principale

L'haptoglobine (Hp) est une glycoprotéine de la phase aigüe d'inflammation composée de quatre chaînes : deux chaînes alpha (environ 9 kDa chacune) et deux chaînes bêta (environ 33 kDa chacune). La forme $\alpha_2\beta_2$ est la forme de base retrouvée chez toutes les espèces hormis la grenouille et le poulet qui ne possèdent pas d'Hp. Chez l'Homme, il existe deux allèles HP1 et HP2 qui peuvent former 3 phénotypes HP1-1, HP2-2 et HP2-1. Ceci est dû à une duplication de l'allèle HP1 générant l'allèle HP2. L'Hp est une protéine circulante que l'on retrouve dans le fluide cérébrospinal, l'urine, le fluide synovial mais également le plasma à une concentration comprise entre 0,3 et 3mg/mL. Cette protéine est majoritairement synthétisée par le foie lors de phase aigüe de l'inflammation mais elle peut être aussi produite par les neutrophiles activés (Theilgaard-Mönch et al., 2006).

Le rôle principal de l'Hp est de réduire la toxicité de l'hémoglobine libre (Hb). En effet, dans des conditions physiologiques, l'hémolyse des érythrocytes permet leur renouvellement. Cependant, certaines maladies comme le paludisme, les maladies auto-immunes ou des infections augmentent ce phénomène et permettent la libération d'une grande quantité d'Hb dans la circulation. La liaison de l'Hp à l'Hb représente une première ligne de défense qui réduit instantanément la toxicité de l'Hb. En effet, ce complexe se lie au récepteur CD163 retrouvé sur les monocytes et macrophages, entraînant l'élimination et la clairance de l'Hb par le système réticulo-endothélial du foie (Kristiansen et al., 2001) (Figure 29).

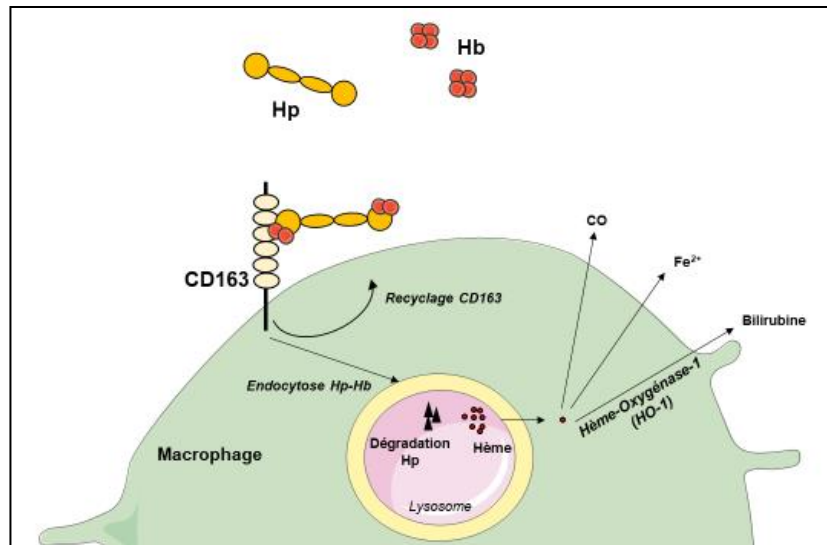


Figure 29 Liaison de l'Hp avec l'Hb

Suite à une hémolyse, l'Hp se lie à l'Hb, ce complexe se lie au récepteur CD163 présent à la surface des macrophages. Suite à l'internalisation du complexe Hp-Hb, l'Hp est dégradée et l'hème est converti en bilirubine, non oxydante pour l'organisme.

En conséquence, l'Hp est considérée comme un marqueur de l'inflammation utilisé en clinique dans le cadre du diabète de type II (Schmidt et al., 1999) ou de l'arthrite rhumatoïde (Ljung et al., 2007). Malgré son rôle majeur dans les processus inflammatoires, l'Hp n'est pas essentielle à la survie chez l'animal puisque des souris Hp^{-/-} ne présentent pas de défaut de clairance de l'Hb (Lim et al., 1998). Chez l'Homme, il existe un autre phénotype appelé Hp0 caractérisé par une absence ou un taux très bas d'Hp. Ce phénotype est surtout retrouvé dans les populations africaines, due à l'endémicité du paludisme (maladie infectieuse détruisant les hématies) (Trape and Fribourg-Blanc, 1988). Outre cette anhaptolobinémie d'origine environnementale, une origine génétique a été identifiée. Elle est retrouvée principalement dans la population asiatique causé par la délétion du gène (Hp-del) (Koda et al., 1998) (Shimada et al., 2007) (Park et al., 2004) ce qui augmente le risque de réaction anaphylactique due à une présence d'anticorps anti-haptoglobine (Morishita et al., 2000). En plus de ses propriétés antioxydantes vis-à-vis de l'Hb, l'Hp tient également un rôle dans l'angiogenèse. En effet, durant une vascularite, l'Hp plasmatique augmente et permet la formation de nouveaux vaisseaux (Cid et al., 1993). Cependant, l'Hp est également délétère en amplifiant l'inflammation suite à une greffe, participant au rejet du greffon suite à une greffe de peau (Shen et al., 2012) ou de cœur (Shen et al., 2015). Son rôle pro-inflammatoire nous a donc paru particulièrement intéressant dans le cadre du vieillissement.

b) Marqueur du vieillissement

Dans différentes études, une augmentation de l'Hp plasmatique a été retrouvée au cours du vieillissement chez la souris (Ding and Kopchick, 2011), le singe (*Macaca Mulatta*) (Krogh et al., 2014) et chez l'Homme (Chiellini et al., 2004). De plus, une étude a démontré une

corrélation positive entre l'Hp plasmatique et la maladie d'Alzheimer (Song et al., 2015). Enfin, on retrouve une augmentation de l'Hp dans le liquide céphalorachidien de sujets âgés entre 71 et 83 ans, comparé à des sujets entre 55 et 70 ans (Spagnuolo et al., 2014). Cependant, deux études se contredisent quant à son rôle de biomarqueur dans le syndrome de la fragilité (Darvin et al., 2014; Shamsi et al., 2012). Ces différences pourraient être dues aux critères d'inclusion des sujets âgés dans les deux études. De manière intéressante, dans un modèle murin de longévité augmentée (*GHR^{-/-}*), l'Hp plasmatique est beaucoup plus basse que chez des souris contrôles de 24 mois (Ding et al., 2012). Au contraire, des souris transgéniques de 16 mois surexprimant la GH bovine (bGH) présentent, en plus d'une diminution de la longévité et de la masse grasse, une augmentation d'IGF-1 et de l'Hp dans le plasma (Ding et al., 2011). Ces études relatant la plupart du temps de corrélations positives entre Hp et des pathologies associées au vieillissement, montrent bien que l'Hp pourrait avoir un rôle important dans les processus de vieillissement.

c) Son rôle dans le TAB et le métabolisme

En 1995, Friedrichs montre chez la souris que l'Hp n'est pas exprimée que dans le foie mais peut être retrouvée dans le poumon, les ovaires ou dans le TAB en quantité non négligeable (Friedrichs et al., 1995). Ces résultats ont également été retrouvés chez le chien (Eisele et al., 2005), le bovin (Saremi et al., 2012) et l'Homme (Chiellini et al., 2004; Fain et al., 2004, 2010). Plusieurs études ont montré que son expression et sa sécrétion sont spécifiques de l'adipocyte et qu'elle n'est pas exprimée dans la FSV (Chiellini et al., 2002; Fain et al., 2004; do Nascimento et al., 2004). De plus, cette protéine est plus exprimée par les adipocytes en cas d'inflammation chronique au cours de l'obésité (Chiellini et al., 2002). En effet, une souris déficiente pour les récepteurs à la leptine (*db/db*), ou la leptine (*ob/ob*), ou des souris Agouti (*A^{y/+}*) présentent une expression d'Hp augmentée comparées à des souris non obèses (Chiellini et al., 2002). De plus, cette expression semble dépendre de la présence de $TNF\alpha$ car, chez la souris double transgénique *ob/ob : TNFRKO*, une diminution de l'expression de l'Hp dans le TAB par rapport à des souris *ob/ob* est retrouvée. Cependant, ces résultats restent à confirmer car l'utilisation du promoteur *ap2* dans ces constructions géniques restent controversés de par la fuite dans les macrophages. En 2004, do Nascimento et ses collaborateurs ont confirmé *in vitro* dans des 3T3-L1 différenciés que des molécules pro-inflammatoires (IL6, LPS, catécholamines) dont le $TNF\alpha$, activent l'expression génique de l'HP (do Nascimento et al., 2004). Pour confirmer ces études, plusieurs travaux ont été menés chez l'Homme. Une équipe a montré une corrélation positive entre l'adiposité et la concentration plasmatique d'Hp (Chiellini et al., 2004). Ces résultats suggèrent que l'Hp pourrait être un biomarqueur précoce de l'obésité et pathologies associées. De manière intéressante, le TAB viscéral de patients obèses secrète plus d'Hp que leur TAB sous-cutané

(Fain et al., 2004) et des patients présentant une obésité morbide (IMC 46) possèdent une expression et une sécrétion d'Hp très élevée dans le TAB péri-cardique par rapport au TAB sous-cutané (Fain et al., 2010). Les mécanismes amenant à l'augmentation de l'Hp adipocytaire dans un contexte d'obésité ne sont pas encore bien connus mais quelques pistes sont envisageables. En effet *in vivo*, un régime de 8 semaines riche en lard ou huile de coco entraîne une augmentation de l'expression de l'HP dans le TAB notamment viscéral (Bueno et al., 2010). Il en est de même sur des 3T3-L1 différenciées traitées avec de l'acide palmitique, suggérant que les acides gras à longues chaînes permettent l'augmentation de l'expression de cette cytokine pro-inflammatoire. De plus, Ajuwon et Spurlock ont montré que l'acide palmitique induisait l'expression d'IL-6 et de $TNF\alpha$ *via* la voie NF- κ B (Ajuwon and Spurlock, 2005). Par ailleurs, une étude a montré *in vitro* que l'Hp est capable d'attirer les cellules immunes *via* son interaction avec le récepteur CCR2 présent sur les monocytes et macrophages (Maffei et al., 2009). Ce récepteur lie principalement MCP1 qui joue un rôle très important dans l'inflammation chronique observée dans le TAB en condition d'obésité. Pour appuyer ses résultats, Lisi et ses collaborateurs ont montré que des souris $Hp^{-/-}$ en régime gras sont plus tolérantes au glucose, plus sensibles à l'insuline, et ont une diminution de la stéatose hépatique et de l'inflammation dans le foie (Lisi et al., 2011).

Dans un contexte physiologique, l'Hp est nécessaire dans le TAB. En effet des MEF provenant de souris $Hp^{-/-}$ présentent une forte diminution d'accumulation de lipides suggérant que l'Hp est nécessaire à une bonne adipogénèse (Gamucci et al., 2012). De plus, d'autres études ont montré qu'au cours de la différenciation des préadipocytes en adipocytes, une augmentation de l'expression de l'Hp était observée tant en génomique (Burton et al., 2004) qu'en protéomique (Kratchmarova et al., 2002).

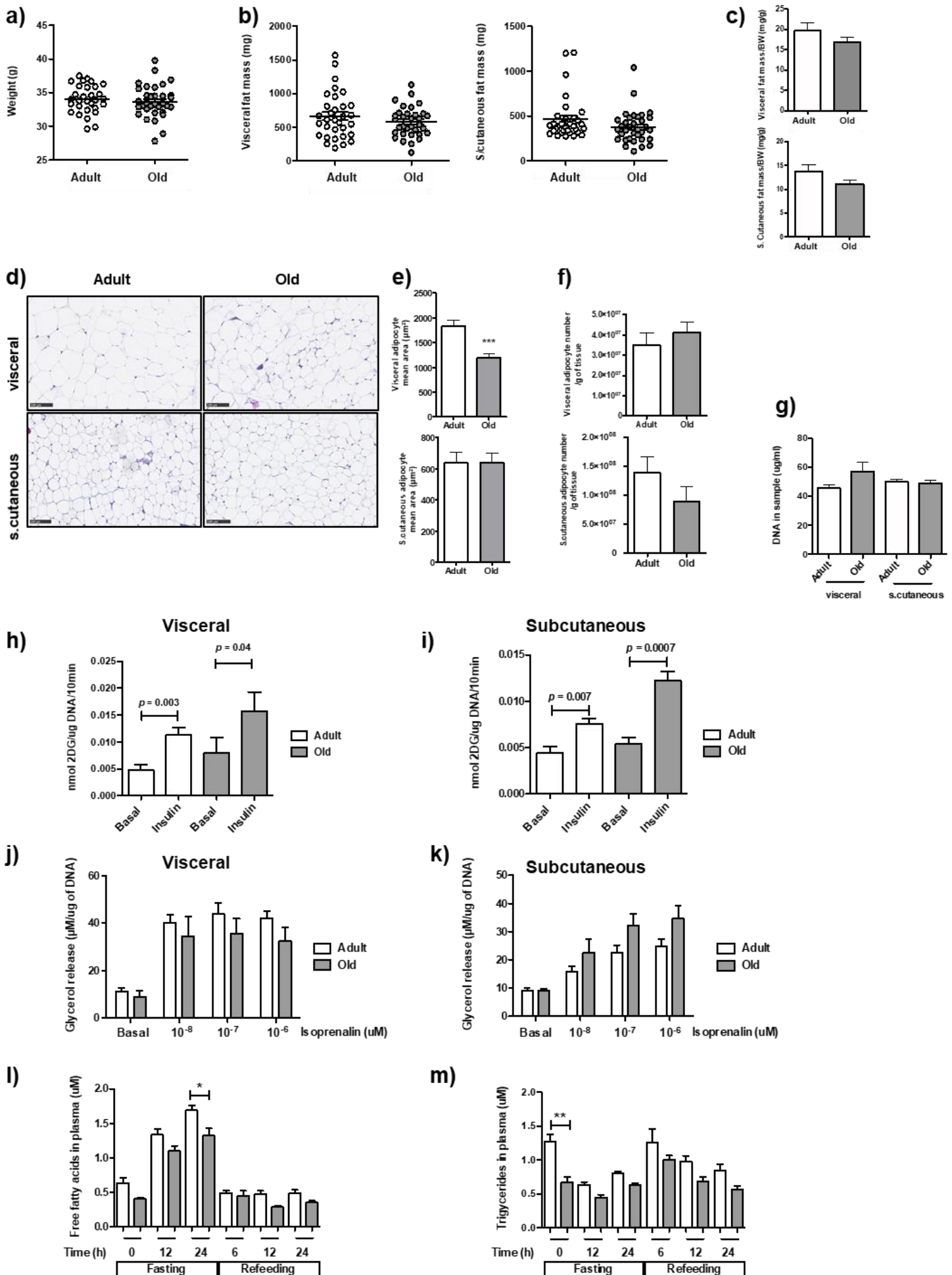
La dichotomie présentée par l'Hp est très intéressante dans notre contexte de vieillissement. En effet, selon la théorie de la pléiotropie antagoniste, il se pourrait que cette molécule soit bénéfique jusqu'à un certain moment de la vie puis délétère notamment à cause de son rôle pro-inflammatoire. Notre hypothèse de travail est donc qu'au cours du vieillissement, un adipocyte sénescant possède dans son SASP une sécrétion exacerbée d'Hp qui serait en partie responsable de la perte de fonction du TAB.

Résultats expérimentaux

A. Conséquences de la senescence adipocytaire sur le fonctionnement du tissu adipeux blanc (TAB) au cours du vieillissement

1/ Changements morphologiques et fonctionnels du TAB au cours du vieillissement

Pour mieux comprendre le rôle et l'impact de la sénescence sur le fonctionnement du tissu adipeux blanc (TAB) et plus précisément de l'adipocyte au cours de la transition « fragilité-dépendance », nous avons dans un premier temps analysé les différences métaboliques de souris âgées de 12 et 24 mois. Chez ces animaux, nous n'avons pas observé de différence de masse corporelle (**Fig. 1a**) ou de masses grasses (**Fig. 1b et 1c**) contrairement à d'autres études (Houtkooper et al., 2011). De même, les ratios masse grasse/masse corporelle déterminés pour les dépôts adipeux viscéraux et sous-cutanés ne nous ont pas permis d'observer de différence en fonction de l'âge (**Fig. 1c**). Afin de déterminer les conséquences du vieillissement sur la physiologie du TAB, nous avons dans un premier temps mesuré l'aire adipocytaire des TAB viscéraux et sous-cutanés (**Fig. 1d et 1e**). Nous remarquons que l'aire des adipocytes viscéraux issus de souris âgées est plus faible que chez la souris adulte alors qu'aucune différence n'est observée pour les adipocytes sous-cutanés. En revanche, aucune différence dans le nombre d'adipocytes composant ces tissus n'a pu être observée que ce soit par une analyse visuelle ou en quantifiant l'ADN sur une préparation d'adipocytes issus des différents dépôts adipeux des souris adultes et âgées (**Fig. 1f et 1g**). Il semble donc que seul le TAB viscéral soit affecté par le vieillissement des animaux. Afin de confirmer ces résultats, nous avons évalué les capacités fonctionnelles des adipocytes en mesurant le transport de glucose et la lipolyse dans ces cellules (**Fig. 1h, 1i, 1j, 1k**). Les résultats montrent que les fonctions du TAB viscéral ne sont que très peu affectées par le vieillissement des animaux puisque l'on observe seulement une stimulation du transport de glucose par l'insuline moins importante probablement due à une valeur basale plus élevée (**Fig. 1h**) et que la lipolyse n'est pas affectée (**Fig. 1j**). En revanche et de façon inattendue, le TAB sous-cutané est plus sensible à l'insuline et à l'isoprénaline puisque le transport de glucose et la lipolyse stimulés sont augmentés chez les animaux âgés (**Fig. 1i et 1k**).



Afin de se situer dans des conditions plus physiologiques, nous avons évalué les capacités métaboliques de ces animaux en situation de jeûne alimentaire et de réalimentation. Pour cela, les animaux adultes et âgés ont subi un jeûne de 24h puis une réalimentation de 24h au cours desquels des prélèvements de sang ont été effectués. La **Fig. 1l** montre que les taux d'acides gras plasmatiques sont significativement plus bas chez les souris âgées après 24 heures de jeûne alors que les niveaux de triglycérides sanguins ne sont pas modifiés avec la mise à jeun contrairement à ce que l'on peut observer chez la souris adulte (**Fig. 1m**). Ce résultat semble indiquer que les souris âgées ont plus de difficultés à s'adapter à la mise à jeun. Ceci est probablement dû à un défaut de flexibilité des tissus adipeux à contrôler la lipolyse. Enfin, lors d'une mise à jeun de 12h nous avons pu également voir que les animaux âgés présentaient une diminution significative de paramètres comme la glycémie et la cholestérolémie et que ceci s'accompagnait d'un niveau élevé d'insuline comparativement aux souris adultes (non montré). L'ensemble de ces résultats suggère que les animaux âgés auraient un métabolisme altéré et que le TAB pourrait jouer un rôle dans cette altération. Cependant, en l'absence de perte fonctionnelle évidente de ce tissu, nous avons évalué différents mécanismes pouvant contribuer à l'altération du TAB parmi lesquels l'adipogénèse (PPAR γ , leptine, Ap2, CEBP), la lipogénèse (FAS, SREBP1c, Glut4) ou l'inflammation et la fibrose (TGF- β , F4/80, IL-6, TNF α) dans le TAB entier ou dans l'adipocyte isolé (**Fig. 1n et 1o**). Les résultats montrent que le TAB est impacté différenciellement par le vieillissement selon sa localisation. En effet, le TAB viscéral présente une inflammation importante comme en témoignent les expressions élevées des gènes codant pour IL-6, TNF α , Cd11c, IL-1 β ou F4/80 (**Fig. 1n**). Cette inflammation est retrouvée dans l'adipocyte isolé de ce tissu (**Fig. 1o**). D'autre part, nous pouvons remarquer que ce tissu présente une expression plus élevée de gènes impliqués dans les mécanismes d'adipogénèse comme PPAR γ , CEBP ou Ap2. De façon surprenante, nous n'avons pas retrouvé de sous-expression de gènes impliqués dans la lipogénèse alors que ces adipocytes ont une taille inférieure à ceux collectés chez les animaux adultes. Enfin, l'analyse cellulaire de ce tissu n'a pas montré de modification des populations avec l'âge. D'un autre côté, nos études transcriptomiques ont confirmé que le TAB sous-cutané n'était que peu ou pas affecté par le vieillissement (**Fig. 1n et 1o**). Ces résultats confirment que le TAB viscéral est le siège de modifications pouvant contribuer à la perte de fonction, cependant l'absence de modification de composition du tissu conjuguée à une augmentation de l'inflammation des adipocytes indique que le vieillissement pourrait avoir des conséquences intrinsèques à la cellule adipeuse. Pour vérifier cela, nous avons mesuré les marqueurs de senescence dans les différents compartiments des TAB. Comme le montrent les résultats des **Fig.1p et 1q**, le TAB viscéral présente une senescence qui semble être spécifique de l'adipocyte. Ainsi, nous avons dans un second temps souhaité mieux comprendre les conséquences métaboliques d'une augmentation de la senescence dans les adipocytes.

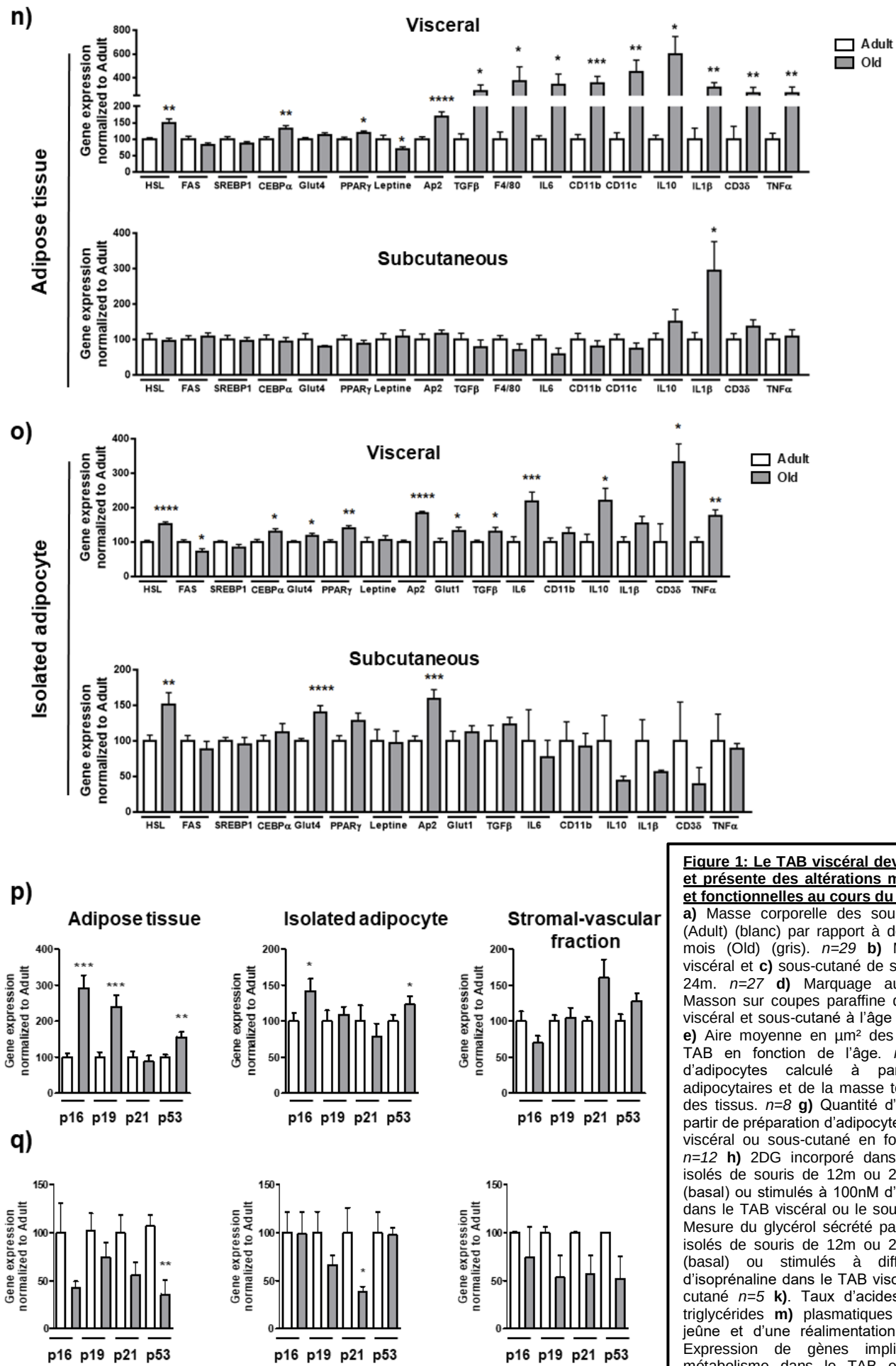
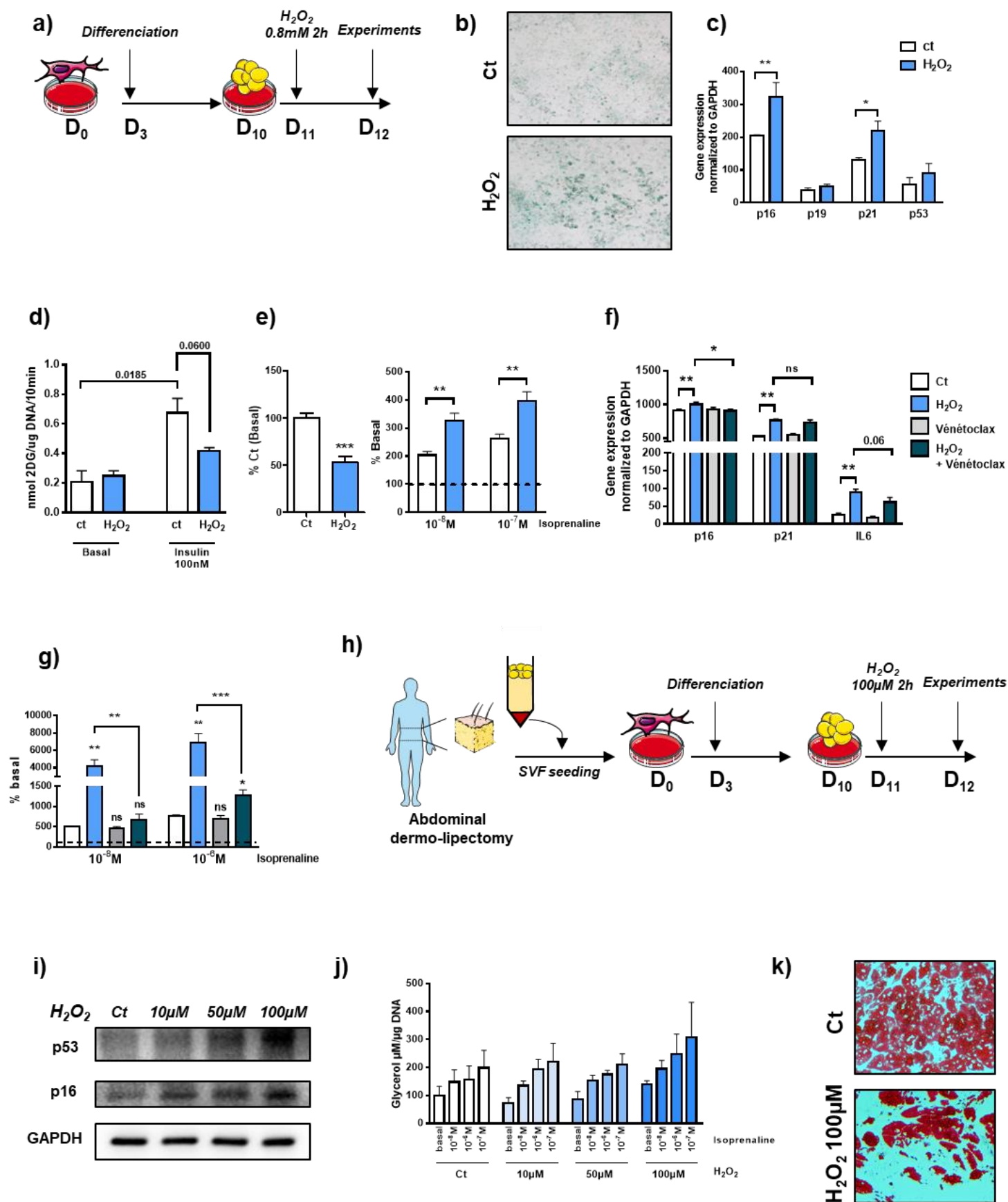


Figure 1: Le TAB viscéral devient sénescé et présente des altérations morphologiques et fonctionnelles au cours du vieillissement

a) Masse corporelle des souris de 12 mois (Adult) (blanc) par rapport à des souris de 24 mois (Old) (gris). $n=29$ **b)** Masse du TAB viscéral et **c)** sous-cutané de souris de 12m et 24m. $n=27$ **d)** Marquage au trichrome de Masson sur coupes paraffine de 8 μ m de TAB viscéral et sous-cutané à l'âge de 12m et 24m. $n=8$ **e)** Aire moyenne en μ m² des adipocytes des TAB en fonction de l'âge. $n=8$ **f)** Nombre d'adipocytes calculé à partir des aires adipocytaires et de la masse totale de chacun des tissus. $n=8$ **g)** Quantité d'ADN obtenue à partir de préparation d'adipocytes isolés de TAB viscéral ou sous-cutané en fonction de l'âge. $n=12$ **h)** 2DG incorporé dans les adipocytes isolés de souris de 12m ou 24m non stimulé (basal) ou stimulés à 100nM d'insuline (insulin) dans le TAB viscéral ou le sous-cutané $n=5$ **i).** Mesure du glycérol sécrété par les adipocytes isolés de souris de 12m ou 24m non stimulé (basal) ou stimulés à différentes doses d'isoprénaline dans le TAB viscéral ou le sous-cutané $n=5$ **k).** Taux d'acides gras **l)** et de triglycérides **m)** plasmatiques au cours d'un jeûne et d'une réalimentation de 24h. $n=15$ Expression de gènes impliqués dans le métabolisme dans le TAB entier **n)** et les adipocytes isolés **o).** Expressions géniques de marqueurs du cycle cellulaire dans les différents compartiments du TAB viscéral **p)** et sous-

2/ La senescence de l'adipocyte induit une perte de fonction.

Afin de pouvoir tester notre hypothèse selon laquelle la senescence pourrait participer au contrôle métabolique de l'adipocyte, nous avons dû mettre au point un modèle de vieillissement cellulaire *in vitro*. L'analyse bibliographique montre que le stress oxydant est un bon médiateur de senescence *in vitro* dans différents types cellulaires comme les fibroblastes (Zdanov et al., 2006). Afin de tester les effets d'un stress oxydant chronique sur l'adipocyte, nous avons tout d'abord traité des fibroblastes 3T3F442A différenciés en adipocytes par différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Après cette mise au point, nous avons sélectionné un protocole de traitement des cellules pendant 2 heures à une concentration de 0.8 mM d' H_2O_2 (Cf. Protocole **Fig. 2a**). Comme le montre les **Fig. 2 b** et **2c**, le traitement induit une augmentation de la senescence mesurée par un marquage β -galactosidase et une augmentation de l'expression des gènes p16 et p21. Fonctionnellement, ces cellules présentent une résistance à l'insuline (**Fig. 2d**) ainsi qu'une augmentation de la stimulation de la lipolyse par l'isoprénaline (**Fig. 2e**). Afin de définitivement démontrer le lien entre sénescence et modification métabolique dans l'adipocyte, nous avons co-traité les cellules avec de l' H_2O_2 et un sénolytique (venetoclax, connu pour induire la mort des cellules sénescents). Le résultat présenté dans les **Fig. 2f** et **2g** montre que le traitement a bien entraîné une diminution de la sénescence et que cela s'accompagne d'une réduction de l'action lipolytique de l'isoprénaline. Afin de valider le lien entre senescence et modification métabolique de l'adipocyte chez l'Homme, nous avons traité avec de l' H_2O_2 des adipocytes issus de culture primaire de fraction stromale-vasculaire (FSV) différenciée obtenues à partir de dermolipectomies abdominales (cf protocole **Fig. 2h**). Après avoir validé que ces cellules étaient sénescents (**Fig. 2i**), nous avons pu mettre en évidence que le traitement à l' H_2O_2 induisait une augmentation de la lipolyse stimulée par l'isoprénaline de ces cellules (**Fig. 2j**) et que cela s'accompagnait d'une diminution du stockage des lipides neutres comme révélé par un marquage à l'huile rouge (**Fig. 2k**). Des investigations sont toujours en cours afin de déterminer quelles voies de signalisation sont impactées par la sénescence dans ces cellules mais ces résultats semblent confirmer *in vitro* le lien entre la senescence et l'altération des capacités métaboliques des adipocytes.



Enfin, nous avons également étudié ce *lien in vivo* chez la souris déficiente pour le gène codant pour la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p16 (construction **Fig. 2l**). Cette souris présente le double avantage d'être déficiente pour p16 mais également de comporter un rapporteur (luciférase) inséré à la suite de la région promotrice du gène de p16. Ainsi, il nous est possible de suivre en temps réel l'expression de ce gène comme le montre la **Fig. 2m**. Après avoir validé que l'expression de p16 était diminuée chez des souris hétérozygotes et qu'aucune compensation ne s'opérait sur d'autres mécanismes de senescence (**Fig. 2n**), nous avons pu voir une augmentation des masses adipeuses viscérale et sous-cutanée chez la souris de 12 mois et une augmentation de la masse adipeuse sous-cutanée chez la souris plus âgée (24 mois) (**Fig. 2p** et **2q**) sans modification de la masse corporelle (**Fig. 2o**). De plus, dans le TAB viscéral, la taille des adipocytes est augmentée quel que soit l'âge de l'animal lorsque l'expression de p16 est diminuée (**Fig. 2r**). Enfin, les premiers résultats concernant la fonctionnalité de ces tissus montrent que les préadipocytes issus de souris hétérozygotes ou homozygotes pour l'inactivation de p16 présentent une capacité de stockage de lipides améliorée (**Fig. 2s**).

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, la senescence cellulaire affecte de nombreux processus qui peuvent conduire à la perte de fonction mais peuvent également participer à des changements phénotypiques de la cellule comme une modification de son profil sécrétoire. Dans la deuxième partie de mon doctorat, je me suis donc attachée à mieux décrire le profil sécrétoire des adipocytes sénescents au cours du vieillissement afin d'identifier de potentielles cibles moléculaires pour lutter contre les pathologies métaboliques liées à l'âge.

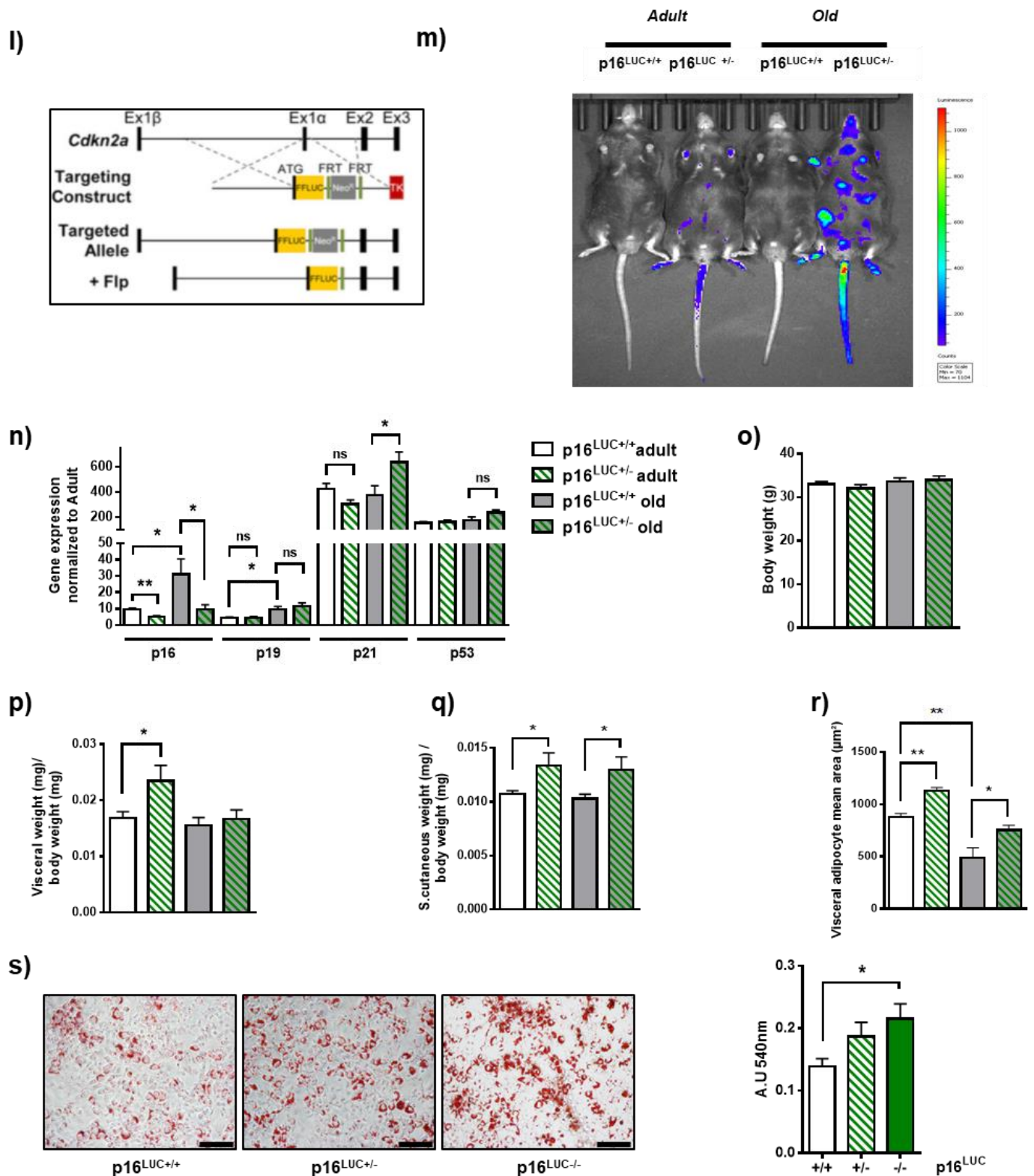


Figure 2: La sénescence de l'adipocyte induit une perte de fonction

a) Protocole d'induction de la sénescence pour des 3T3F442A différenciées. **b)** Marquage SA-β Galactosidase et expression génique de marqueurs du cycle cellulaire **c)** des 3T3F442A différenciés 24h traités (bleu) ou non (blanc) à l' H_2O_2 . **d)** 2DG incorporé dans les 3T3F442A suite au traitement à l' H_2O_2 non stimulées (basal) ou stimulées par 100nM d'insuline. **e)** Mesure du glycérol produit par les cellules non stimulées (basal) ou stimulées à différentes doses d'isoprénaline. **f)** Expression génique de marqueurs du cycle cellulaire (p16 et p21) et d'IL-6 des 3T3F442A différenciées non traitées (blanc), traitées à l' H_2O_2 (bleu), au vénétoclax (gris) ou à l' H_2O_2 et au vénétoclax (bleu foncé). **g)** Mesure du glycérol produit par ces cellules non stimulées (basal) ou stimulées à différentes doses d'isoprénaline. **h)** Protocole de mise en culture et différenciation de la FSV (SVF) humaine et d'induction de la sénescence. **i)** Expression protéique de p16 et p53 en fonction des doses d' H_2O_2 utilisées, en fonction de la GAPDH. **j)** Mesure du glycérol sécrété par ces cellules non stimulées (basal) ou stimulées à différentes doses d'isoprénaline. **k)** Marquage à l'huile rouge de FSV différenciée en adipocytes traités ou non à l' H_2O_2 . **l)** Construction génique des souris p16^{LUC} (Burd et al. 2013). **m)** Activité bioluminescente de l'activité luciférase reflétant l'expression de p16 chez des animaux p16^{LUC+/+} adultes (12m) ou âgés (24m). **n)** Expression génique de marqueurs du cycle cellulaire chez des animaux p16^{LUC+/+} adultes (blanc), âgés (gris) ou p16^{LUC+/-} adultes (blanc hachures vertes) ou âgés (gris hachures vertes). **o)** Masse corporelle des souris p16^{LUC+/+} et p16^{LUC+/-} selon l'âge. **p)** Rapport masse TAB viscéral/masse du corps ou **q)** masse du TAB sous-cutané/masse du corps de ces souris. **r)** Aire moyenne en μm^2 des adipocytes du TAB viscéral selon l'âge et le génotype. **s)** Marquage à l'huile rouge de FSV de TAB provenant de souris p16^{LUC+/+}, p16^{LUC+/-}, p16^{LUC-/-} après 3 jours de différenciation, ainsi que la mesure de la DO correspondante à 540nm (gauche).

B. Caractérisation du sécrétome de l'adipocyte sénescant : rôle et régulation de l'Haptoglobine dans la perte de fonction de l'adipocyte liée à l'âge

1/ L'haptoglobine est produite et sécrétée par l'adipocyte sénescant.

Une analyse protéomique différentielle sur du sang de souris jeunes (3m), adultes (12m) et âgées (24m) a été effectuée. Parmi les protéines régulées dans le sang au cours du vieillissement, 28 sont diminuées entre 3 et 24 mois, 10 entre 12 et 24 mois et 7 entre 3 et 12 mois (**Fig. 3a**). Concernant les protéines augmentées au cours du vieillissement, 16 le sont entre 3 et 24 mois, 8 entre 12 et 24 mois et 9 entre 3 et 12 mois (**Fig. 3a**). Cependant, aucune protéine n'étant retrouvée significativement augmentée ou diminuée de manière linéaire entre 3, 12 et 24 mois, une analyse plus approfondie de la littérature a été nécessaire afin de sélectionner les protéines intéressantes qui peuvent intervenir dans l'altération du métabolisme avec l'âge. Pour cela nous avons sélectionné les protéines variant de manière significative entre 3 et 24 mois et 3 et 12 mois. Ces variations sont particulièrement intéressantes car elles permettraient d'expliquer en partie certains changements de la physiologie de l'adipocyte s'opérant à partir de 12 mois comme démontré dans la Partie I des résultats. Une analyse de l'expression génique des 15 protéines sélectionnées a été faite dans le TAB d'animaux âgés de 12 et 24 mois et montre que la Teneurine (Tenm3), la protéine s100a4 et l'haptoglobine (HP) sont augmentées et que Aldh1l1 est diminuée tant dans le plasma que dans le TAB entier viscéral avec l'âge (**Fig. 3b**). De plus, ces variations similaires entre le plasma et le TAB viscéral semblent être spécifiques puisque aucune variation n'est observée dans le TAB sous-cutané (**Fig. 3c**). Par ailleurs, seules Tenm3, s100a4 et l'HP sont retrouvées augmentées dans les adipocytes viscéraux de souris âgées (**Fig. 3d**). Ces variations semblent spécifiques des adipocytes isolés viscéraux car elles ne sont retrouvées ni dans la FSV de ce même tissu (**Fig. 3e**), ni dans les adipocytes (**Fig. 3f**) ou la FSV (**Fig. 3g**) du TAB sous cutané. Suite à une analyse approfondie de la littérature nous avons décidé de nous intéresser plus particulièrement à l'haptoglobine (Hp). Ainsi, nous avons observé que l'expression protéique de l'Hp dans le TAB viscéral était augmentée chez la souris âgée (**Fig. 3h**).

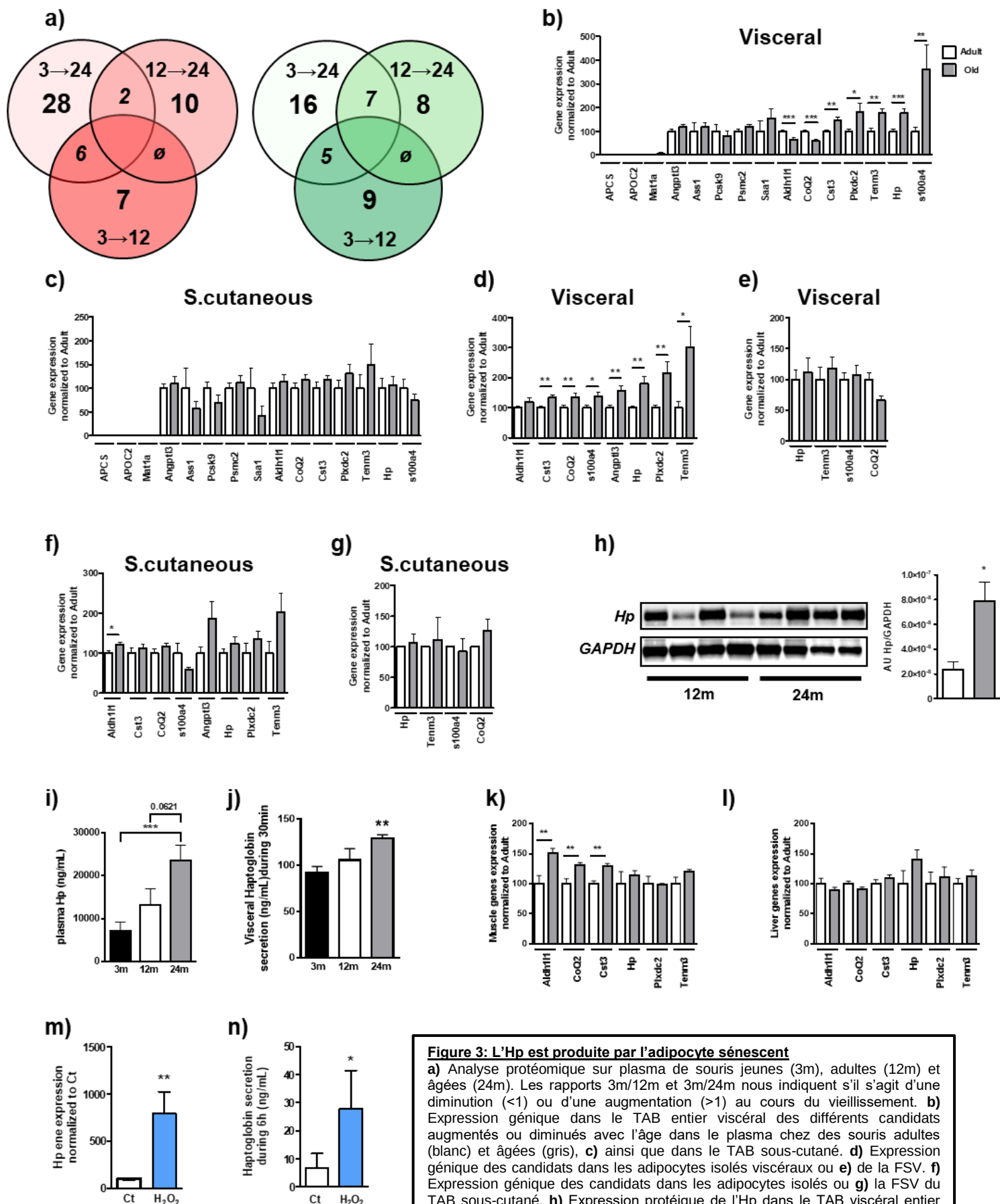


Figure 3: L'Hp est produite par l'adipocyte sénescent

a) Analyse protéomique sur plasma de souris jeunes (3m), adultes (12m) et âgées (24m). Les rapports 3m/12m et 3m/24m nous indiquent s'il s'agit d'une diminution (<1) ou d'une augmentation (>1) au cours du vieillissement. **b)** Expression génique dans le TAB entier viscéral des différents candidats augmentés ou diminués avec l'âge dans le TAB viscéral chez des souris adultes (blanc) et âgées (gris), **c)** ainsi que dans le TAB sous-cutané. **d)** Expression génique des candidats dans les adipocytes isolés viscéraux ou **e)** de la FSV. **f)** Expression génique des candidats dans les adipocytes isolés ou **g)** la FSV du TAB sous-cutané. **h)** Expression protéique de l'Hp dans le TAB viscéral entier avec l'âge, normalisée par l'expression de la GAPDH. **i)** Concentration plasmatique d'Hp en ng/mL selon l'âge : 3m (noir), 12m (blanc) et 24m (gris). **j)** Concentration d'Hp sécrétée pendant 30min par le TAB viscéral de souris à différents âges **k)** Expression génique des candidats sélectionnés en protéomique dans le muscle et **l)** dans le foie. **m)** Expression génique de l'Hp et **n)** concentration d'Hp sécrétée par des 3T3F442A différenciés traitées à l'H₂O₂ pendant 2h.

De même, une élévation de l'Hp plasmatique chez des souris âgées est observée (**Fig. 3i**), et semble être associée à une augmentation de la sécrétion de l'Hp par le TAB viscéral avec l'âge (**Fig. 3j**). En effet, lors d'expériences visant à doser la production d'Hp dans le milieu conditionné d'explants de TAB viscéral de souris, nous avons pu voir que le vieillissement entraînait une sécrétion accrue de la protéine par ce TAB (**Fig. 3j**). D'autres expériences sont à mener mais il semble que cette augmentation soit spécifique du TAB comme le démontre les résultats présentés dans les **Fig. 3g** et **3h** où aucune variation génique de l'Hp n'est observée dans le muscle squelettique (**Fig. 3k**) ou dans le foie (**Fig. 3l**). Afin de confirmer définitivement le lien entre senescence de l'adipocyte et haptoglobine, nous avons pu observer une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'Hp dans notre modèle cellulaire d'adipocytes sénescents (3T3F442A différenciées traitées avec de l'H₂O₂) (**Fig. 3m** et **Fig. 3n**).

2/ Rôle autocrine de l'Hp *in vitro* et *in vivo*

Afin de déterminer le rôle de l'Hp sécrétée par les adipocytes sénescents au cours du vieillissement, nous avons traité des adipocytes différenciés provenant de FSV murine ou humaine avec de l'Hp à différentes doses (500 nM et 1 µM) pendant 3 jours après différenciation (Cf. protocole **Fig. 4a**). Une diminution du nombre de gouttelettes lipidiques est observée suite au traitement dans les adipocytes murins (**Fig. 4b**) et humains (**Fig. 4c**). Afin d'expliquer ce résultat, nous avons pu déterminer que le traitement de 3 jours à l'Hp augmentait la lipolyse basale (**Fig. 4d**). De plus, le traitement a induit une perte des capacités à lipolyser suite à une stimulation à l'isoprénaline chez la souris ou chez l'Homme (**Fig. 4d et 4e**). Un effet prolipolytique de l'Hp entraînant une délipidation des adipocytes, il est alors possible qu'un seuil maximum de lipolyse soit atteint sans pour autant attribuer un effet direct de l'Hp sur la sensibilité des adipocytes à l'isoprénaline. De même, la perte des capacités de l'insuline à médier le transport de glucose sur les cellules traitées pourrait être associé à une augmentation de la lipolyse plutôt qu'à un effet direct du traitement sur la voie de signalisation de l'insuline (**Fig. 4f et 4g**). Afin de savoir si l'Hp pouvait jouer un rôle direct sur les fonctions métaboliques de l'adipocyte, nous avons traité des adipocytes isolés murins avant de mesurer la lipolyse (**Fig. 4h**) et le transport de glucose (**Fig. 4i**). Les résultats montrent qu'au cours d'un traitement aigu, l'Hp induit une augmentation de la lipolyse basale et une résistance à l'insuline sans modifier la lipolyse stimulée par l'isoprénaline (**Fig. 4h**). Ce résultat, associé à la diminution de la phosphorylation d'Akt (**Fig. 4j**), suggère que l'Hp possède un rôle sur les voies métaboliques de l'adipocyte.

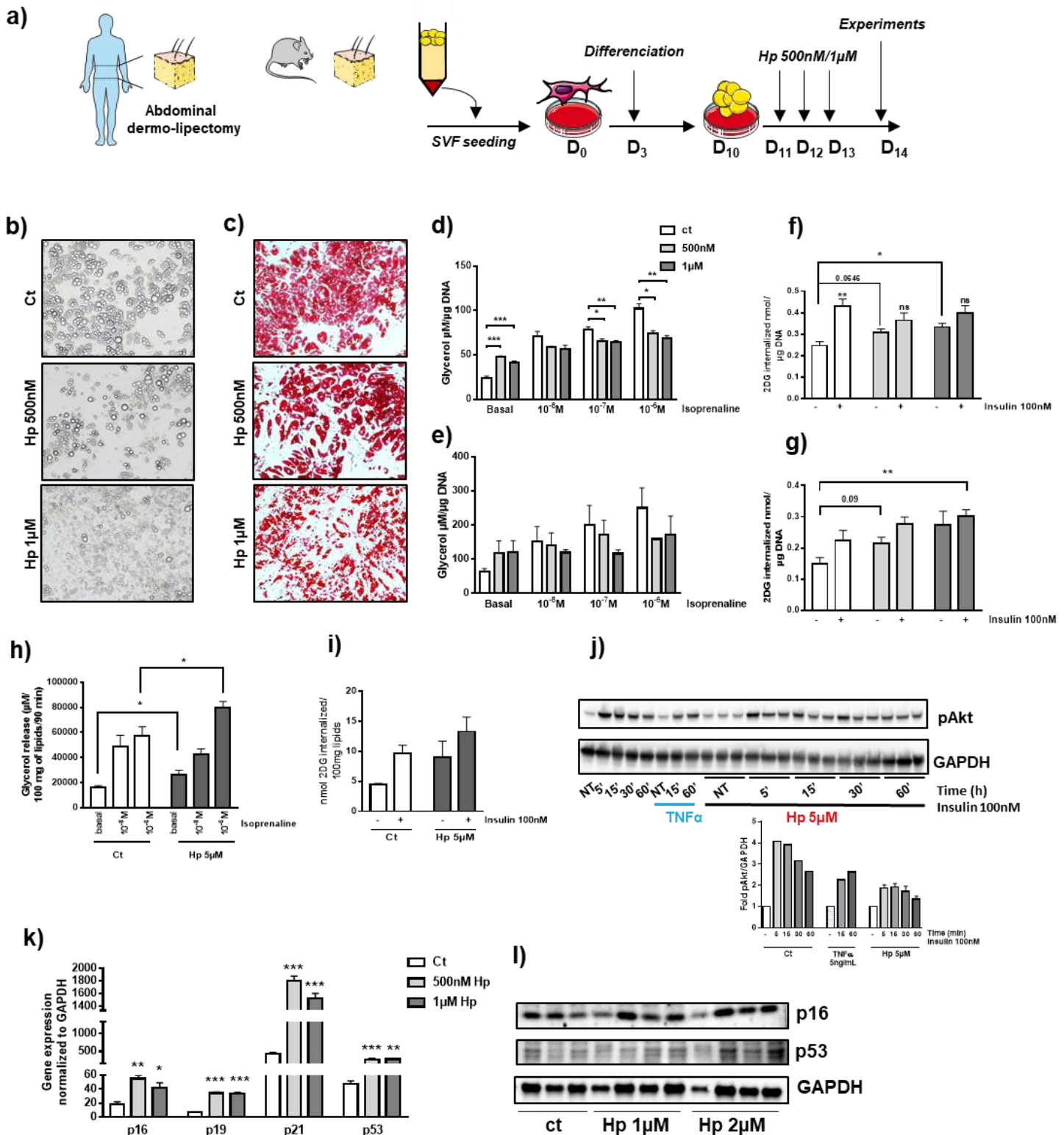


Figure 4: Rôle *in vitro* de l'Hp

a) Protocole de mise en culture et différenciation de la FSV (SVF) de souris adulte ou de dermo-lipectomie humaine, traitée trois jours consécutifs avec de l'Hp à 500nM ou 1µM. **b)** Photo en microscopie optique (x20) des FSV différenciées après traitement provenant de souris. **c)** Marquage à l'huile rouge de cellules issues de la FSV différenciées provenant de dermo-lipectomie abdominale humaine après trois jours de traitement à l'Hp. **d)** Mesure du glycérol produit par les cellules après traitement à l'Hp, non stimulées (basal) ou stimulées à différentes doses d'isoprénaline, chez la souris ou **e)** chez l'Homme. **f)** 2DG incorporé après traitement à l'Hp dans les FSV murines ou **g)** humaines non stimulées (-) ou stimulées (+) par 100nM d'insuline. **h)** Mesure du glycérol produit par les adipocytes isolés de souris de 12m non stimulé (basal) ou stimulés à différentes doses d'isoprénaline dans le TAB viscéral, prétraités avec de l'Hp à 5µM. **i)** 2DG incorporé dans les adipocytes isolés de souris de 12m non stimulé (basal) ou stimulés à 100nM d'insuline (insulin) dans le TAB viscéral prétraités avec de l'Hp à 5µM. **j)** Expression protéique de phospho-Akt (pAkt) suite à une cinétique de traitement par l'insuline sur des 3T3F442A différenciées et traitées par de l'Hp à 5µM pendant 3h, ou par du TNFα à 5ng/mL pendant 3h. En dessous, la quantification par rapport à la GAPDH. **k)** Expression génique de marqueurs du cycle cellulaire en fonction des traitements à l'Hp sur de la FSV de souris différenciée en adipocytes. **l)** Expression protéique de p16 et p53 sur 3T3F442A traitées pendant 3 jours à 1µM ou 2µM d'Hp.

Enfin, afin de mieux appréhender par quels mécanismes l'Hp pouvait agir sur l'adipocyte au cours du vieillissement, nous avons traité des FSV de souris différenciées en adipocytes issus de culture primaire pendant 3 jours et nous avons pu voir que l'Hp induisait une augmentation de la sénescence (**Fig. 4k**) mais également sur 3T3F442A différenciées traitées pendant 3 jours à 1 μ M ou 2 μ M d'Hp (**Fig. 4l**). L'ensemble de ces résultats préliminaires suggèrent que l'Hp, produite par l'adipocyte au cours du vieillissement, pourrait agir en augmentant la lipolyse et en altérant les voies de signalisation de l'insuline ce qui aurait pour conséquence une délipidation des cellules adipeuses observées chez la personne âgée.

Afin de confirmer cette hypothèse *in vivo*, nous avons procédé à un traitement chronique à l'Hp par implantation de mini-pompes osmotiques chez la souris jeune (3 mois) dans un premier temps (protocole **Fig. 5a**). La dose utilisée permet de mimer une augmentation physiologique de l'Hp plasmatique comparable à celle observée chez la souris de 12 mois (**Fig. 5b**). Cette augmentation d'Hp systémique est suffisante pour diminuer la masse du TAB (**Fig. 5c**) sans affecter la masse maigre (**Fig. 5d**). Cette diminution semble être due au TAB sous cutané puisque seul ce tissu présente une diminution de sa masse après euthanasie des animaux (**Fig. 5e**). Cependant, il est important de noter que les souris traitées par l'Hp présentent une sénescence du TAB viscéral (**Fig. 5f**) associé à un profil inflammatoire plus élevé que les souris traitées par du PBS (**Fig. 5g**). De façon surprenante, ces altérations semblent ne pas affecter le TAB sous-cutané (**Fig. 5h** et **5i**). Associé à cet état de sénescence du TAB viscéral, des variations de la LHS et de Glut4 (**Fig. 5j**) sont observées suggérant que le traitement avec de l'Hp permet de modifier les fonctions métaboliques associées à un état de sénescence. Comme précédemment, ces modifications de l'expression de gènes du métabolisme ne semblent pas affecter le TAB sous-cutané (**Fig. 5k**). De manière non attendue, la sénescence et les modifications de l'expression de gènes du métabolisme induites par l'Hp ne sont pas associées à une diminution de l'aire adipocytaire viscérale observée au cours d'un vieillissement physiologique (**Fig. 5l**) bien qu'une fibrose, à confirmer par des expériences complémentaires, semble s'installer (**Fig. 5m**). Ces expériences de mise au point chez l'animal nous ont permis de déterminer la dose d'Hp à administrer et d'observer les premiers effets délétères de celle-ci chez une souris jeune.

D'autres expériences sont actuellement en cours afin de déterminer les effets métaboliques d'une augmentation de l'Hp plasmatique chez la souris plus âgée (12 mois) qui présente un métabolisme fragile comparativement à la souris plus jeune. Ainsi, il serait intéressant de savoir si une élévation de l'Hp sanguine pourrait participer à l'altération des fonctions métaboliques adipocytaires chez la souris. D'un autre côté, d'autres expériences vont

permettre de cibler directement une augmentation de l'Hp adipocytaire (AAV-Ap2-Hp) afin de déterminer la part de responsabilité de l'Hp issue de l'adipocyte dans les altérations métaboliques liées à l'âge.

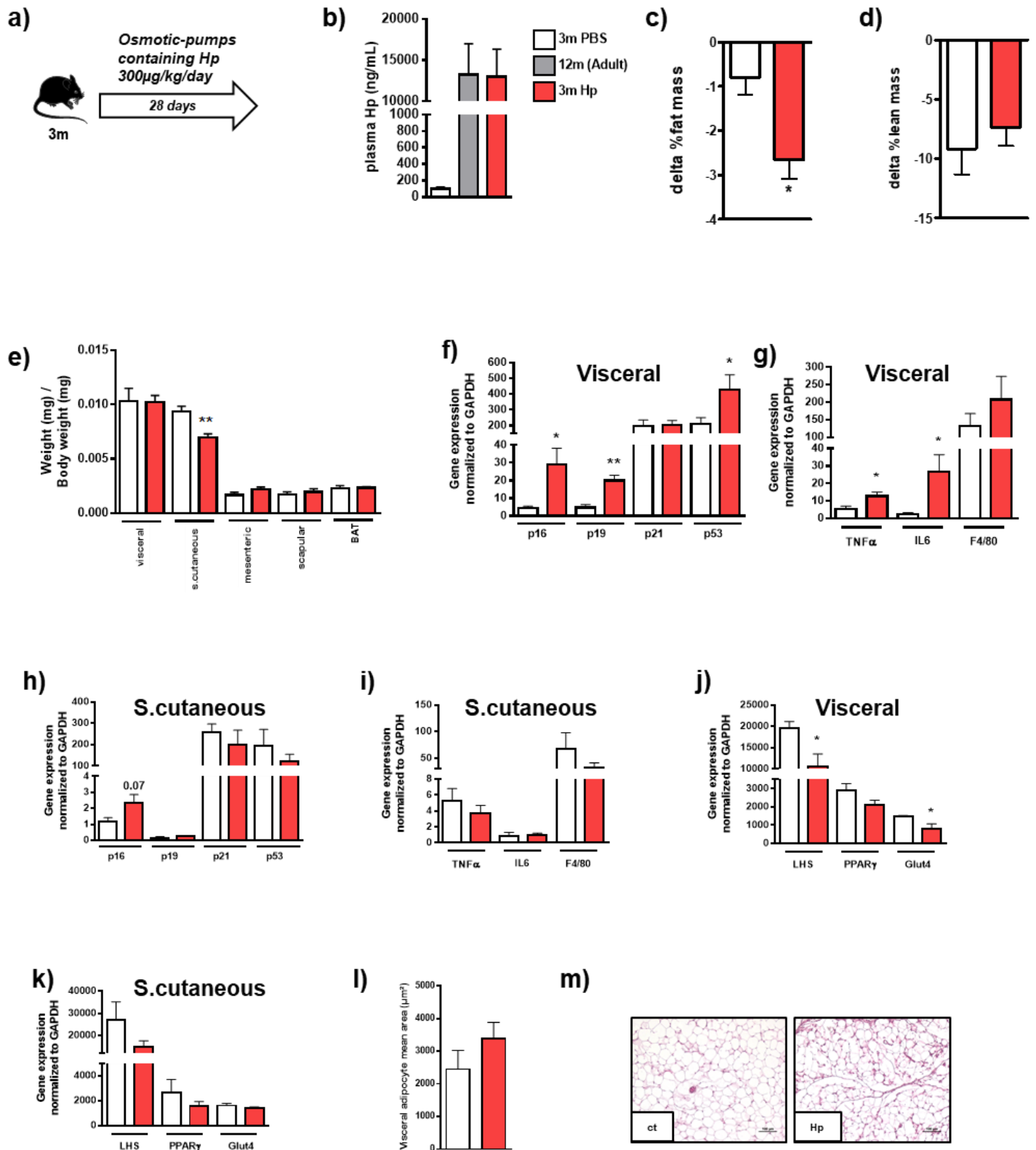


Figure 5: Rôle in vivo de l'Hp

a) Traitement chronique à l'Hp durant 28 jours par implantation de mini-pompes osmotiques délivrant 300μg/kg/jour chez la souris de 3mois. **b)** Concentration d'Hp plasmatique chez les souris de 3 mois traitées PBS (blanc), adultes (12 mois) non traitées (gris) et de 3 mois traitées par de l'Hp (rouge). **c)** Pourcentage de masse grasse et **d)** de masse musculaire perdus au cours de ce protocole. **e)** Rapport de masse des différents TAB et tissu adipeux brun (BAT) lors du sacrifice des animaux. **f)** Expression génique de marqueurs de sénescence et **g)** d'inflammation dans le TAB viscéral. **h)** Expression génique de marqueurs de sénescence et **i)** d'inflammation dans le TAB sous-cutané. **j)** Expression génique de gènes du métabolisme dans le TAB viscéral et **k)** sous-cutané. **l)** Aire adipocytaire moyenne en μm² obtenue sur TAB viscéral **m)** après un marquage Hemalun-Eosine.

Matériels et Méthodes

Animaux

Les souris sont hébergées en accord avec les principes et directives de l'institut médical de la recherche. Les souris wild-type (WT) C57 Black 6/J de 3 12 et 24 mois sont fournies par le Laboratoire Janvier (St-Berthevin, France). Les souris hétérozygotes en p16 (p16^{LUC+/-}) ont été générées comme précédemment décrit (Burd et al., 2013) et croisées avec des C57Bl6/J plusieurs fois. Les animaux sont hébergés dans une salle à température (20-22°C) et humidité (50-60%) constantes avec un cycle jour-nuit de 12/12h et un accès libre à l'eau et la nourriture. Au cours des différents protocoles, les souris ont été exclues si elles mouraient prématurément ou si elles présenteraient des tumeurs après la nécropsie. Toutes les souris ont été euthanasiées dans un état nourri par luxation des vertèbres cervicales. Lors du prélèvement des organes, deux TAB sont particulièrement étudiés : le TAB viscéral, correspondant au périgonadique et le TAB sous-cutané correspondant à l'inguinal.

Implantation mini-pompes

Les souris de 3mois ont été anesthésiées avec de l'isoflurane, ouverte au niveau de la peau et du péritoine afin d'implanter des mini-pompes osmotiques Alzet® (modèle 1004) à débit constant (0,1µL/h) pendant 28jours. Ces mini-pompes contiennent 0,25µg/µL d'Hp. Les souris sont ensuite refermées avec du fil résorbable. Afin de vérifier le bon fonctionnement des pompes osmotiques, une vérification d'absence de liquide dans les pompes a été effectué lors du sacrifice des souris.

IVIS® Spectrum In Vivo Imaging System

Des souris anesthésiées à l'isoflurane ont été injectées par voie intrapéritonéale avec un substrat de D-luciférine (Xenolight D-Luciferin 122799 Perkin; 15 mg/ml dans du PBS) à la dose de 150 µg/g de masse corporelle. Les images de bioluminescence ont été capturées par un système d'imagerie in vivo de PerkinElmer (IVIS). Pour chaque souris, les images ont été prises 8-12 min après l'injection du substrat. Suite à une dislocation cervicale nous avons prélevé certains organes et analysé la luminescence de ceux-ci. Le spectre et la bioluminescence totale ont été analysés à l'aide du logiciel Living Image. Un objectif grand angle a été utilisé pour capturer simultanément des images de plus de 3 animaux. Les images ont été prises en utilisant un binning de 4 (medium). La sortie visuelle représente le nombre de photons émis par seconde par cm² comme une image en fausses couleurs où le maximum est rouge et le minimum est le bleu foncé.

Composition de masse grasse

Pour déterminer la masse grasse, les souris ont été placées dans un support en plastique transparent, sans anesthésie ni sédation, et ont été insérées dans le système EchoMRI-3-in-1 (Echo Medical Systems, Houston, TX).

Culture FSV souris et Homme

Toutes les manipulations suivantes sont effectuées en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire et à l'aide de matériel stérilisé (pince, ciseaux) ou à usage unique (filtre 70µm). Les DLA sont obtenues grâce à une collaboration avec le CHU Rangueil. Les prélèvements sélectionnés proviennent généralement de femmes d'environ 40ans, de BMI 24 à 30, opérées suite à une dermo-lipectomie abdominale (DLA). Le lambeau est disséqué sous hotte afin de récupérer les lobules de tissu adipeux. Pour la souris, après dislocation cervicale, celle-ci est imbibée d'alcool puis ouverte sous la hotte afin de prélever les tissus adipeux. Celui-ci sera d'abord émincé puis digéré dans un v/v de Collagénase A à 1mg/mL 2%BSA (Roche® 10103586001) sous agitation à 37°C pendant environ 45minutes à 1h. Une première filtration sur un montage filtre sur seringue permet d'éliminer les tissus fibreux. Le digestat est faiblement et rapidement centrifugé à température ambiante afin d'éliminer les adipocytes flottants à la surface. Une seconde filtration sur tamis 70µm est effectuée. La FSV est lavée deux fois avec du milieu de culture DMEM F12 (Gibco® 31330095) 10% sérum de veau fœtal (SVF Gibco 10270106) et 1% pénicilline/streptomycine (P/S Sigma P0781). Les érythrocytes sont éliminés avec un tampon de lyse érythrocytaire. Les cellules sontensemencées à 20000cellules/cm² avec un cocktail de gentamycine à 50µg/mL (Gibco 15750060) et Fungizone® à 2,5µg/mL (Amphotéricine B Gibco 15290026) le premier jour. Après confluence complète, ci-suit la marche à suivre pour la différenciation en adipocyte en 9 jours:

Jours post-différenciation	Solutions	Références	Concentration finale
0 3 6 9	B/P	B4639 et P5155 Sigma	33µM et 17µM resp.
0 3 6 9	Transferrine	T3309 Sigma	0.1µg/mL
0 3 6 9	Insuline	I6634 Sigma	66nM
0 3 6 9	T3	T6397 Sigma	1nM
0 3 6 9	Cortisol	H0888 Sigma	0.1µM
0 3 6 9	Rosiglitazone	R2408 Sigma	1µM
0 3 6 9	Dexaméthasone	D4902 Sigma	1µM
0 3 6 9	IBMX	I5879 Sigma	250µM

Culture cellulaire 3T3F442A

La lignée cellulaire de préadipocytes de souris 3T3F442A utilisée dans cette étude était initialement dérivée d'un embryon de fibroblaste de souris Swiss et a été sélectionnée pour sa capacité à se différencier spontanément en adipocytes (Green and Kehinde, 1976). Les cellules ont été cultivées dans une plaque à 12 puits à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée contenant 7% de CO₂ en présence de DMEM High glucose (Sigma D6429) supplémenté avec 10% de SVF 1% P/S jusqu'à confluence complète. Dans la suite des expériences, la différenciation des préadipocytes en adipocytes a été réalisée dans du DMEM supplémenté avec 10% de SVF 1% P/S et de 50 nM d'insuline bovine (I5500 Sigma) pendant 10 jours, comme indiqué précédemment (Bétuing et al., 1997).

Traitement cellules

Une fois différenciées, les 3T3F442A ou les adipocytes provenant de culture primaires souris ou humaines, ont été traitées les trois derniers jours avec de l'Haptoglobine provenant de plasma humain (Sigma H3536), diluée dans de l'eau stérile. Pour les expériences induisant la sénescence du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été utilisé (Sigma H1009) la veille de l'arrêt des cellules sur un traitement de 2h à différentes concentrations : 0,8mM pour les 3T3F442A et 100µM pour les expériences sur des DLA.

Marquage SA-β-galactosidase (SA-β-gal) *in vitro*

Le marquage des cellules sénescents a été effectué avec le kit Senescence β-Galactosidase Staining Kit de référence 9860S du fournisseur Cell signaling (CS). Les expériences ont été effectuées selon le protocole fourni et cette étude (Itahana et al., 2013).

Expression génique

L'ARN total (500ng) a été isolé des cellules ou des différents organes en utilisant le kit de purification d'ARN GeneJet (K0732, Fermentas, Thermo Scientific) et a été transcrit de manière inverse en utilisant des hexamères aléatoires et la transcriptase inverse Superscript II (MultiScribe, Applied Biosystems). La PCR en temps réel a été réalisée comme décrit précédemment en commençant par 6,25 ng d'ADNc et les deux oligonucléotides sens et antisens dans un volume final de 10 µl dans une plaque à 384 puits en utilisant le mix PCR MesaBlue (Eurogentec). Une analyse de l'ARNm de la GAPDH a été effectuée pour normaliser l'expression des gènes.

WB

Les échantillons de tissus adipeux et de cellules ont été lysés (Precellys 24, Ozyme France) et chargés (sur un gel SDS-PAGE à 4-20%) et transférés sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare, Life Sciences, Whatman). Les membranes ont été transférées et incubées avec les anticorps GAPDH (CS no. 2118L, clone 14C10), p16 murin (Sigma), p16 humain (BD 551154), pAkt (CS Ser473 clone 193H12 no. 4058S), Akt (CS no. 9272S) Hp (HGLB11 -A ADI). Les protéines immunoréactives ont été détectées à l'aide du substrat Clarity Western ECL (BioRad) et quantifiées à l'aide du logiciel Image Lab (BioRad).

Dosages plasmatiques

L'Hp a été déterminée dans des échantillons de plasmas de souris en utilisant le kit Elisa DuoSet Haptoglobine (R&D system DY 4409-05). Une dilution au 10 000ème a été nécessaire au dosage. La densité optique a été mesurée à 450nm.

L'insuline est déterminée dans ces mêmes échantillons en utilisant le kit Elisa Mercodia (10-1247-01). Une dilution au demi a été nécessaire. La densité optique a été mesurée à 450nm. Concernant les dosages plasmatiques du cholestérol, des triglycérides et les acides gras libres ont été effectués par le plateau Phénotypage de Genotoul Anexplo à Toulouse.

Coloration Trichrome de Masson et taille adipocytaire

Les tissus adipeux ont été fixés avec une solution de formaline à 10% (Sigma HT501128) puis inclus en paraffine. Des coupes de 8µm d'épaisseur ont été effectuées puis déparaffinées puis colorées avec du Trichrome de Masson effectué par le plateau Histologie de l'I2MC (Toulouse). Un montage avec de la résine histologique Eukitt® (Sigma 03989) a été ensuite effectué. Pour une photo prise avec un microscope optique en x10, 4 champs ont été analysés indépendamment grâce à un marquage des contours des adipocytes et un calcul des aires déterminé par le logiciel Lucia G. Cette coloration nous a également permis d'analyser la fibrose.

Huile rouge

Après lavage avec du PBS, les cultures cellulaires ont été fixées pendant au moins 20min. Les cellules ont été lavées avec de l'isopropanol à 60% pendant 2 min et colorées avec une solution filtrée de 0,35% Oil Red O (Sigma O0625) dans 60% d'isopropanol pendant 10 min à température ambiante. Ensuite, les cellules ont été lavées avec de l'eau distillée. Les photos sont ensuite prises au microscope optique à grossissement x20.

Lipolyse *in vivo* et *in vitro*

Suite à la digestion du tissu adipeux, les adipocytes sont lavés deux fois avec du tampon KRBHA contenant des sels et de la BSA afin de maintenir l'intégrité des adipocytes. Ils sont ensuite incubés au $1/10^{\text{ème}}$ dans du KRBHA (point basal), ou de l'isoprotérénol (Sigma) à différentes concentrations diluées dans du KRBHA pendant 1h30 (sous agitation faible pour les adipocytes). Les suspensions adipocytaires sont arrêtées dans la glace. Pour les cellules, les cellules sont lavées une fois avec le KRBHA puis incubées avec les solutions précédentes et arrêtées de la même manière. Le dosage du glycérol est effectué sur 20 μ L de sous-nageant avec le réactif Free glycerol reagent (Sigma F6428) incubé pendant 20min à température ambiante. Le dosage s'effectue à 540nm. La normalisation pour les adipocytes isolés s'effectue sur un dosage ADN grâce au Quant-it™ (Picogreen® Thermofisher) ou un dosage des lipides par la méthode de Dole (Dole, 1956).

Transport de glucose *in vivo* et *in vitro*

Suite à la digestion du tissu adipeux, les adipocytes sont lavés deux fois avec du tampon KR complet contenant des sels et de la BSA afin de maintenir l'intégrité des adipocytes. Concernant les cellules, elles sont seulement rincées deux fois avec ce même tampon. Une pré-stimulation par de l'insuline est effectuée pendant 45minutes (sous agitation faible pour les adipocytes isolés). Une incubation de 10minutes est effectuée avec un mix de 2-déoxy-glucose (2DG) non radioactif (Sigma D8375) et de 2DG- ^3H (Perkin NEC042X250UC). Les adipocytes sont arrêtés avec de la Cytochalasine B (Sigma C6762), centrifugées faiblement dans un tube contenant de l'huile d'une densité plus faible que celle des adipocytes marqués permettant de séparer la phase aqueuse des adipocytes. Les cellules sont arrêtées grâce à une solution froide de D-glucose ((Sigma G8270) en excès dilué dans du PBS froid, et rincées au PBS froid. Les cellules sont lysées dans du NaOH 0.05N. L'emulsifiant Safe (Perkin) permet de révéler la radioactivité.

Protéomique sur plasma de souris

La concentration protéique des échantillons plasmatique est estimée à 70mg/mL, soit une quantité d'environ 1mg de protéines dans 15 μ L de chaque échantillon de plasma.

Une première étape d'ultracentrifugation du plasma est effectuée sur Vivaspinn (cutoff de 300kDa) pour éviter toute précipitation éventuelle des protéines lors de l'incubation avec les billes Proteominer. Les protéines de haut poids moléculaire du plasma (comme le facteur de coagulation = fibrinogène) ayant tendance à s'agréger sont alors éliminées lors de cette étape.

L'étape d'égalisation est effectuée avec des billes Proteominer (Biorad). Les billes Proteominer sont surchargées 20 fois. La capacité de fixation des billes étant de 10mg pour 1000µL de billes, 5µL de billes sont utilisées pour égaliser 1mg de protéines plasmatiques. Pour cela, l'échantillon est dilué dans 1mL de PBS puis mis en contact avec 5µL de billes en suspension dans du PBS. Les suspensions sont mises à incuber à 4°C durant 4h, sous agitation. Les échantillons sont centrifugés 5min à 1000g et les surnageants sont éliminés. Les billes sont lavées 3 fois avec 1mL de PBS puis centrifugées 2min à 1000g, à 4°C. Les protéines sont éluées des billes avec 40µL de Laemmli 1,5X (50mM Tris HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glycérol, 30mM DTT) et les échantillons sont ensuite chauffés à 95°C pendant 5min. Les protéines sont ensuite alkylées avec 100mM de chloroacétamide et laissées 30min à température ambiante dans l'obscurité. Les échantillons sont ensuite centrifugés 5min à 1000g et les surnageants sont récupérés et conservés à -20°C. 10µL sont ensuite déposés sur gel d'acrylamide.

Gel d'électrophorèse et traitement de l'échantillon :

- Electrophorèse 1D
- Caractéristiques du gel : Gel d'acrylamide 4 – 12%
- Type de coloration : InstantBlue (Expedon-Euromedex)

L'analyse en spectrométrie de masse se fait avec nanoESI-LC-MS/MS sur Q-Exactive Plus. La méthode d'acquisition est : Top10_HCD_G300min_Run360min. La quantification des protéines se fait avec le Logiciel MaxQuant. Après la quantification automatique par le logiciel MaxQuant, un retraitement des données brutes a été réalisé.

Pour chaque condition, la moyenne des intensités normalisées pour les triplicats d'injection a été effectuée. Ensuite, le ratio de la moyenne des intensités de la condition expérimentale / moyenne des intensités de la condition contrôle (3mois) est calculé. Afin de connaître le seuil de ratio à partir duquel une protéine est considérée comme variante dans la condition expérimentale par rapport à la condition contrôle (3mois), le $Q3+1,5*IQR$ ($Q3 = 3e\text{ quartile}$, $IQR = \text{écart interquartile}$) est calculé pour les ratios 12mois/3mois et 24mois/3mois. Un test de Student (T-test) sur les valeurs d'intensités normalisé est également réalisé afin de contrôler la significativité des données.

Une protéine est alors considérée comme surexprimée si le ratio considéré $> Q3+1,5*IQR$ et si $T\text{-test} < 0,05$ et sousexprimée si le ratio $< 1/(Q3+1,5*IQR)$ et si $T\text{-test} < 0,05$.

Cytométrie en flux et détection de la senescence

Suite à la digestion du tissu adipeux et l'isolation de la FSV, cette dernière a été mise en suspension dans du tampon FACS. Suite au blocage avec du FcBlock murin (BD 553142), une incubation à froid pendant 30min à l'obscurité a été effectuée avec les anticorps fluorescents suivants (voir liste ci-après). L'appareil BD Fortessa ainsi que le logiciel Diva8 ont été utilisés.

Antigène conjugué	Fluorophore	Clone	Source et Référence
F4/80	APC	BM8	Ozyme BLE123116 ; isotype contrôle BLE400512
CD45	BV421	30-F11	BD 563890; isotype contrôle 562603
Sca1 (Ly-6A/E)	V500	D7	BD 561229; isotype contrôle 560786
CD31	PE	MEC 13.3	BD 563616; isotype contrôle 562302

Pour mesurer la sénescence de ces différentes populations cellulaires, le kit ImaGene Green™ (Thermofisher I2904) est utilisé en amont de l'étape de fixation. Brièvement, une incubation avec un substrat de galactosidase à base de fluorescéine qui a été modifié de manière covalente pour inclure une fraction lipophile à 12 carbones, C₁₂FDG, est utilisé. Un inhibiteur (la chloroquine) est utilisé comme contrôle négatif. L'excitation se fait à 497/518 au BD Fortessa.

Liste primers qPCR Eurogentec

	Primer sens	Primer antisens
Aldh1l1	TCATGGCAACAGAAGGTTGGA	GCTAGCAGGTA CTCTGGGTT
Angptl3	ATAAACGGCAGAGCAGTCGG	AGCACCAAGAACTACTCCCC
Ap2	TTCGATGAAATCACCGCAGA	GGTCGACTTTCCATCCCCTT
APCS	TCAGATTCTCTGGGGAACACAAA	GTCATACCCTGGACCAAGCA
APOC2	TCTGTCCTAGGCCAAAGTCC	GAGAACAGGAGACTTCCAGGC
Ass1	CTCAAGGACATCTGGGCTGT	AGGCTGGGATCCTGGAAAAC
CD11b	TCGGACGAGTTCCGGATTC	TGTGATCTTGGGCTAGGGTTTC
CD11c	GATTTCAGCATCCCAGATCCC	CCAGATCCACCAGTCCATCC
CD35	GCGGGACAGGATGGAGTTC	TTCATTTTGCAACAGAGTCTGCTT
CEBPα	CGCAAGAGCCGAGATAAAGC	CGGTCATTGTCACTGGTCAACT
CoQ2	GACGAAGGACTGGAAGGTCG	GCTATTCTGATGCGTGGAGC
Cst3	GGGAGTGTGTGCCTTTCCAG	GGGCCGA ACTACATGTACCAA
F4/80	TGACAACCAGACGGCTTGTG	GCAGGCGAGGAAAAGATAGTGT
FAS	ATCCTGGAACGAGAACACGATCT	AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
Glut1	GGTGTGCAGCAGCCTGTGT	CACAGTGAAGGCCGTGTTGA
Glut4	ACCTGGTCTTGTGTGTTC	GACCCCAATGTTGTACCCAACT
HP	CAGAGCAGGAGAGTGACAACA	GGCAAGAGAGGTCCACGAT
HSL	GGCTTACTGGGCACAGATACCT	CTGAAGGCTCTGAGTTGCTCAA
IL10	AGAAGCTGAAGACCCTCAGGA	TTCACCTGCTCCACTGCC
IL6	GCCCACCAAGAACGATAGTCA	CAAGAAGGCAACTGGATGGAA
Leptine	GGGCTTCACCCCATCTGA	TGGCTATCTGCAGCACATTTTG
Mat1a	ACAGGGATGACTGCACCATT	CGGATAGCAGATCTGAGGCG
p16	CGAACTCTTTCGGTCGTACCC	TCAATCTGCACCGTAGTTGAG
p19	TTTCGTGAACATGTTGTTGAGG	CATCATCACCTGGTCCAGGA
p21	GCGCAGATCCACAGCGA	CACTTTGCTCCTGTGCGGA
p53	AGGAAGTCCTTTGCCCTGAAC	AGAGGCGCTTGTGCAGGT
Pcsk9	CTCAATCTCCCGATGGGCAC	CACCAGACAGAGGAAGACCG
Plxdc2	TCTGTGTGACCAAGACAGGG	GCTCTTGTTGTCCAGTGGGA
PPARγ	CCGAAGAACCATCCGATTGA	TTTGTGGATCCGGCAGTTAAG
Psmc2	GCTCACGAACCATTCGAGC	TAGGGCAGTTGCCAATCGGA
s100a4	TCTGGAATGCAGCTTCATCTGT	AGGCCCTGGATGTAATTGTGT
Saa1	GCCGAAGAATTCCTGAAAGGC	TGCTCGGGGGA ACTATGATG
SREBP1c	CTGGCTTGGTGATGCTATGTTG	GACCATCAAGGCCCTCAA
Tenm3	GATGTACTGCCGCTGGCTAT	AGGGGAGGATCGTATCTCGG
TGFβ	GAGCCCGAAGCGGACTACTA	CACTGCTTCCCGAATGTCTGA
TNFα	TGGGACAGTGACCTGGACTGT	TTCGGAAAGCCCATTGAGT

Conclusion et Perspectives

Partie A : Conséquences de la senescence adipocytaire sur le fonctionnement du tissu adipeux au cours du vieillissement.

1/ Modifications morphologiques et fonctionnelles des TAB avec l'âge

Comme développé dans l'introduction de ce manuscrit, l'augmentation de la masse grasse viscérale conjuguée à une diminution du TAB sous-cutané sont des événements pouvant participer aux altérations métaboliques retrouvées au cours du vieillissement comme une diminution de la sensibilité à l'insuline. Dans ce sens, des études ont montré que diminuer la masse du tissu adipeux (TAB) viscéral par restriction calorique permettait d'améliorer les paramètres métaboliques chez l'homme âgé de plus de 60 ans (Racette et al., 2006). Cependant, dans nos modèles de souris âgées de 12 et 24 mois permettant de mieux observer et analyser la précipitation vers un vieillissement pathologique, nous n'avons pas observé d'augmentation de la masse grasse ou du pourcentage de masse grasse viscérale avec l'âge (Fig. 1b et 1c). Une des explications probables réside dans l'âge des animaux étudiés. En effet, dans ces études, les auteurs comparent des souris de 6 mois et de 22 mois (Houtkooper et al., 2011) ou de 4 et de 17 mois (Lipina et al., 2016), ne correspondant pas à la transition « fragilité-dépendance » observée chez l'homme que nous étudions (12-24 mois). La modification du ratio masse grasse viscérale/sous-cutanée se ferait donc avant cette transition. Pour appuyer cette hypothèse, il a été rapporté chez l'homme entre 47 et 70 ans une légère baisse non significative de la masse graisseuse due à une diminution de la masse grasse sous-cutanée uniquement (Borkan et al., 1983). Enzi et ses collaborateurs ont d'ailleurs montré que chez des sujets jeunes de 35/40 ans le TAB est surtout localisé en position sous-cutanée puis se développerait jusqu'à l'âge de 60 ans avant de décliner au profit d'une localisation viscérale (Enzi et al., 1986). Une hypothèse avancée serait que le TAB sous-cutané perde ses capacités de prolifération, comme cela a été démontré au cours de l'obésité (Van Harmelen et al., 2004). En effet, la perte d'expansibilité du TAB sous-cutané pourrait participer à l'installation de maladies métaboliques au cours du vieillissement. Afin de vérifier cela dans nos modèles, nous avons procédé à une analyse de la fraction stromale vasculaire (FSV) des différents dépôts adipeux par cytométrie en flux (FACS). Nous avons pu voir une diminution du nombre de cellules totales de la FSV dans le TAB sous-cutané avec l'âge, correspondant à une diminution des macrophages (F4/80+) dans ce tissu, mais pas des progéniteurs (Sca1+) (Fig.30).

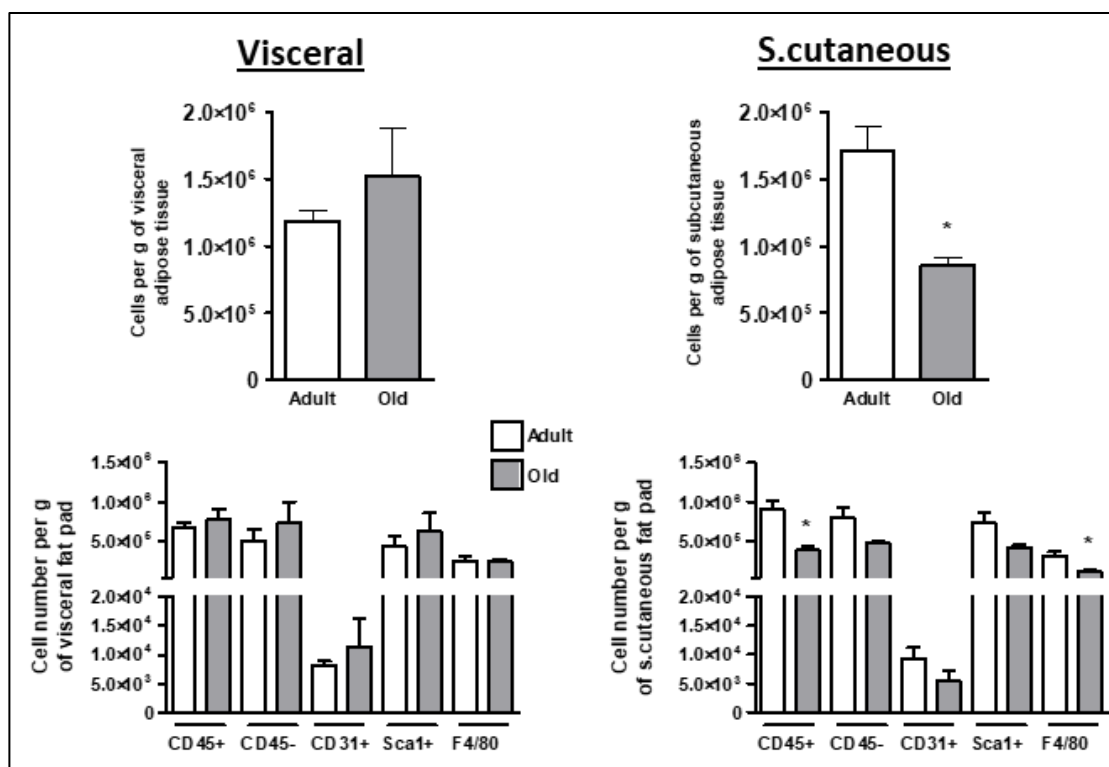


Figure 30 Composition de la FSV des TAB viscéral et sous-cutané avec l'âge

Les figures du haut correspondent au nombre de cellules composant la FSV des TAB viscéral et sous-cutané. Les panels du bas représentent le nombre de cellules dans les différentes populations cellulaires : CD45+ (cellules immunitaires totales donc les F4/80+ marquant les macrophages résidents), et les CD45- comprenant les cellules CD31+ (endothéliales), Sca1+ (progéniteurs/préadipocytes) dans les deux TAB étudiés.

Ainsi, au cours du vieillissement, le TAB sous-cutané ne semble pas perdre ses fonctions ni sa morphologie. Il pourrait donc être intéressant d'analyser si les capacités de prolifération de ces progéniteurs en culture issus de souris âgées de 12m et 24m, sont maintenues, ce qui pourrait expliquer le maintien de la morphologie du TAB sous-cutané avec l'âge. Enfin, une dernière explication résiderait en une diminution de la capacité des progéniteurs du TAB sous-cutané à se différencier (adipogénèse altérée) comme l'a montré l'équipe de Kirkland (Cartwright et al., 2007). De plus, les localisations des différents tissus « sous-cutanés » et « viscéraux » chez l'Homme et la souris diffèrent comme démontré dans l'introduction de ce manuscrit. Le fait de comparer le TAB sous-cutané avec le péri-gonadique dans notre étude devrait être complété par une analyse morphologique et métabolique des TAB rétro-péritonéal et mésentérique, connus pour être proches du TAB viscéral humain.

De manière intéressante, les adipocytes du TAB viscéral de souris âgées de 24 mois présentent une diminution de leur taille (Fig. 1d et 1e) suggérant une modification des fonctions métaboliques comme une augmentation de la lipolyse et une altération du transport de glucose ou de la lipogénèse.

Le transport de glucose ne semble pas être modifié lorsqu'il est stimulé par l'insuline (Fig. 1h). Cependant, nous pouvons observer une tendance à l'augmentation pour le transport basal de glucose dans des adipocytes viscéraux issus de la souris âgée (Fig 1h). Ceci est confirmé par une augmentation de l'expression de Glut1 dans les adipocytes viscéraux de souris âgée uniquement (Fig. 1o). Une augmentation du transport basal de glucose est une caractéristique précoce d'une altération métabolique de l'adipocyte. En effet, il a pu être montré que la présence de Glut1 à la membrane des adipocytes était souvent associée à une inflammation (TNF α) pouvant activement participer à la réduction de la sensibilité à l'insuline de ces cellules (Ruan et al., 2002). Une étude chez le rat âgé a montré que les étapes en aval du transport de glucose sont affectées comme la synthèse des triglycérides (lipogenèse de novo) aboutissant à une diminution de la taille adipocytaire (Fink et al., 1986). Prochainement, des expériences de lipogenèse seront effectuées afin de voir si une baisse de ce processus peut expliquer la taille réduite des adipocytes du TAB viscéral chez la souris âgée.

De même, la lipolyse dans les TAB n'est que peu affectée par l'âge. En effet, comme le montre la Fig. 1j, ni la lipolyse basale, ni celle stimulée par l'isoprénaline n'est affectée par le vieillissement. Ce résultat inattendu est en contradiction avec une étude effectuée chez l'Homme démontrant une diminution de la lipolyse stimulée par l'isoprénaline chez la personne âgée (Lönnqvist et al., 1992). Cependant, une autre étude a montré que la diminution de la capacité des agonistes β -adrénergiques à activer la lipolyse au cours du vieillissement serait due à une amplification de la voie α -adrénergique qui inhibe la lipolyse (Hoffman et al., 1984a). Dans nos expériences nous avons utilisé de l'isoprénaline qui est un agoniste pur β -adrénergique. L'utilisation d'un agoniste α et β comme l'épinéphrine nous permettra de conclure quant à l'importance de l'effet inhibiteur de la voie α -adrénergique avec l'âge. Deuxièmement, il a été montré que les conditions dans lesquelles la lipolyse est effectuée peut grandement affecter les résultats. En effet, il a été démontré que la lipolyse basale pouvait être triplée si celle-ci est effectuée sous agitation, ou fortement diminuée en présence d'un nombre élevé d'adipocytes (15 000cellules/mL) (Viswanadha and Londos, 2006). Dans notre laboratoire, la lipolyse a été effectuée sous agitation. Il se pourrait alors que les différences entre conditions basales et stimulées ne soient pas observables dans nos conditions.

Afin d'être dans des conditions plus physiologiques, nous avons procédé à un jeûne et une réalimentation de 24h des souris de 12 et 24 mois pour observer les capacités lipolytiques des animaux via le dosage plasmatique d'acides gras libres (FFA) ou de triglycérides à différents temps du protocole. Comme en témoignent les Fig. 1l et 1m, les souris âgées présentent un défaut de métabolisme des lipides. En effet, le taux plasmatique de FFA est diminué chez la souris âgée par rapport aux adultes après 24h de jeûne et leur

triglycéridémie est plus basse en condition nourrie. Une étude chez la souris a montré que lors d'un jeûne, la mobilisation des lipides se produit principalement dans le TAB viscéral alors qu'en période de réalimentation, le TAB sous-cutané participe en premier au captage des lipides (Tang et al., 2017). Au cours du vieillissement, cela suggère que la perte de plasticité du TAB viscéral serait la cause des altérations lipidiques observées. Une autre hypothèse serait qu'avec l'âge, il y ait une baisse des catécholamines plasmatiques (ou de sensibilité à celles-ci) pouvant expliquer la faible mobilisation des lipides lors d'un jeûne chez la souris âgée, comme le suggère une étude chez la souris (Amano et al., 2013). Par ailleurs, les souris âgées pourraient posséder une prise alimentaire diminuée au cours de la réalimentation. Enfin, avec l'âge, les souris pourraient présenter une absorption intestinale altérée comme le suggère certaines études (revue (Drozdzowski and Thomson, 2006)).

L'ensemble des résultats présenté en Fig. 1 montre que le TAB sous-cutané conserve et même améliore ses fonctions de lipolyse et de transport de glucose (Fig. 1i et 1k) avec l'âge. Il ne présente pas non plus de modification de la taille des adipocytes ni d'état inflammatoire (Fig. 1n et 1o). A l'inverse, le TAB viscéral présente une diminution de l'aire adipocytaire. Ceci suggère que le TAB sous-cutané semble conserver ses fonctions et sa morphologie au cours du vieillissement, alors que le viscéral perd sa plasticité. La restriction calorique est une stratégie qui améliore la durée de vie, le profil métabolique et inflammatoire comme décrit dans ce manuscrit (Lettieri-Barbato et al., 2016). En outre, les modifications des voies de signalisation des nutriments telles que la cible de la rapamycine (mTOR), l'insuline / IGF1 et FOXO sont responsables des effets bénéfiques de la restriction calorique chez les animaux. Une étude antérieure a indiqué que la restriction calorique excessive de plus de 45% de réduction de l'apport calorique a des effets délétères graves comme une anémie, un déficit neurologique ou encore des œdèmes des membres inférieurs. De plus, elle est associée à une réduction de la masse osseuse ainsi qu'à une diminution de la masse musculaire et de la force des membres inférieurs chez les personnes âgées (Villareal et al., 2006). Avec l'âge, les résultats obtenus montrent que le TAB viscéral perd sa plasticité suggérant qu'il n'est plus capable de s'adapter à de grands changements nutritionnels. Enfin, bien que la restriction calorique ait des effets bénéfiques sur le métabolisme, on ignore en grande partie si les avantages observés existeraient en l'absence de perte de masse corporelle chez l'Homme. Une autre approche serait le jeûne intermittent qui consiste à ne pas manger sur une période de la journée. Cette approche chez l'Homme jeune et sain, a montré une augmentation des paramètres métaboliques sans perte de masse grasse ou musculaire (Halberg et al., 2005).

2/ Lien entre sénescence et métabolisme

Un état chronique inflammatoire retrouvé dans le TAB viscéral seulement confirme notre hypothèse selon laquelle ce tissu est le siège de modifications métaboliques contribuant à sa perte de fonctions. Une explication résiderait dans l'état de sénescence de ce TAB et plus particulièrement les adipocytes (Fig. 1p), qui participe à la perte de fonction de plusieurs tissus (Baker et al., 2011). Afin de compléter cette étude nous proposons, en plus des différents marqueurs du cycle cellulaire mesurés (p16, p19, p21, p53) et des gènes pro-inflammatoires, d'analyser des cassures double brins par un marquage γ H2aX par western blot et immunohistochimie dans le TAB viscéral. Enfin, nos tissus adipeux étant inclus dans de la paraffine, une mise au point est en cours afin d'effectuer un marquage SA- β -galactosidase sur des cryo-coupes.

Les cellules de la FSV participent aussi aux altérations métaboliques au cours du vieillissement (Cartwright et al., 2007). En effet, les préadipocytes issus de TAB de souris âgées sont sénescents et participeraient aux dysfonctions du TAB (Xu et al., 2015c). Une analyse de la sénescence de la FSV totale des TAB viscéral et sous-cutané chez des souris adultes et âgées a été effectuée dans notre laboratoire. D'après nos résultats, seules les cellules endothéliales (CD31+) dans le TAB viscéral sont sénescents (non montré), comme cela a été montré au cours de l'obésité chez l'Homme, ce qui participerait aux altérations métaboliques de ce tissu (Villaret et al., 2010).

D'après nos résultats obtenus sur les cellules 3T3F442A (ou FSV différenciée humaine) traitées par le H_2O_2 , la sénescence induite par un stress oxydant entraîne des modifications métaboliques. Bien que ce traitement à H_2O_2 ne reflète pas exactement ce qu'il se passe dans le TAB viscéral de la souris âgée, ces résultats montrent une corrélation entre la modification de fonctions adipocytaires et l'état de sénescence, confirmée par les expériences avec le vénétoclax. Afin de confirmer ces résultats, des expériences sur des cellules de FSV murines différenciées en adipocytes traitées avec de H_2O_2 sont actuellement en cours. H_2O_2 est connu pour induire un stress oxydant, entraînant la sénescence. Nous proposons d'effectuer de nouvelles expériences en utilisant un modèle de sénescence répllicative comme l'irradiation afin de voir si les sénescences de type oxydative et répllicative ont le même impact sur la fonctionnalité des adipocytes. Enfin, nous proposons d'effectuer sur des cellules de FSV murines différenciées en adipocytes des expériences de transfection avec des siARN p16 (ou autre acteur du cycle cellulaire) et de les traiter avec un inducteur de sénescence (H_2O_2 ou irradiation) afin de confirmer le lien direct entre sénescence et altérations métaboliques. Actuellement dans notre laboratoire, nous mettons au point une nouvelle méthode de culture d'adipocytes *in vitro* qui permet de s'affranchir des autres types cellulaires potentiellement présents dans les cultures de FSV de TAB de souris

et également de travailler sur des adipocytes matures n'ayant pas subi les contraintes de la culture cellulaire.

Afin d'analyser le lien entre sénescence et perte de plasticité du TAB au cours du vieillissement, nous avons analysé des souris hétérozygotes pour $p16^{INK4A}$ ($p16^{LUC+/-}$) adultes et âgées. Dans notre modèle murin $p16^{LUC+/-}$ on observe une augmentation de l'aire des adipocytes viscéraux confirmant le lien entre sénescence et perte de plasticité du TAB. La fonctionnalité des adipocytes de ces souris âgées est en cours d'analyse.

De manière surprenante, les souris $p16^{LUC+/-}$ adultes ou âgées présentent une intolérance au glucose par rapport aux souris sauvages du même âge (non montré). De plus, l'insulinémie des souris $p16^{LUC+/-}$ de 24 mois est diminuée comparée aux 24 mois WT après 12h de jeûne (non montré). Dans la littérature, une étude a montré que $p16^{INK4A}$ était nécessaire à la sécrétion de l'insuline au niveau du pancréas (Helman et al., 2016), expliquant un taux d'insuline plus bas chez les $p16^{LUC+/-}$ par rapport aux WT. Etant donné l'importance de $p16^{INK4A}$ dans la sécrétion de l'insuline à un jeune âge, il faudrait étudier l'impact de la perte de $p16^{INK4A}$ uniquement dans le tissu adipeux, afin de voir si en prévenant la sénescence dans les adipocytes il serait possible de conserver les fonctions métaboliques. Pour cela un KO conditionnel de $p16^{INK4A}$ existe ($p16^{flox/flox}$) (Qiu et al., 2011). Notre laboratoire dispose de souris AdipoCre-ERT2 permettant l'expression de la Cre recombinase spécifiquement dans les adipocytes, il serait donc intéressant d'explorer cette piste.

3/ Mécanismes d'action de p16 dans l'adipocyte au cours du vieillissement

Dans l'adipocyte, il est connu que l'insuline active le complexe cycline D3-CDK4 qui phosphoryle ultérieurement IRS2. Cela génère une boucle de rétroaction positive avec CDK4 qui activerait à son tour la voie de l'insuline (Lagarrigue et al., 2016). CDK4 est une CDK inhibée par $p16^{INK4A}$. Dans nos souris âgées ou notre modèle cellulaire de sénescence, l'activation de $p16^{INK4A}$ entraînerait une diminution de CDK4 ce qui diminuerait la voie de l'insuline. Des résultats préliminaires *in vitro* nous encouragent dans cette voie avec une diminution de la phosphorylation d'Akt des 3T3F442A différenciées sénescents lors d'une stimulation à l'insuline. Dans la même étude, Lagarrigue et ses collaborateurs ont montré que les souris déficientes en CDK4 présentaient une lipogenèse diminuée et une lipolyse accrue dans le tissu adipeux blanc, confirmant le fait que $p16^{INK4A}$ participe aux altérations morphologiques et fonctionnelles du TAB viscéral, via sans doute CDK4.

Par ailleurs, Abella et ses collaborateurs ont montré que CDK4 promeut l'adipogénèse en activant PPAR γ (Abella et al., 2005). Au cours du vieillissement, l'expression de p16^{INK4A} augmente dans l'adipocyte et inhiberait CDK4 ce qui diminuerait PPAR γ et aurait pour conséquence de diminuer l'adipogénèse et de participer à la taille plus petite des adipocytes viscéraux de souris âgées. Or, PPAR γ augmente dans le TAB viscéral de souris âgées (Fig. 1n et 1o). Une seconde hypothèse serait que PPAR γ active l'expression génique de p16^{INK4A} au cours du vieillissement. En effet, Gan et ses collaborateurs ont montré sur des fibroblastes diploïdes humains que p16 possède un site de liaison à PPAR γ sur son promoteur (PPRE) (Gan et al., 2008). Suite à un traitement à la troglitazone, un agoniste PPAR γ , les cellules WI-38 deviennent sénescents et ce, de manière dépendante de PPAR γ . Cette boucle d'amplification de la sénescence menée par PPAR γ et p16^{INK4A} pourrait être testée dans notre laboratoire. En effet, des expériences sur des FSV différenciées en adipocytes transfectés avec un siARN p16 puis traitées avec un agoniste PPAR γ pourrait confirmer si ce mécanisme existe également sur des adipocytes.

Partie B : Caractérisation du sécrétome de l'adipocyte sénescents : rôle et régulation de l'Haptoglobine dans la modification de l'adipocyte liée à l'âge

1/ Lien entre Hp et sénescence

Afin d'identifier de nouvelles cibles permettant d'expliquer les altérations métaboliques au cours du vieillissement, nous avons dans un premier temps pratiqué une étude globale protéomique sur le sang de souris âgées. La comparaison des profils protéomiques de souris de 3, 12 et 24 mois ne nous a pas permis d'observer de variation (augmentation ou diminution) linéaire d'une protéine en fonction de l'âge. En conséquence, nous avons étudié les protéines qui variaient de la même façon entre 3 et 12 mois et entre 3 et 24 mois. Cette analyse nous paraît plus pertinente car elle permettrait d'identifier des molécules pouvant mieux expliquer les causes de dérèglements qui s'opèrent dès l'âge de 12 mois et conduisent à la perte de fonction à 24 mois. Ainsi, 20 protéines ont tout d'abord émergé de cette analyse et une étude bibliographique de chacune d'entre elles nous a conduit à n'en conserver que 15 pour le reste de l'étude. Afin de connaître celles qui pourraient potentiellement provenir du TAB, nous avons par la suite examiné leur évolution dans ce tissu au cours du vieillissement (Fig. 3b). L'haptoglobine, la teunerine-3 et la protéine S100A4 sont augmentées avec le vieillissement dans le TAB viscéral et pas sous-cutané. Cependant, seule l'haptoglobine (Hp) possède un rôle décrit dans le métabolisme de

l'adipocyte (Chiellini et al., 2004; Lisi et al., 2011). En conséquence, nous avons montré qu'au cours du vieillissement l'Hp était augmentée au niveau plasmatique (Fig. 3i) et que cette augmentation était retrouvée dans le milieu conditionné de TAB viscéral provenant de souris âgées (Fig. 3j). De plus, l'expression de l'Hp est augmentée au cours du vieillissement spécifiquement dans les adipocytes isolés (Fig. 3d). Dans un contexte autre que celui du vieillissement, Siklova-Vitkova et ses collaborateurs ont montré que l'expression et la sécrétion de l'Hp était bien spécifique des adipocytes et non pas de la FSV du TAB (Siklova-Vitkova et al., 2012). De plus, bien qu'aucune variation d'expression génique de l'Hp n'ait été relevée dans le foie et le muscle squelettique au cours du vieillissement (Fig. 3k et 3l), une analyse du sécrétome de ces tissus devra être également réalisée afin de définitivement démontrer que l'augmentation d'Hp est spécifique de l'adipocyte au cours du vieillissement. De plus, afin de montrer que c'est l'augmentation au niveau adipocytaire qui est à l'origine de l'augmentation plasmatique d'Hp au cours du vieillissement, il sera nécessaire d'envisager une approche de délétion spécifique dans l'adipocyte. Enfin, l'Hp étant une molécule régulièrement dosée en clinique, il a pu être montré qu'elle était potentiellement augmentée chez l'Homme âgé. Il serait donc intéressant de savoir, dans une nouvelle cohorte humaine, si cette augmentation peut être mise en relation avec une perte du contrôle métabolique ou des modifications du TAB. Des futurs dosages sont déjà en cours au sein de notre laboratoire.

De manière intéressante, l'augmentation de l'Hp que nous observons peut être liée à la senescence de l'adipocyte observée *in vivo*. En effet, après validation de notre modèle cellulaire de vieillissement (Fig. 2b et 2c), nous avons pu observer une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de cette protéine par les 3T3F442A (Fig 3m et 3n). Afin de conclure, il sera nécessaire de revalider cette relation tout d'abord en répétant ces expériences sur d'autres modes d'induction de la senescence (irradiation) puis en identifiant des éléments de réponses de la senescence (p16, p21, p53) sur le promoteur du gène codant pour l'Hp (immuno précipitation de chromatine). Certains résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent que des cellules murines de la FSV transfectées avec un siARN p16 présentent une diminution de l'expression de l'Hp (non montré), appuyant ce lien entre expression de p16 et Hp. Ces résultats sont à confirmer sur adipocytes différenciés transfectés avec un siARN p16, afin de s'affranchir des effets de p16^{INK4A} sur la prolifération de ces cellules. De même, des expériences sont actuellement en cours afin de démontrer qu'en diminuant la sénescence (souris p16^{LUC+/-}, cellules traitées par un siARN p16/p19/p21/ ou p53, traitement avec un sénolytique...) la production d'Hp adipocytaire serait diminuée. Enfin, une étude a montré que l'IL-6 était capable de se lier sur le promoteur de l'Hp et d'induire son expression (Oliviero and Cortese, 1989). Dans ce sens, il se pourrait que la sénescence augmente l'inflammation des adipocytes, dont l'IL-6, qui à son tour activerait

l'expression de l'Hp. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions utiliser un anticorps neutralisant anti-IL6 sur les adipocytes traités au préalable avec de l'H₂O₂.

Le résultat de ces futures expériences conjugué aux dosages effectués chez l'Homme devraient nous permettre de savoir si l'Hp peut être considérée comme un biomarqueur de la perte de contrôle métabolique adipocytaire lié à la sénescence de cette cellule.

2/ Rôle et mécanismes de l'Hp

In vitro, l'Hp altère les fonctions métaboliques des adipocytes telles que la lipolyse et le transport de glucose au niveau basal et participe à la délipidation de l'adipocyte (Fig. 4b et 4c). De manière intéressante, de très récents résultats montrent qu'un traitement à l'Hp sur des cellules de la FSV de souris différenciées en adipocytes provoque une augmentation de l'expression de la lipase hormono-sensible (LHS, impliquée dans la lipolyse) et une diminution du facteur de transcription SREBP1-c (impliqué dans la lipogenèse) (Fig 31 ci-dessous). En effet, cette régulation doit être démontrée au niveau protéique mais une augmentation de la lipolyse associée à une diminution de la lipogenèse pourrait en partie expliquer la délipidation des cellules observée en Fig. 4b. De plus, ce traitement induit une diminution de la phosphorylation d'Akt sur 3T3F442A différenciées (Fig. 4j), retrouvée également sur FSV différenciée de souris (non montré).

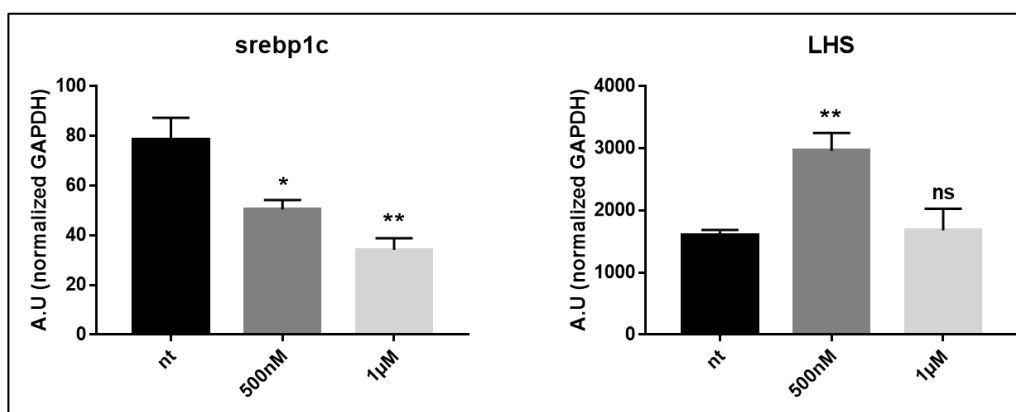


Figure 31 Expression génique de SREBP1-c et LHS après traitement chronique in vitro à l'Hp
Suite à un traitement chronique à l'Hp sur FSV différenciée en adipocytes provenant de TAB de souris adulte, les expressions géniques de SREBP1-c et la LHS sont modifiées.

L'ensemble de ces résultats indique que l'Hp pourrait jouer un rôle dans le métabolisme adipocytaire en diminuant notamment la capacité d'expansion de l'adipocyte comme observé dans le TAB au cours du vieillissement.

Une deuxième hypothèse serait que l'Hp induise ces dysfonctions métaboliques de manière indirecte, *via* l'activation de la sénescence de la cellule. En effet, l'Hp induit également une augmentation des marqueurs de la sénescence (Fig. 4k) et des résultats

préliminaires suggèrent qu'au cours d'un traitement aigu, l'Hp phosphoryle p53 induisant une activation de NF- κ B, connu pour altérer la voie de l'insuline. Afin de savoir qui de l'Hp ou de la sénescence survient en premier, nous avons initié deux protocoles sur des cellules de la FSV murine différenciées en adipocytes. Premièrement, une transfection avec un siARN dirigé contre l'Hp suivi d'un traitement à l'H₂O₂ nous permettra d'évaluer la participation de l'Hp aux modifications métaboliques associées à la sénescence. Deuxièmement, une transfection avec un siARN p16 suivi d'un traitement chronique à l'Hp nous permettra de savoir si la sénescence est nécessaire à l'effet de l'Hp sur les modifications métaboliques observées dans les adipocytes.

L'action de l'Hp dépend de différents récepteurs. En effet, la liaison de l'Hp avec CD163 a été décrite sur les macrophages pour la clairance de l'hémoglobine mais d'autres articles suggèrent qu'un autre récepteur peut lier l'Hp : CCR2 qui est surtout retrouvé sur des cellules immunes. Nous n'avons pas retrouvé d'expression de CD163 sur les adipocytes isolés murins ou les 3T3F442A mais des résultats obtenus récemment ont confirmé la présence de CCR2 sur des adipocytes murins isolés ainsi que sur les adipocytes différenciés provenant de la FSV murin du TAB. Ainsi les effets d'un traitement à l'Hp pourraient être médiés par ce récepteur. L'utilisation d'un antagoniste de CCR2 sur des cellules adipocytaires traitées à l'Hp pourrait confirmer cette hypothèse.

In vitro, l'Hp est associée à un état de sénescence, d'inflammation et de diminution de gènes du métabolisme. Les mêmes résultats ont été obtenus *in vivo* chez la souris jeune de 3 mois implantées avec des mini-pompes contenant de l'Hp (Fig. 5f, 5g et 5j). Cependant, la taille adipocytaire de ce TAB viscéral n'est pas impactée (Fig. 5h et 5i). Cette première expérience démontre que l'augmentation de l'Hp systémique n'est pas capable de reproduire ce que l'on observe au cours du vieillissement chez la souris. Par conséquent, cette expérience sera effectuée prochainement chez des souris plus fragiles de 12 voire 18 mois afin d'évaluer si une augmentation de l'Hp est capable d'accélérer le vieillissement chez ces animaux. Dans ce protocole nous étudierons également d'autres organes cibles de l'Hp tels que le muscle et le foie pouvant être impactés par l'Hp et le vieillissement (Bertaggia et al., 2014; Lisi et al., 2011). Afin d'évaluer le rôle précis de l'Hp adipocytaire nous nous proposons d'injecter un AAV-Ap2-Hp directement dans le TAB viscéral de souris de 12mois afin de déterminer la part de responsabilité de l'Hp issue de l'adipocyte dans les altérations métaboliques liées à l'âge. Des résultats préliminaires indiquent une diminution de la taille du TAB viscéral appuyant nos résultats obtenus *in vitro*.

A l'inverse, nous allons également inhiber l'expression de l'Hp dans le TAB de souris âgées de 20 ou 24 mois afin d'évaluer l'impact de la suppression de l'Hp adipocytaire au cours des modifications métaboliques associées au vieillissement. Si ces derniers résultats sont convaincants et afin de pouvoir introduire un aspect translationnel à notre étude, nous allons évaluer le potentiel thérapeutique d'anticorps bloquant dirigés contre l'Hp en ayant conscience que cette inhibition pourrait perturber également d'autres fonctions fondamentales de l'Hp (rôle de transporteur de l'hémoglobine). Afin de palier à ces éventuels problèmes, il serait alors intéressant d'analyser le glycoprotéome de l'Hp sécrétée spécifiquement par l'adipocyte au cours du vieillissement et ainsi pouvoir la cibler mais aussi la doser et la considérer comme un biomarqueur de la perte de contrôle métabolique.

Au final, quelles sont les stratégies à mettre en place chez la personne âgée pour lutter contre la perte du contrôle du métabolisme ? L'exercice physique et la restriction calorique sont deux interventions recommandées afin d'améliorer le métabolisme et diminuer l'apparition de pathologies associées au vieillissement. Cependant la difficulté d'exécution pour l'une et la possibilité de carences pour l'autre semblent être un frein à leur utilisation.

Le TAB viscéral présente de plus petits adipocytes avec l'âge. Doit-on lutter contre cette plus petite taille en ciblant des mécanismes physiopathologiques comme l'inflammation, la fibrose ou encore la sénescence ? L'utilisation de sénolytiques, permettant d'éliminer les cellules sénescents, semble prometteuse comme l'a montré l'équipe de Kirkland chez la souris (Xu et al., 2018). Cependant, leur utilisation chez la personne âgée sur le long terme pourrait être compromise du fait de la perte de capacité de régénération avec l'âge. Une autre hypothèse serait que cette petite taille adipocytaire soit un système adaptatif : l'adipocyte viscéral avec l'âge atteindrait un nouveau point d'équilibre (phénomène appelé allostasie). De ce fait, plutôt que de lutter contre un système adaptatif, il serait intéressant de cibler les conséquences de celui-ci à savoir les sécrétions de ces petits adipocytes. En conclusion, au cours de mon doctorat nous avons montré que le vieillissement entraînait une sénescence des adipocytes du TAB viscéral qui présentaient une inflammation chronique pouvant participer à des modifications métaboliques de ces cellules. Au sein des sécrétions de ces adipocytes sénescents, l'Hp est retrouvée en quantité et semble participer à cet état chronique inflammatoire du TAB et la modification de fonctions métaboliques associés à la sénescence de la cellule. L'ensemble de ces travaux permettra de mieux comprendre le rôle de l'Hp adipocytaire au cours du vieillissement sur le TAB lui-même (rôle autocrine) mais aussi sur les autres tissus impliqués dans le métabolisme comme le foie ou le muscle squelettique (rôle para/endocrine). En clinique, le dosage de l'Hp provenant du TAB viscéral pourrait permettre d'évaluer une installation de maladies métaboliques et ainsi une prise en

charge plus rapide. Enfin, l'utilisation d'un traitement ciblant l'Hp chez l'Homme fragile pourrait éviter au TAB viscéral, ainsi qu'à d'autres organes du métabolisme, de participer à la perte du contrôle du métabolisme.

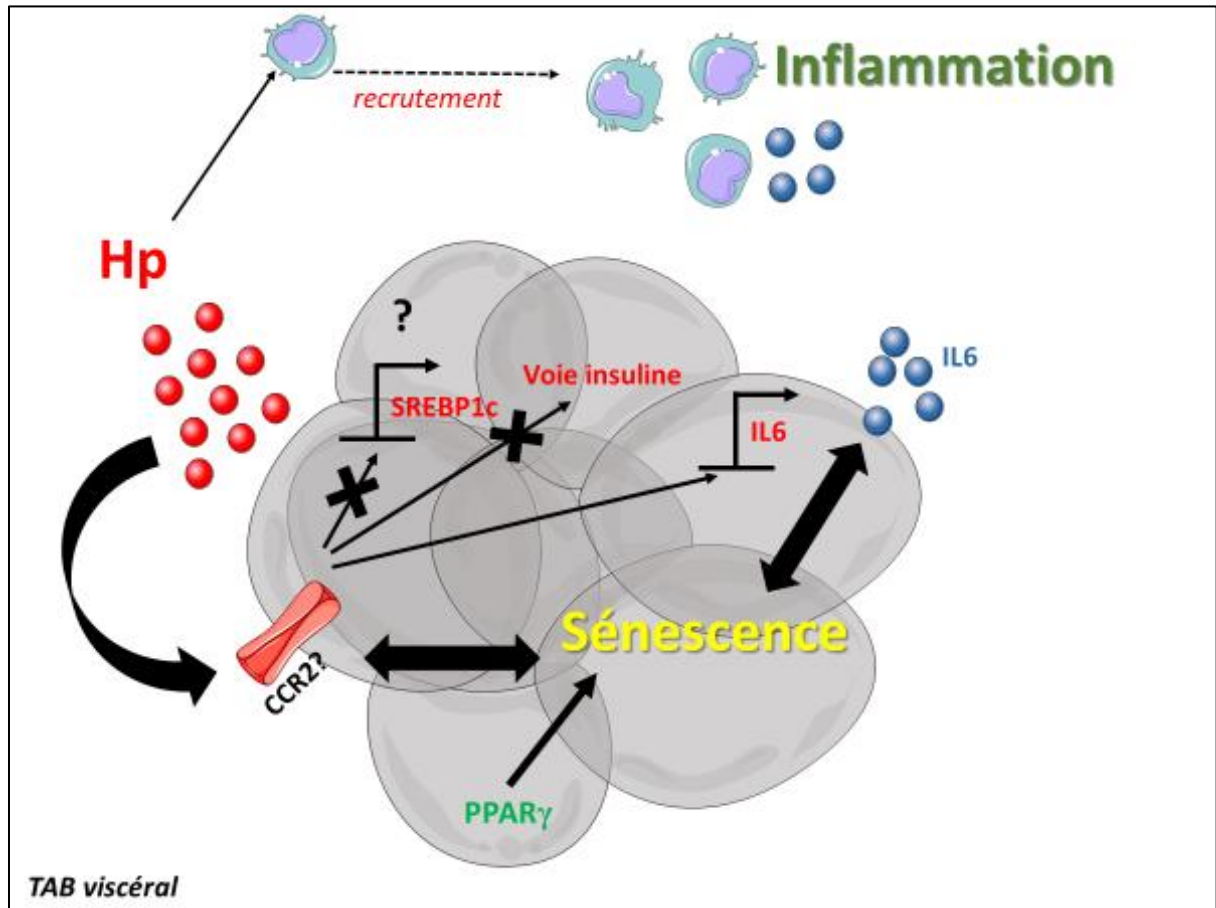


Figure 32 Rôle potentiel de l'Hp du TAB viscéral au cours du vieillissement

BIBLIOGRAPHIE

- Abella, A., Dubus, P., Malumbres, M., Rane, S.G., Kiyokawa, H., Sicard, A., Vignon, F., Langin, D., Barbacid, M., and Fajas, L. (2005). Cdk4 promotes adipogenesis through PPARgamma activation. *Cell Metab.* 2, 239–249.
- Abraham, T.M., Pedley, A., Massaro, J.M., Hoffmann, U., and Fox, C.S. (2015). Association Between Visceral and Subcutaneous Adipose Depots and Incident Cardiovascular Disease Risk Factors. *Circulation* 132, 1639–1647.
- Acosta, J.C., O’Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., et al. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 133, 1006–1018.
- Aird, K.M., and Zhang, R. (2013). Detection of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF). In *Cell Senescence: Methods and Protocols*, L. Galluzzi, I. Vitale, O. Kepp, and G. Kroemer, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 185–196.
- Aird, K.M., Iwasaki, O., Kossenkov, A.V., Tanizawa, H., Fatkhutdinov, N., Bitler, B.G., Le, L., Alicea, G., Yang, T.-L., Johnson, F.B., et al. (2016). HMGB2 orchestrates the chromatin landscape of senescence-associated secretory phenotype gene loci. *J Cell Biol* 215, 325–334.
- Ajuwon, K.M., and Spurlock, M.E. (2005). Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.* 135, 1841–1846.
- Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W., and Harley, C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10114–10118.
- Althubiti, M., Lezina, L., Carrera, S., Jukes-Jones, R., Giblett, S.M., Antonov, A., Barlev, N., Saldanha, G.S., Pritchard, C.A., Cain, K., et al. (2014). Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer. *Cell Death & Disease* 5, e1528.
- Amano, A., Tsunoda, M., Aigaki, T., Maruyama, N., and Ishigami, A. (2013). Age-related changes of dopamine, noradrenaline and adrenaline in adrenal glands of mice. *Geriatr Gerontol Int* 13, 490–496.
- Ambartsumian, N.S., Grigorian, M.S., Larsen, I.F., Karlstrøm, O., Sidenius, N., Rygaard, J., Georgiev, G., and Lukanidin, E. (1996). Metastasis of mammary carcinomas in GRS/A hybrid mice transgenic for the mts1 gene. *Oncogene* 13, 1621–1630.
- Anisimov, V.N., Bernstein, L.M., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., Semenchenko, A.V., Tyndyk, M.L., Yurova, M.N., Kovalenko, I.G., et al. (2011). If

started early in life, metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice. *Aging (Albany NY)* 3, 148–157.

Anselmi, C.V., Malovini, A., Roncarati, R., Novelli, V., Villa, F., Condorelli, G., Bellazzi, R., and Puca, A.A. (2009). Association of the FOXO3A locus with extreme longevity in a southern Italian centenarian study. *Rejuvenation Res* 12, 95–104.

Apfeld, J., O'Connor, G., McDonagh, T., DiStefano, P.S., and Curtis, R. (2004). The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev.* 18, 3004–3009.

Arner, P., Petrus, P., Esteve, D., Boulomié, A., Näslund, E., Thorell, A., Gao, H., Dahlman, I., and Rydén, M. (2018). Screening of potential adipokines identifies S100A4 as a marker of pernicious adipose tissue and insulin resistance. *International Journal of Obesity* 1.

Astle, M.V., Hannan, K.M., Ng, P.Y., Lee, R.S., George, A.J., Hsu, A.K., Haupt, Y., Hannan, R.D., and Pearson, R.B. (2012). AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* 31, 1949–1962.

Atzmon, G., Pollin, T.I., Crandall, J., Tanner, K., Schechter, C.B., Scherer, P.E., Rincon, M., Siegel, G., Katz, M., Lipton, R.B., et al. (2008). Adiponectin levels and genotype: a potential regulator of life span in humans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 63, 447–453.

B Stout, M., Tchkonina, T., Pirtskhalava, T., Palmer, A., List, E., E Berryman, D., R Lubbers, E., Escande, C., Spong, A., Masternak, M., et al. (2014). Growth hormone action predicts age-related white adipose tissue dysfunction and senescent cell burden in mice. *Aging* 6.

Baar, M.P., Brandt, R.M.C., Putavet, D.A., Klein, J.D.D., Derks, K.W.J., Bourgeois, B.R.M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D.A., et al. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* 169, 132-147.e16.

Bahar, R., Hartmann, C.H., Rodriguez, K.A., Denny, A.D., Busuttil, R.A., Dollé, M.E.T., Calder, R.B., Chisholm, G.B., Pollock, B.H., Klein, C.A., et al. (2006). Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature* 441, 1011–1014.

Bai, H., Kang, P., and Tatar, M. (2012). Drosophila insulin-like peptide-6 (dilp6) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of Drosophila insulin-like peptide-2 from the brain. *Aging Cell* 11, 978–985.

Baker, D.J., Jin, F., and van Deursen, J.M. (2008). The yin and yang of the Cdkn2a locus in senescence and aging. *Cell Cycle* 7, 2795–2802.

Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonina, 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, J.F., Newman, A.B., Kanaya, A., Leonard, M.B., Zemel, B., Miljkovic, I., Long, J., Weber, D., and Harris, T.B. (2018). The Adiponectin Paradox in the Elderly: Associations with Body Composition, Physical Functioning, and Mortality. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*

Banerjee, K.K., Ayyub, C., Ali, S.Z., Mandot, V., Prasad, N.G., and Kolthur-Seetharam, U. (2012). dSir2 in the adult fat body, but not in muscles, regulates life span in a diet-dependent manner. *Cell Rep* 2, 1485–1491.

Banin, S., Moyal, L., Shieh, S.-Y., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., et al. (1998). Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage. *Science* 281, 1674–1677.

Barradas, M., Gonos, E.S., Zebedee, Z., Kolettas, E., Petropoulou, C., Delgado, M.D., León, J., Hara, E., and Serrano, M. (2002). Identification of a Candidate Tumor-Suppressor Gene Specifically Activated during Ras-Induced Senescence. *Experimental Cell Research* 273, 127–137.

Bartke, A. (2003). Can growth hormone (GH) accelerate aging? Evidence from GH-transgenic mice. *Neuroendocrinology* 78, 210–216.

Baulieu, E.E., Thomas, G., Legrain, S., Lahlou, N., Roger, M., Debuire, B., Faucounau, V., Girard, L., Hervy, M.P., Latour, F., et al. (2000). Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4279–4284.

Baus, F., Gire, V., Fisher, D., Piette, J., and Dulić, V. (2003). Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *EMBO J* 22, 3992–4002.

Beck, K.D., Powell-Braxton, L., Widmer, H.R., Valverde, J., and Hefti, F. (1995). Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron* 14, 717–730.

van den Beld, A.W., Kaufman, J.-M., Zillikens, M.C., Lamberts, S.W.J., Egan, J.M., and van der Lely, A.J. (2018). The physiology of endocrine systems with ageing. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 6, 647–658.

Berger, F., Lau, C., Dahlmann, M., and Ziegler, M. (2005). Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J. Biol. Chem.* 280, 36334–36341.

Bergeron, R., Ren, J.M., Cadman, K.S., Moore, I.K., Perret, P., Pypaert, M., Young, L.H., Semenkovich, C.F., and Shulman, G.I. (2001). Chronic activation of AMP kinase results in

NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E1340-1346.

Berry, D.C., Jiang, Y., Arpke, R.W., Close, E.L., Uchida, A., Reading, D., Berglund, E.D., Kyba, M., and Graff, J.M. (2017). Cellular Aging Contributes to Failure of Cold-Induced Beige Adipocyte Formation in Old Mice and Humans. *Cell Metab.* 25, 166–181.

Berryman, D.E., List, E.O., Palmer, A.J., Chung, M.-Y., Wright-Piekarski, J., Lubbers, E., O'Connor, P., Okada, S., and Kopchick, J.J. (2010). Two-year body composition analyses of long-lived GHR null mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 65, 31–40.

Bertaglia, E., Scabia, G., Dalise, S., Verso, F.L., Santini, F., Vitti, P., Chisari, C., Sandri, M., and Maffei, M. (2014). Haptoglobin Is Required to Prevent Oxidative Stress and Muscle Atrophy. *PLOS ONE* 9, e100745.

Bertrand, H.A., Lynd, F.T., Masoro, E.J., and Yu, B.P. (1980). Changes in adipose mass and cellularity through the adult life of rats fed ad libitum or a life-prolonging restricted diet. *J Gerontol* 35, 827–835.

Bétuing, S., Valet, P., Lapalu, S., Peyroulan, D., Hickson, G., Daviaud, D., Lafontan, M., and Saulnier-Blache, J.S. (1997). Functional consequences of constitutively active alpha2A-adrenergic receptor expression in 3T3F442A preadipocytes and adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 765–773.

Bezlepkin, V.G., Sirota, N.P., and Gaziev, A.I. (1996). The prolongation of survival in mice by dietary antioxidants depends on their age by the start of feeding this diet. *Mechanisms of Ageing and Development* 92, 227–234.

Bik, W., Baranowska-Bik, A., Wolinska-Witort, E., Martynska, L., Chmielowska, M., Szybinska, A., Broczek, K., and Baranowska, B. (2006). The relationship between adiponectin levels and metabolic status in centenarian, early elderly, young and obese women. *Neuro Endocrinol. Lett.* 27, 493–500.

Bik, W., Baranowska-Bik, A., Wolinska-Witort, E., Kalisz, M., Broczek, K., Mossakowska, M., and Baranowska, B. (2013). Assessment of adiponectin and its isoforms in Polish centenarians. *Exp. Gerontol.* 48, 401–407.

Black, A.E., Coward, W.A., Cole, T.J., and Prentice, A.M. (1996). Human energy expenditure in affluent societies: an analysis of 574 doubly-labelled water measurements. *Eur J Clin Nutr* 50, 72–92.

Blüher, M., Michael, M.D., Peroni, O.D., Ueki, K., Carter, N., Kahn, B.B., and Kahn, C.R. (2002). Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev. Cell* 3, 25–38.

Blüher, M., Kahn, B.B., and Kahn, C.R. (2003). Extended Longevity in Mice Lacking the Insulin Receptor in Adipose Tissue. *Science* 299, 572–574.

Bonin-Guillaume, S., Herrmann, F.R., Boillat, D., Szanto, I., Michel, J.P., Rohner-Jeanrenaud, F., and Vischer, U.M. (2006). Insulinemia and leptinemia in geriatric patients: markers of the metabolic syndrome or of undernutrition? *Diabetes Metab.* 32, 236–243.

Bordone, L., Cohen, D., Robinson, A., Motta, M.C., Veen, E.V., Czopik, A., Steele, A.D., Crowe, H., Marmor, S., Luo, J., et al. (2007). SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* 6, 759–767.

Borkan, G.A., Hults, D.E., Gerzof, S.G., Robbins, A.H., and Silbert, C.K. (1983). Age changes in body composition revealed by computed tomography. *J Gerontol* 38, 673–677.

Bounder, J., Östman, J., and Arner, P. (1983). Influence of Aging on Insulin Receptor Binding and Metabolic Effects of Insulin on Human Adipose Tissue. *Diabetes* 32, 959–964.

Boxer, R.S., Kleppinger, A., Brindisi, J., Feinn, R., Bureson, J.A., and Kenny, A.M. (2010). Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on cardiovascular risk factors in older women with frailty characteristics. *Age Ageing* 39, 451–458.

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H.F.M., Schlegelberger, B., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660–665.

Bratic, A., and Larsson, N.-G. (2013). The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest* 123, 951–957.

Broers, J.L., Machiels, B.M., Kuijpers, H.J., Smedts, F., van den Kieboom, R., Raymond, Y., and Ramaekers, F.C. (1997). A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochem. Cell Biol.* 107, 505–517.

Brooks, N.L., Trent, C.M., Raetzsch, C.F., Flurkey, K., Boysen, G., Perfetti, M.T., Jeong, Y.-C., Klebanov, S., Patel, K.B., Khodush, V.R., et al. (2007). Low utilization of circulating glucose after food withdrawal in Snell dwarf mice. *J. Biol. Chem.* 282, 35069–35077.

Brown-Borg, H.M., Borg, K.E., Meliska, C.J., and Bartke, A. (1996). Dwarf mice and the ageing process. *Nature* 384, 33.

Buckwalter, M.S., Katz, R.W., and Camper, S.A. (1991). Localization of the panhypopituitary dwarf mutation (df) on mouse chromosome 11 in an intersubspecific backcross. *Genomics* 10, 515–526.

Bueno, A.A., Oyama, L.M., de Macedo Motoyama, C.S., da Silva Biz, C.R., Silveira, V.L., Ribeiro, E.B., and Oller do Nascimento, C.M. (2010). Long chain saturated fatty acids increase haptoglobin gene expression in C57BL/6J mice adipose tissue and 3T3-L1 cells. *Eur J Nutr* 49, 235–241.

Burd, C.E., Sorrentino, J.A., Clark, K.S., Darr, D.B., Krishnamurthy, J., Deal, A.M., Bardeesy, N., Castrillon, D.H., Beach, D.H., and Sharpless, N.E. (2013). Monitoring Tumorigenesis and Senescence In Vivo with a p16INK4a-Luciferase Model. *Cell* 152, 340–351.

Burnet, F.M., and Holmes, M.C. (1962). Immunological Function of Thymus and Bursa of Fabricius: Thymus Lesions in an Auto-immune Disease of Mice. *Nature* 194, 146.

Burton, G.R., Nagarajan, R., Peterson, C.A., and McGehee, R.E. (2004). Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis. *Gene* 329, 167–185.

Busciglio, J., and Yankner, B.A. (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* 378, 776–779.

Cadore, E.L., Pinto, R.S., Bottaro, M., and Izquierdo, M. (2014). Strength and endurance training prescription in healthy and frail elderly. *Aging Dis* 5, 183–195.

Calle, E.E., Thun, M.J., Petrelli, J.M., Rodriguez, C., and Heath, C.W. (1999). Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* 341, 1097–1105.

Cao, K., Graziotto, J.J., Blair, C.D., Mazzulli, J.R., Erdos, M.R., Krainc, D., and Collins, F.S. (2011). Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Sci Transl Med* 3, 89ra58.

Capell, B.C., Drake, A.M., Zhu, J., Shah, P.P., Dou, Z., Dorsey, J., Simola, D.F., Donahue, G., Sammons, M., Rai, T.S., et al. (2016). MLL1 is essential for the senescence-associated secretory phenotype. *Genes Dev.* 30, 321–336.

Cardus, A., Uryga, A.K., Walters, G., and Erusalimsky, J.D. (2013). SIRT6 protects human endothelial cells from DNA damage, telomere dysfunction, and senescence. *Cardiovasc Res* 97, 571–579.

Carraro, R., Li, Z. -h., and Gregerman, R.I. (1994). Catecholamine-Sensitive Lipolysis in the Rat: Different Loci for Effect of Age on the Lipolytic Cascade in Epididymal vs Perirenal Fat Cells. *Journal of Gerontology* 49, B140–B143.

Cartwright, M.J., Tchkonja, T., and Kirkland, J.L. (2007). Aging in adipocytes: Potential impact of inherent, depot-specific mechanisms. *Experimental Gerontology* 42, 463–471.

Caso, G., McNurlan, M.A., Mileva, I., Zemlyak, A., Mynarcik, D.C., and Gelato, M.C. (2013). Peripheral fat loss and decline in adipogenesis in older humans. *Metab. Clin. Exp.* 62, 337–340.

Celermajer, D.S., Sorensen, K.E., Spiegelhalter, D.J., Georgakopoulos, D., Robinson, J., and Deanfield, J.E. (1994). Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J. Am. Coll. Cardiol.* 24, 471–476.

Chakrabarti, P., English, T., Karki, S., Qiang, L., Tao, R., Kim, J., Luo, Z., Farmer, S.R., and Kandror, K.V. (2011). SIRT1 controls lipolysis in adipocytes via FOXO1-mediated expression of ATGL. *J. Lipid Res.* 52, 1693–1701.

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.

Chavez-Munoz, C., Nguyen, K.T., Xu, W., Hong, S.-J., Mustoe, T.A., and Galiano, R.D. (2013). Transdifferentiation of adipose-derived stem cells into keratinocyte-like cells: engineering a stratified epidermis. *PLoS ONE* 8, e80587.

Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M., and Nevins, J.R. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65, 1053–1061.

Chen, L., Li, J., Zhang, J., Dai, C., Liu, X., Wang, J., Gao, Z., Guo, H., Wang, R., Lu, S., et al. (2015). S100A4 promotes liver fibrosis via activation of hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* 62, 156–164.

Chen, Q.M., Bartholomew, J.C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J.D., and Ames, B.N. (1998). Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J* 332, 43–50.

Chiellini, C., Bertacca, A., Novelli, S.E., Görgün, C.Z., Ciccarone, A., Giordano, A., Xu, H., Soukas, A., Costa, M., Gandini, D., et al. (2002). Obesity modulates the expression of haptoglobin in the white adipose tissue via TNF α . *Journal of Cellular Physiology* 190, 251–258.

Chiellini, C., Santini, F., Marsili, A., Berti, P., Bertacca, A., Pelosini, C., Scartabelli, G., Pardini, E., López-Soriano, J., Centoni, R., et al. (2004). Serum Haptoglobin: A Novel Marker of Adiposity in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2678–2683.

Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J.E., Premssirut, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C.S., et al. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* 25, 2125–2136.

Chu, Y., Xu, Z.-G., Xu, Z., and Ma, L. (2015). Hutchinson-Gilford progeria syndrome caused by an LMNA mutation: a case report. *Pediatr Dermatol* 32, 271–275.

Cid, M.C., Grant, D.S., Hoffman, G.S., Auerbach, R., Fauci, A.S., and Kleinman, H.K. (1993). Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J Clin Invest* 91, 977–985.

Clancy, D.J., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leivers, S.J., and Partridge, L. (2001). Extension of life-span by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein. *Science* 292, 104–106.

Clarkston, W.K., Pantano, M.M., Morley, J.E., Horowitz, M., Littlefield, J.M., and Burton, F.R. (1997). Evidence for the anorexia of aging: gastrointestinal transit and hunger in healthy elderly vs. young adults. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 272, R243–R248.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.

Collerton, J., Martin-Ruiz, C., Davies, K., Hilkens, C.M., Isaacs, J., Kolenda, C., Parker, C., Dunn, M., Catt, M., Jagger, C., et al. (2012). Frailty and the role of inflammation, immunosenescence and cellular ageing in the very old: cross-sectional findings from the Newcastle 85+ Study. *Mech. Ageing Dev.* 133, 456–466.

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.

Conti, V., Corbi, G., Simeon, V., Russomanno, G., Manzo, V., Ferrara, N., and Filippelli, A. (2015). Aging-related changes in oxidative stress response of human endothelial cells. *Aging Clin Exp Res* 27, 547–553.

Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLOS Biology* 6, e301.

Coppé, J.-P., Rodier, F., Patil, C.K., Freund, A., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2011). Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J. Biol. Chem.* 286, 36396–36403.

Cornelius, E.A. (1972). Increased incidence of lymphomas in thymectomized Mice - evidence for an immunological theory of aging. *Experientia* 28, 459–459.

Coschigano, K.T., Holland, A.N., Riders, M.E., List, E.O., Flyvbjerg, A., and Kopchick, J.J. (2003). Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinology* 144, 3799–3810.

Cosgrove, B.D., Gilbert, P.M., Porpiglia, E., Mourikioti, F., Lee, S.P., Corbel, S.Y., Llewellyn, M.E., Delp, S.L., and Blau, H.M. (2014). Rejuvenation of the aged muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles. *Nat Med* 20, 255–264.

Cowell, I.G., Sunter, N.J., Singh, P.B., Austin, C.A., Durkacz, B.W., and Tilby, M.J. (2007). γ H2AX Foci Form Preferentially in Euchromatin after Ionising-Radiation. *PLOS ONE* 2, e1057.

Csiszar, A., Ungvari, Z., Edwards, J.G., Kaminski, P., Wolin, M.S., Koller, A., and Kaley, G. (2002). Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ. Res.* 90, 1159–1166.

Cunnington, M.S., Santibanez Koref, M., Mayosi, B.M., Burn, J., and Keavney, B. (2010). Chromosome 9p21 SNPs Associated with Multiple Disease Phenotypes Correlate with ANRIL Expression. *PLoS Genet* 6.

Curtin, J.F., Donovan, M., and Cotter, T.G. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods* 265, 49–72.

Daniali, L., Benetos, A., Susser, E., Kark, J.D., Labat, C., Kimura, M., Desai, K., Granick, M., and Aviv, A. (2013). Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun* 4, 1597.

Dannenberger, J.-H., Rossum, A. van, Schuijff, L., and Riele, H. te (2000). Ablation of the Retinoblastoma gene family deregulates G1 control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev.* 14, 3051–3064.

Darvin, K., Randolph, A., Ovalles, S., Halade, D., Breeding, L., Richardson, A., and Espinoza, S.E. (2014). Plasma Protein Biomarkers of the Geriatric Syndrome of Frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69A, 182–186.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231–241.

Davalos, A.R., Kawahara, M., Malhotra, G.K., Schaum, N., Huang, J., Ved, U., Beausejour, C.M., Coppe, J.-P., Rodier, F., and Campisi, J. (2013). p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *J Cell Biol* 201, 613–629.

Davies, M., Harris, S., Rudland, P., and Barraclough, R. (1995). Expression of the rat, S-100-related, calcium-binding protein gene, p9Ka, in transgenic mice demonstrates different patterns of expression between these two species. *DNA Cell Biol.* 14, 825–832.

Davies, M.P., Rudland, P.S., Robertson, L., Parry, E.W., Jolicoeur, P., and Barraclough, R. (1996). Expression of the calcium-binding protein S100A4 (p9Ka) in MMTV-neu transgenic mice induces metastasis of mammary tumours. *Oncogene* 13, 1631–1637.

Dilman, V.M. (1984). Three models of medicine: An integrated theory of aging and age-associated diseases. *Medical Hypotheses* 15, 185–208.

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.

Ding, J., and Kopchick, J.J. (2011). Plasma biomarkers of mouse aging. *Age (Dordr)* 33, 291–307.

Ding, J., Berryman, D.E., and Kopchick, J.J. (2011). Plasma proteomic profiles of bovine growth hormone transgenic mice as they age. *Transgenic Res* 20, 1305–1320.

Ding, J., Berryman, D.E., Jara, A., and Kopchick, J.J. (2012). Age- and Sex-Associated Plasma Proteomic Changes in Growth Hormone Receptor Gene–Disrupted Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67, 830–840.

Dirac, A.M.G., and Bernards, R. (2003). Reversal of Senescence in Mouse Fibroblasts through Lentiviral Suppression of p53. *J. Biol. Chem.* 278, 11731–11734.

Dmitrieva, N.I., and Burg, M.B. (2007). High NaCl Promotes Cellular Senescence. *Cell Cycle* 6, 3108–3113.

Doksani, Y., Wu, J.Y., de Lange, T., and Zhuang, X. (2013). Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation. *Cell* 155, 345–356.

Dole, V.P. (1956). A RELATION BETWEEN NON-ESTERIFIED FATTY ACIDS IN PLASMA AND THE METABOLISM OF GLUCOSE.

Donahue, L.R., and Beamer, W.G. (1993). Growth hormone deficiency in “little” mice results in aberrant body composition, reduced insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3), but does not affect IGFBP-2, -1 or -4. *J. Endocrinol.* 136, 91–104.

Donato, A.J., Eskurza, I., Silver, A.E., Levy, A.S., Pierce, G.L., Gates, P.E., and Seals, D.R. (2007). Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ. Res.* 100, 1659–1666.

Dörr, J.R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Däbritz, J.H.M., Lisec, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K., et al. (2013). Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* 501, 421–425.

Douek, D.C., McFarland, R.D., Keiser, P.H., Gage, E.A., Massey, J.M., Haynes, B.F., Polis, M.A., Haase, A.T., Feinberg, M.B., Sullivan, J.L., et al. (1998). Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396, 690–695.

Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews* 82, 47–95.

Drozdzowski, L., and Thomson, A.B. (2006). Aging and the intestine. *World J Gastroenterol* 12, 7578–7584.

Duarte, L.F., Young, A.R.J., Wang, Z., Wu, H.-A., Panda, T., Kou, Y., Kapoor, A., Hasson, D., Mills, N.R., Ma’ayan, A., et al. (2014). Histone H3.3 and its proteolytically processed form drive a cellular senescence programme. *Nature Communications* 5, 5210.

Duracková, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 59, 459–469.

Duro, D., Bernard, O., Della Valle, V., Berger, R., and Larsen, C.J. (1995). A new type of p16INK4/MTS1 gene transcript expressed in B-cell malignancies. *Oncogene* 11, 21–29.

Ebralidze, A., Tulchinsky, E., Grigorian, M., Afanasyeva, A., Senin, V., Revazova, E., and Lukanidin, E. (1989). Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes Dev.* 3, 1086–1093.

Edwards, N.J., Stone, R., Christy, R., Zhang, C.K., Pollok, B., and Cheng, X. (2018). Differentiation of adipose derived stem cells to keratinocyte-like cells on an advanced collagen wound matrix. *Tissue Cell* 53, 68–75.

Eicher, E.M., and Beamer, W.G. (1980). New mouse dw allele: genetic location and effects on lifespan and growth hormone levels. *J. Hered.* 71, 187–190.

Eisele, I., Wood, I.S., German, A.J., Hunter, L., and Trayhurn, P. (2005). Adipokine gene expression in dog adipose tissues and dog white adipocytes differentiated in primary culture. *Horm. Metab. Res.* 37, 474–481.

Eissing, L., Scherer, T., Tödter, K., Knippschild, U., Greve, J.W., Buurman, W.A., Pinnschmidt, H.O., Rensen, S.S., Wolf, A.M., Bartelt, A., et al. (2013). De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- β and metabolic health. *Nat Commun* 4, 1528.

Enzi, G., Gasparo, M., Biondetti, P.R., Fiore, D., Semisa, M., and Zurlo, F. (1986). Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age, and overweight, evaluated by computed tomography. *The American Journal of Clinical Nutrition* 44, 739–746.

Epstein, C.J., Martin, G.M., Schultz, A.L., and Motulsky, A.G. (1966). Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine (Baltimore)* 45, 177–221.

Evangelou, K., and Gorgoulis, V.G. (2017). Sudan Black B, The Specific Histochemical Stain for Lipofuscin: A Novel Method to Detect Senescent Cells. *Methods Mol. Biol.* 1534, 111–119.

Everitt, A.V., Seedsman, N.J., and Jones, F. (1980). The effects of hypophysectomy and continuous food restriction, begun at ages 70 and 400 days, on collagen aging, proteinuria, incidence of pathology and longevity in the male rat. *Mechanisms of Ageing and Development* 12, 161–172.

Ezhevsky, S.A., Ho, A., Becker-Hapak, M., Davis, P.K., and Dowdy, S.F. (2001). Differential Regulation of Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein by G1 Cyclin-Dependent Kinase Complexes In Vivo. *Mol Cell Biol* 21, 4773–4784.

Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S.D., Gendron, C.M., and Longo, V.D. (2001). Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* 292, 288–290.

Fagagna, F. d'Adda di, Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Zglinicki, T. von, Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194–198.

Faggioni, R., Fantuzzi, G., Gabay, C., Moser, A., Dinarello, C.A., Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (1999). Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. *Am. J. Physiol.* 276, R136-142.

Fain, J.N., Bahouth, S.W., and Madan, A.K. (2004). Haptoglobin release by human adipose tissue in primary culture. *J. Lipid Res.* 45, 536–542.

Fain, J.N., Sacks, H.S., Bahouth, S.W., Tichansky, D.S., Madan, A.K., and Cheema, P.S. (2010). Human epicardial adipokine messenger RNAs: comparisons of their expression in substernal, subcutaneous, and omental fat. *Metabolism* 59, 1379–1386.

Faragher, R.G., Kill, I.R., Hunter, J.A., Pope, F.M., Tannock, C., and Shall, S. (1993). The gene responsible for Werner syndrome may be a cell division “counting” gene. *PNAS* 90, 12030–12034.

Feser, J., Truong, D., Das, C., Carson, J.J., Kieft, J., Harkness, T., and Tyler, J.K. (2010). Elevated histone expression promotes life span extension. *Mol. Cell* 39, 724–735.

Fink, R.I., Kolterman, O.G., Griffin, J., and Olefsky, J.M. (1983). Mechanisms of Insulin Resistance in Aging. *J Clin Invest* 71, 1523–1535.

Fink, R.I., Wallace, P., and Olefsky, J.M. (1986). Effects of aging on glucose-mediated glucose disposal and glucose transport. *J. Clin. Invest.* 77, 2034–2041.

Fong, L.G., Frost, D., Meta, M., Qiao, X., Yang, S.H., Coffinier, C., and Young, S.G. (2006). A protein farnesyltransferase inhibitor ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science* 311, 1621–1623.

Fontana, L., Klein, S., and Holloszy, J.O. (2010). Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. *Age (Dordr)* 32, 97–108.

Forstermann, U. (2006). Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. *Circulation* 113, 1708–1714.

Freund, A., Patil, C.K., and Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* 30, 1536–1548.

Freund, A., Laberge, R.-M., Demaria, M., and Campisi, J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell* 23, 2066–2075.

Fried, L.P., Tangen, C.M., Walston, J., Newman, A.B., Hirsch, C., Gottdiener, J., Seeman, T., Tracy, R., Kop, W.J., Burke, G., et al. (2001). Frailty in Older Adults Evidence for a Phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56, M146–M157.

Friedrich, U., Giese, E., Schwab, M., Fritz, P., Thon, K., and Klotz, U. (2000). Telomere length in different tissues of elderly patients. *Mech. Ageing Dev.* 119, 89–99.

Friedrichs, W.E., Navarjashbaugh, A.L., Bowman, B.H., and Yang, F. (1995). Expression and Inflammatory Regulation of Haptoglobin Gene in Adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 209, 250–256.

Friesen, M., Hudak, C.S., Warren, C.R., Xia, F., and Cowan, C.A. (2016). Adipocyte insulin receptor activity maintains adipose tissue mass and lifespan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 476, 487–492.

Fuhrmann-Stroissnigg, H., Ling, Y.Y., Zhao, J., McGowan, S.J., Zhu, Y., Brooks, R.W., Grassi, D., Gregg, S.Q., Stripay, J.L., Dorronsoro, A., et al. (2017). Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat Commun* 8, 422.

Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J.M., Bucci, G., Dobrev, M., Matti, V., Beausejour, C.M., et al. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature Cell Biology* *14*, 355–365.

Funakoshi, M., Tsuda, M., Muramatsu, K., Hatsuda, H., Morishita, S., and Aigaki, T. (2011). A gain-of-function screen identifies *wdb* and *lkb1* as lifespan-extending genes in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *405*, 667–672.

Gabriely, I., Ma, X.H., Yang, X.M., Atzmon, G., Rajala, M.W., Berg, A.H., Scherer, P., Rossetti, L., and Barzilai, N. (2002). Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes* *51*, 2951–2958.

Gamucci, O., Lisi, S., Scabia, G., Marchi, M., Piaggi, P., Duranti, E., Virdis, A., Pinchera, A., Santini, F., and Maffei, M. (2012). Haptoglobin deficiency determines changes in adipocyte size and adipogenesis. *Adipocyte* *1*, 142–183.

Gan, Q., Huang, J., Zhou, R., Niu, J., Zhu, X., Wang, J., Zhang, Z., and Tong, T. (2008). PPAR γ accelerates cellular senescence by inducing p16INK4 α expression in human diploid fibroblasts. *Journal of Cell Science* *121*, 2235–2245.

Garin, N., Olaya, B., Perales, J., Moneta, M.V., Miret, M., Ayuso-Mateos, J.L., and Haro, J.M. (2014). Multimorbidity Patterns in a National Representative Sample of the Spanish Adult Population. *PLoS One* *9*.

Gatei, M., Sloper, K., Sørensen, C., Syljuäsen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B.-B., Bartek, J., et al. (2003). Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent Phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in Response to Ionizing Radiation. *J. Biol. Chem.* *278*, 14806–14811.

Gavi, S., Feiner, J.J., Melendez, M.M., Mynarcik, D.C., Gelato, M.C., and McNurlan, M.A. (2007). Limb fat to trunk fat ratio in elderly persons is a strong determinant of insulin resistance and adiponectin levels. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* *62*, 997–1001.

Georgakopoulou, E.A., Tsimaratou, K., Evangelou, K., Fernandez Marcos, P.J., Zoumpourlis, V., Trougakos, I.P., Kletsas, D., Bartek, J., Serrano, M., and Gorgoulis, V.G. (2013). Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging (Albany NY)* *5*, 37–50.

Gerace, L., and Blobel, G. (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* *19*, 277–287.

Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., and Fenn, W.O. (1954). Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science* *119*, 623–626.

Ghosh, A.K., Garg, S.K., Mau, T., O'Brien, M., Liu, J., and Yung, R. (2015). Elevated Endoplasmic Reticulum Stress Response Contributes to Adipose Tissue Inflammation in Aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* *70*, 1320–1329.

GILFORD, H. (1904). Ateleiosis and progeria : continuous youth and premature old age. *Brit Med J* 2, 914–918.

Gillum, M.P., Kotas, M.E., Erion, D.M., Kursawe, R., Chatterjee, P., Nead, K.T., Muise, E.S., Hsiao, J.J., Frederick, D.W., Yonemitsu, S., et al. (2011). SirT1 Regulates Adipose Tissue Inflammation. *Diabetes* 60, 3235–3245.

Ginaldi, L., Martinis, M.D., Modesti, M., Loreto, F., Corsi, M.P., and Quagliano, D. (2000). Immunophenotypical Changes of T Lymphocytes in the Elderly. *GER* 46, 242–248.

Godfrey, P., Rahal, J.O., Beamer, W.G., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Mayo, K.E. (1993). GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nat. Genet.* 4, 227–232.

Gomes, A.P., Price, N.L., Ling, A.J.Y., Moslehi, J.J., Montgomery, M.K., Rajman, L., White, J.P., Teodoro, J.S., Wrann, C.D., Hubbard, B.P., et al. (2013). Declining NAD⁺ Induces a Pseudohypoxic State Disrupting Nuclear-Mitochondrial Communication during Aging. *Cell* 155, 1624–1638.

Gomes, J.P., Coatti, G.C., Valadares, M.C., Assoni, A.F., Pelatti, M.V., Secco, M., and Zatz, M. (2018). Human Adipose-Derived CD146⁺ Stem Cells Increase Life Span of a Muscular Dystrophy Mouse Model More Efficiently than Mesenchymal Stromal Cells. *DNA Cell Biol.*

Gordon, L.B., Kleinman, M.E., Miller, D.T., Neuberg, D.S., Giobbie-Hurder, A., Gerhard-Herman, M., Smoot, L.B., Gordon, C.M., Cleveland, R., Snyder, B.D., et al. (2012). Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 16666–16671.

Gordon, L.B., Kleinman, M.E., Massaro, J., D’Agostino, R.B., Shappell, H., Gerhard-Herman, M., Smoot, L.B., Gordon, C.M., Cleveland, R.H., Nazarian, A., et al. (2016). Clinical Trial of the Protein Farnesylation Inhibitors Lonafarnib, Pravastatin, and Zoledronic Acid in Children With Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Circulation* 134, 114–125.

Gorospe, M., and Abdelmohsen, K. (2011). MicroRegulators come of age in senescence. *Trends Genet.* 27, 233–241.

Grandison, R.C., Piper, M.D.W., and Partridge, L. (2009). Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature* 462, 1061–1064.

Gray-Schopfer, V.C., Cheong, S.C., Chong, H., Chow, J., Moss, T., Abdel-Malek, Z.A., Marais, R., Wynford-Thomas, D., and Bennett, D.C. (2006). Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* 95, 496–505.

Green, H., and Kehinde, O. (1976). Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7, 105–113.

Gregerman, R.I. (1994). Aging and hormone-sensitive lipolysis: reconciling the literature. *J Gerontol* 49, B135-139.

Grütter, C., Wilkinson, T., Turner, R., Podichetty, S., Finch, D., McCourt, M., Loning, S., Jermutus, L., and Grütter, M.G. (2008). A cytokine-neutralizing antibody as a structural mimetic of 2 receptor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 20251–20256.

Gulshan, M., Yaku, K., Okabe, K., Mahmood, A., Sasaki, T., Yamamoto, M., Hikosaka, K., Usui, I., Kitamura, T., Tobe, K., et al. (2018). Overexpression of Nmnat3 efficiently increases NAD and NGD levels and ameliorates age-associated insulin resistance. *Aging Cell* *17*.

Guo, W., Pirtskhalava, T., Tchkonja, T., Xie, W., Thomou, T., Han, J., Wang, T., Wong, S., Cartwright, A., Hegardt, F.G., et al. (2007). Aging results in paradoxical susceptibility of fat cell progenitors to lipotoxicity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *292*, E1041-1051.

Haber, D.A. (1997). Splicing into Senescence: The Curious Case of p16 and p19ARF. *Cell* *91*, 555–558.

Halberg, N., Henriksen, M., Söderhamn, N., Stallknecht, B., Ploug, T., Schjerling, P., and Dela, F. (2005). Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men. *J. Appl. Physiol.* *99*, 2128–2136.

Haldane, J.B.S. (1941). The relative importance of principal and modifying genes in determining some human diseases. *Journ. of Genetics* *41*, 149–157.

Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol* *11*, 298–300.

Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., and Swindell, E. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* *6*, 387–400.

Harris, M.I., Flegal, K.M., Cowie, C.C., Eberhardt, M.S., Goldstein, D.E., Little, R.R., Wiedmeyer, H.M., and Byrd-Holt, D.D. (1998). Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care* *21*, 518–524.

Harris, T.B., Ferrucci, L., Tracy, R.P., Corti, M.C., Wacholder, S., Ettinger, W.H., Heimovitz, H., Cohen, H.J., and Wallace, R. (1999). Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am. J. Med.* *106*, 506–512.

Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., et al. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* *460*, 392–395.

Hashimoto, M., Asai, A., Kawagishi, H., Mikawa, R., Iwashita, Y., Kanayama, K., Sugimoto, K., Sato, T., Maruyama, M., and Sugimoto, M. (2016). Elimination of p19ARF-expressing cells enhances pulmonary function in mice. *JCI Insight* *1*, e87732.

Hatakeyama, M., and Weinberg, R.A. (1995). The role of RB in cell cycle control. In *Progress in Cell Cycle Research*, (Springer, Boston, MA), pp. 9–19.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296–299.

Hayakawa, T., Iwai, M., Aoki, S., Takimoto, K., Maruyama, M., Maruyama, W., and Motoyama, N. (2015). SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. *PLoS ONE* 10, e0116480.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25, 585–621.

He, G., Siddik, Z.H., Huang, Z., Wang, R., Koomen, J., Kobayashi, R., Khokhar, A.R., and Kuang, J. (2005). Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene* 24, 2929–2943.

Heilbronn, L.K., Jonge, L. de, Frisard, M.I., DeLany, J.P., Larson-Meyer, D.E., Rood, J., Nguyen, T., Martin, C.K., Volaufova, J., Most, M.M., et al. (2006). Effect of 6-Month Calorie Restriction on Biomarkers of Longevity, Metabolic Adaptation, and Oxidative Stress in Overweight Individuals: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 295, 1539–1548.

Helman, A., Klochendler, A., Azazmeh, N., Gabai, Y., Horwitz, E., Anzi, S., Swisa, A., Condiotti, R., Granit, R.Z., Nevo, Y., et al. (2016). p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nat. Med.* 22, 412–420.

Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D., and Sedivy, J.M. (2006). Cellular Senescence in Aging Primates. *Science* 311, 1257–1257.

Herman, M.A., Peroni, O.D., Villoria, J., Schön, M.R., Abumrad, N.A., Blüher, M., Klein, S., and Kahn, B.B. (2012). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 484, 333–338.

Herranz, D., Muñoz-Martin, M., Cañamero, M., Mulero, F., Martinez-Pastor, B., Fernandez-Capetillo, O., and Serrano, M. (2010). Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun* 1, 3.

Herranz, N., Gallage, S., Mellone, M., Wuestefeld, T., Klotz, S., Hanley, C.J., Raguz, S., Acosta, J.C., Innes, A.J., Banito, A., et al. (2015). mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat. Cell Biol.* 17, 1205–1217.

Hewitt, G., Jurk, D., Marques, F.D.M., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., Anderson, R., Taschuk, M., Mann, J., and Passos, J.F. (2012). Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nature Communications* 3, 708.

Hirao, A., Kong, Y.-Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., and Mak, T.W. (2000). DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2. *Science* 287, 1824–1827.

Hirvonen, K., Laivuori, H., Lahti, J., Strandberg, T., Eriksson, J.G., and Hackman, P. (2017). SIRT6 polymorphism rs117385980 is associated with longevity and healthy aging in Finnish men. *BMC Med. Genet.* 18, 41.

Hoffman, B.B., Chang, H., Farahbakhsh, Z.T., and Reaven, G.M. (1984a). Age-related decrement in hormone-stimulated lipolysis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 247, E772–E777.

Hoffman, B.B., Chang, H., Farahbakhsh, Z., and Reaven, G. (1984b). Inhibition of lipolysis by adenosine is potentiated with age. *J Clin Invest* 74, 1750–1755.

Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sørli, T., Hovig, E., Smith-Sørensen, B., Montesano, R., and Harris, C.C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22, 3551–3555.

Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Géloën, A., Even, P.C., Cervera, P., and Le Bouc, Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421, 182–187.

Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters* 420, 25–27.

Horsthemke, B. (1992). Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 63, 1–7.

Hou, S., Jiao, Y., Yuan, Q., Zhai, J., Tian, T., Sun, K., Chen, Z., Wu, Z., and Zhang, J. (2018). S100A4 protects mice from high-fat diet-induced obesity and inflammation. *Laboratory Investigation* 1.

Houde, V.P., Brûlé, S., Festuccia, W.T., Blanchard, P.-G., Bellmann, K., Deshaies, Y., and Marette, A. (2010). Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue. *Diabetes* 59, 1338–1348.

Houtkooper, R.H., Argmann, C., Houten, S.M., Cantó, C., Jeninga, E.H., Andreux, P.A., Thomas, C., Doenlen, R., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2011). The metabolic footprint of aging in mice. *Scientific Reports* 1.

Hu, M.C.-T., Lee, D.-F., Xia, W., Golfman, L.S., Ou-Yang, F., Yang, J.-Y., Zou, Y., Bao, S., Hanada, N., Saso, H., et al. (2004). IκB Kinase Promotes Tumorigenesis through Inhibition of Forkhead FOXO3a. *Cell* 117, 225–237.

Huang, C.-C., Chiang, W.-D., Huang, W.-C., Huang, C.-Y., Hsu, M.-C., and Lin, W.-T. (2013). Hepatoprotective Effects of Swimming Exercise against D-Galactose-Induced Senescence Rat Model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013.

Hutchinson, J. (1886). Congenital Absence of Hair and Mammary Glands with Atrophic Condition of the Skin and its Appendages, in a Boy whose Mother had been almost wholly Bald from Alopecia Areata from the age of Six. *Med Chir Trans* 69, 473–477.

Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997). Mitogenic Signaling Mediated by Oxidants in Ras-Transformed Fibroblasts. *Science* 275, 1649–1652.

Iranmanesh, A., South, S., Liem, A.Y., Clemmons, D., Thorner, M.O., Weltman, A., and Veldhuis, J.D. (1998). Unequal impact of age, percentage body fat, and serum testosterone concentrations on the somatotrophic, IGF-I, and IGF-binding protein responses to a three-day intravenous growth hormone-releasing hormone pulsatile infusion in men. *Eur. J. Endocrinol.* 139, 59–71.

Itahana, K., Itahana, Y., and Dimri, G.P. (2013). Colorimetric Detection of Senescence-Associated β Galactosidase. *Methods Mol Biol* 965, 143–156.

Iwasa, H., Han, J., and Ishikawa, F. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes to Cells* 8, 131–144.

Izumino, K., Sakamaki, H., Ishibashi, M., Takino, H., Yamasaki, H., Yamaguchi, Y., Chikuba, N., Matsumoto, K., Akazawa, S., Tokuyama, K., et al. (1997). Troglitazone ameliorates insulin resistance in patients with Werner's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2391–2395.

Jeon, O.H., Kim, C., Laberge, R.-M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A.P., Chung, J.W., Kim, D.H., Poon, Y., David, N., et al. (2017). Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat. Med.* 23, 775–781.

Jerschow, E., Anwar, S., Barzilai, N., and Rosenstreich, D. (2007). Macrophages Accumulation in Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Correlates with Age. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119, S179.

Jung, M.-S., Jin, D.-H., Chae, H.-D., Kang, S., Kim, S.-C., Bang, Y.-J., Choi, T.-S., Choi, K., and Shin, D.Y. (2004). Bcl-xL and E1B-19K Proteins Inhibit p53-induced Irreversible Growth Arrest and Senescence by Preventing Reactive Oxygen Species-dependent p38 Activation. *J. Biol. Chem.* 279, 17765–17771.

Junnala, R.K., Duran-Ortiz, S., Suer, O., Sustarsic, E.G., Berryman, D.E., List, E.O., and Kopchick, J.J. (2016). Disruption of the GH Receptor Gene in Adult Mice Increases Maximal Lifespan in Females. *Endocrinology* 157, 4502–4513.

Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 13, 2570–2580.

Kang, C., Xu, Q., Martin, T.D., Li, M.Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B.A., Campisi, J., and Elledge, S.J. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* 349, aaa5612.

Kang, H.T., Lee, K.B., Kim, S.Y., Choi, H.R., and Park, S.C. (2011). Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PLoS ONE* 6, e23367.

Kapahi, P., Zid, B.M., Harper, T., Koslover, D., Sapin, V., and Benzer, S. (2004). Regulation of Lifespan in *Drosophila* by Modulation of Genes in the TOR Signaling Pathway. *Curr Biol* 14, 885–890.

Karagiannides, I., Tchkonja, T., Dobson, D.E., Steppan, C.M., Cummins, P., Chan, G., Salvatori, K., Hadzopoulou-Cladaras, M., and Kirkland, J.L. (2001). Altered expression of C/EBP family members results in decreased adipogenesis with aging. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R1772-1780.

Karkera, J., Steiner, H., Li, W., Skradski, V., Moser, P.L., Riethdorf, S., Reddy, M., Puchalski, T., Safer, K., Prabhakar, U., et al. (2011). The anti-interleukin-6 antibody siltuximab down-regulates genes implicated in tumorigenesis in prostate cancer patients from a phase I study. *The Prostate* 71, 1455–1465.

Kawahara, T.L.A., Michishita, E., Adler, A.S., Damian, M., Berber, E., Lin, M., McCord, R.A., Ongaigui, K.C.L., Boxer, L.D., Chang, H.Y., et al. (2009). SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell* 136, 62–74.

Kawanishi Shosuke, and Oikawa Shinji (2006). Mechanism of Telomere Shortening by Oxidative Stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1019, 278–284.

Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461–464.

Kim, J.-Y., van de Wall, E., Laplante, M., Azzara, A., Trujillo, M.E., Hofmann, S.M., Schraw, T., Durand, J.L., Li, H., Li, G., et al. (2007). Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 117, 2621–2637.

Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., and Ruvkun, G. (1997). *daf-2*, an Insulin Receptor-Like Gene That Regulates Longevity and Diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277, 942–946.

Kirkwood, T.B., and Holliday, R. (1979). The evolution of ageing and longevity. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 205, 531–546.

Kishi, S., Bayliss, P.E., Uchiyama, J., Koshimizu, E., Qi, J., Nanjappa, P., Imamura, S., Islam, A., Neuberg, D., Amsterdam, A., et al. (2008). The Identification of Zebrafish Mutants Showing Alterations in Senescence-Associated Biomarkers. *PLoS Genet* 4.

Kitani, K., Osawa, T., and Yokozawa, T. (2007). The effects of tetrahydrocurcumin and green tea polyphenol on the survival of male C57BL/6 mice. *Biogerontology* 8, 567–573.

Koda, Y., Soejima, M., Yoshioka, N., and Kimura, H. (1998). The haptoglobin-gene deletion responsible for anhaptoalbuminemia. *Am J Hum Genet* 62, 245–252.

Korenberg, J.R., Kawashima, H., Pulst, S.-M., Ikeuchi, T., Ogasawara, N., Yamamoto, K., Schonberg, S.A., West, R., Allen, L., Magenis, E., et al. (1990). Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am J Hum Genet* 47, 236–246.

Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., and Bartek, J. (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16ink4a. *Cell Cycle* 10, 457–468.

Kratchmarova, I., Kalume, D.E., Blagoev, B., Scherer, P.E., Podtelejnikov, A.V., Molina, H., Bickel, P.E., Andersen, J.S., Fernandez, M.M., Bunkenborg, J., et al. (2002). A Proteomic Approach for Identification of Secreted Proteins during the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes to Adipocytes. *Molecular & Cellular Proteomics* 1, 213–222.

Kreymann, G., Adolph, M., Mueller, M.J., and Working group for developing the guidelines for parenteral nutrition of The German Association for Nutritional Medicine (2009). Energy expenditure and energy intake - Guidelines on Parenteral Nutrition, Chapter 3. *Ger Med Sci* 7, Doc25.

Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* 114, 1299–1307.

Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., and Moestrup, S.K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409, 198–201.

Krogh, A.K.H., Lundsgaard, J.F.H., Bakker, J., Langermans, J.A.M., Verreck, F.A.W., Kjelgaard-Hansen, M., Jacobsen, S., and Bertelsen, M.F. (2014). Acute-phase responses in healthy and diseased rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *J. Zoo Wildl. Med.* 45, 306–314.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133, 1019–1031.

Kuk, J.L., Saunders, T.J., Davidson, L.E., and Ross, R. (2009). Age-related changes in total and regional fat distribution. *Ageing Research Reviews* 8, 339–348.

Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science* 113, 3613–3622.

Laberge, R.-M., Zhou, L., Sarantos, M.R., Rodier, F., Freund, A., de Keizer, P.L.J., Liu, S., Demaria, M., Cong, Y.-S., Kapahi, P., et al. (2012). Glucocorticoids suppress selected components of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell* 11, 569–578.

Laberge, R.-M., Sun, Y., Orjalo, A.V., Patil, C.K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S.C., Davalos, A.R., Wilson-Edell, K.A., Liu, S., et al. (2015). mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1049–1061.

Lagarrigue, S., Lopez-Mejia, I.C., Denechaud, P.-D., Escoté, X., Castillo-Armengol, J., Jimenez, V., Chavey, C., Giralt, A., Lai, Q., Zhang, L., et al. (2016). CDK4 is an essential insulin effector in adipocytes. *J. Clin. Invest.* **126**, 335–348.

Lal, A., Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Pullmann, R., Srikantan, S., Subrahmanyam, R., Martindale, J.L., Yang, X., Ahmed, F., et al. (2008). p16(INK4a) translation suppressed by miR-24. *PLoS ONE* **3**, e1864.

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.

LaRocca, T.J., Seals, D.R., and Pierce, G.L. (2010). Leukocyte telomere length is preserved with aging in endurance exercise-trained adults and related to maximal aerobic capacity. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 165–167.

Leamey, C.A., Merlin, S., Lattouf, P., Sawatari, A., Zhou, X., Demel, N., Glendining, K.A., Oohashi, T., Sur, M., and Fässler, R. (2007). Ten_m3 Regulates Eye-Specific Patterning in the Mammalian Visual Pathway and Is Required for Binocular Vision. *PLOS Biology* **5**, e241.

Lee, A.C., Fenster, B.E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N.S., Hirai, T., Yu, Z.-X., Ferrans, V.J., Howard, B.H., and Finkel, T. (1999). Ras Proteins Induce Senescence by Altering the Intracellular Levels of Reactive Oxygen Species. *J. Biol. Chem.* **274**, 7936–7940.

Lee, C.-H., Inoki, K., Karbowniczek, M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Henske, E.P., and Guan, K.-L. (2007). Constitutive mTOR activation in TSC mutants sensitizes cells to energy starvation and genomic damage via p53. *The EMBO Journal* **26**, 4812–4823.

Lee, I., Lee, S.-J., Kang, W.K., and Park, C. (2012). Inhibition of Monocarboxylate Transporter 2 Induces Senescence-Associated Mitochondrial Dysfunction and Suppresses Progression of Colorectal Malignancies In Vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* **11**, 2342–2351.

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.

Lettieri-Barbato, D., Giovannetti, E., and Aquilano, K. (2016). Effects of dietary restriction on adipose mass and biomarkers of healthy aging in human. *Aging (Albany NY)* **8**, 3341–3355.

- Levadoux, E., Morio, B., Montaurier, C., Puissant, V., Boirie, Y., Fellmann, N., Picard, B., Rousset, P., Beaufrere, B., and Ritz, P. (2001). Reduced whole-body fat oxidation in women and in the elderly. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25, 39–44.
- Levine, A., Bashan-Ahrend, A., Budai-Hadrian, O., Gartenberg, D., Menasherow, S., and Wides, R. (1994). odd Oz: A novel *Drosophila* pair rule gene. *Cell* 77, 587–598.
- Li, Y., and Tollefsbol, T.O. (2011). p16(INK4a) suppression by glucose restriction contributes to human cellular lifespan extension through SIRT1-mediated epigenetic and genetic mechanisms. *PLoS ONE* 6, e17421.
- Li, H., Matheny, M., Nicolson, M., Tümer, N., and Scarpace, P.J. (1997). Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes* 46, 2035–2039.
- Li, Q., Ceylan-Isik, A.F., Li, J., and Ren, J. (2008). Deficiency of insulin-like growth factor 1 reduces sensitivity to aging-associated cardiomyocyte dysfunction. *Rejuvenation Res* 11, 725–733.
- Li, Y., Nichols, M.A., Shay, J.W., and Xiong, Y. (1994). Transcriptional Repression of the D-Type Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p16 by the Retinoblastoma Susceptibility Gene Product pRb. *Cancer Res* 54, 6078–6082.
- Li, Y., Wang, W.-J., Cao, H., Lu, J., Wu, C., Hu, F.-Y., Guo, J., Zhao, L., Yang, F., Zhang, Y.-X., et al. (2009). Genetic association of FOXO1A and FOXO3A with longevity trait in Han Chinese populations. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4897–4904.
- Lim, S.K., Kim, H., Lim, S.K., bin Ali, A., Lim, Y.K., Wang, Y., Chong, S.M., Costantini, F., and Bauman, H. (1998). Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis. *Blood* 92, 1870–1877.
- Lin, K., Dorman, J.B., Rodan, A., and Kenyon, C. (1997). daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 278, 1319–1322.
- Lin, R., Zhang, Y., Yan, D., Liao, X., Gong, G., Hu, J., Fu, Y., and Cai, W. (2016). Lack of association between polymorphisms in the SIRT6 gene and longevity in a Chinese population. *Mol. Cell. Probes* 30, 79–82.
- Liou, C.-J., Cheng, P.-Y., Huang, W.-C., Chan, C.-C., Chen, M.-C., Kuo, M.-L., and Shen, J.-J. (2014). Oral lovastatin attenuates airway inflammation and mucus secretion in ovalbumin-induced murine model of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 6, 548–557.
- Lipina, C., Vaanholt, L., Davidova, A., Mitchell, S., Storey-Gordon, E., Hambly, C., J Irving, A., Speakman, J., and Hundal, H. (2016). CB1 receptor blockade counters age-induced insulin resistance and metabolic dysfunction. *Aging Cell* 15.
- Lipman, R.D., Bronson, R.T., Wu, D., Smith, D.E., Prior, R., Cao, G., Han, S.N., Martin, K.R., Meydani, S.N., and Meydani, M. (1998). Disease incidence and longevity are unaltered by

dietary antioxidant supplementation initiated during middle age in C57BL/6 mice. *Mechanisms of Ageing and Development* 103, 269–284.

Lisi, S., Gamucci, O., Vottari, T., Scabia, G., Funicello, M., Marchi, M., Galli, G., Arisi, I., Brandi, R., D'Onofrio, M., et al. (2011). Obesity-Associated Hepatosteatosis and Impairment of Glucose Homeostasis Are Attenuated by Haptoglobin Deficiency. *Diabetes* 60, 2496–2505.

Liu, M., Lei, H., Dong, P., Fu, X., Yang, Z., Yang, Y., Ma, J., Liu, X., Cao, Y., and Xiao, R. (2017). Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from the Elderly Exhibit Decreased Migration and Differentiation Abilities with Senescent Properties. *Cell Transplant* 26, 1505–1519.

Liu, S., Uppal, H., Demaria, M., Desprez, P.-Y., Campisi, J., and Kapahi, P. (2015). Simvastatin suppresses breast cancer cell proliferation induced by senescent cells. *Sci Rep* 5, 17895.

Liu, X., Wang, Y., Zhang, X., Gao, Z., Zhang, S., Shi, P., Zhang, X., Song, L., Hendrickson, H., Zhou, D., et al. (2018). Senolytic activity of piperlongumine analogues: Synthesis and biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 26, 3925–3938.

Liu, Y., Sanoff, H.K., Cho, H., Burd, C.E., Torrice, C., Ibrahim, J.G., Thomas, N.E., and Sharpless, N.E. (2009). Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell* 8, 439–448.

Ljung, L., Olsson, T., Engstrand, S., Wållberg-Jonsson, S., Söderberg, S., and Rantapää-Dahlqvist, S. (2007). Interleukin-1 receptor antagonist is associated with both lipid metabolism and inflammation in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 25, 617–620.

Lönnqvist, F., Nyberg, B., Wahrenberg, H., and Arner, P. (1990). Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue of the elderly. *J Clin Invest* 85, 1614–1621.

Lönnqvist, F., Wahrenberg, H., Hellström, L., Reynisdottir, S., and Arner, P. (1992). Lipolytic catecholamine resistance due to decreased beta 2-adrenoceptor expression in fat cells. *J Clin Invest* 90, 2175–2186.

López-Luppo, M., Catita, J., Ramos, D., Navarro, M., Carretero, A., Mendes-Jorge, L., Muñoz-Cánoves, P., Rodríguez-Baeza, A., Nacher, V., and Ruberte, J. (2017). Cellular Senescence Is Associated With Human Retinal Microaneurysm Formation During Aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58, 2832–2842.

Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R., and Lechler, R.I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897–901.

Ma, H., Zhang, T., Shen, H., Cao, H., and Du, J. (2014). The adverse events profile of anti-IGF-1R monoclonal antibodies in cancer therapy. *Br J Clin Pharmacol* 77, 917–928.

Ma, X.H., Muzumdar, R., Yang, X.M., Gabriely, I., Berger, R., and Barzilai, N. (2002). Aging is associated with resistance to effects of leptin on fat distribution and insulin action. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 57, B225-231.

Maffei, M., Funicello, M., Vottari, T., Gamucci, O., Costa, M., Lisi, S., Viegi, A., Ciampi, O., Bardi, G., Vitti, P., et al. (2009). The obesity and inflammatory marker haptoglobin attracts monocytes via interaction with chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2). *BMC Biology* 7, 87.

Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., and Reddy, P.H. (2006). Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1437–1449.

Manoussakis, M.N., Tzioufas, A.G., Silis, M.P., Pange, P.J., Goudevenos, J., and Moutsopoulos, H.M. (1987). High prevalence of anti-cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population. *Clin. Exp. Immunol.* 69, 557–565.

Mao, K., Quipildor, G.F., Tabrizian, T., Novaj, A., Guan, F., Walters, R.O., Delahaye, F., Hubbard, G.B., Ikeno, Y., Ejima, K., et al. (2018). Late-life targeting of the IGF-1 receptor improves healthspan and lifespan in female mice. *Nature Communications* 9, 2394.

Marędziak, M., Marycz, K., Tomaszewski, K.A., Kornicka, K., and Henry, B.M. (2016). The Influence of Aging on the Regenerative Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int* 2016, 2152435.

Marengoni, A., Angleman, S., Melis, R., Mangialasche, F., Karp, A., Garmen, A., Meinow, B., and Fratiglioni, L. (2011). Aging with multimorbidity: A systematic review of the literature. *Ageing Research Reviews* 10, 430–439.

Mason, D.X., Jackson, T.J., and Lin, A.W. (2004). Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene* 23, 9238–9246.

Matsumoto, T., Shimamoto, A., Goto, M., and Furuichi, Y. (1997). Impaired nuclear localization of defective DNA helicases in Werner's syndrome. *Nat. Genet.* 16, 335–336.

Matsushime, H., Ewen, M.E., Strom, D.K., Kato, J.-Y., Hanks, S.K., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1992). Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 71, 323–334.

Mattison, J.A., Roth, G.S., Beasley, T.M., Tilmont, E.M., Handy, A.M., Herbert, R.L., Longo, D.L., Allison, D.B., Young, J.E., Bryant, M., et al. (2012). Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489, 318–321.

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.

McConnell, J.G., Buchanan, K.D., Ardill, J., and Stout, R.W. (1982). Glucose tolerance in the elderly: the role of insulin and its receptor. *Eur. J. Clin. Invest.* 12, 55–61.

Medawar, P.B., and University College, L. (1952). An Unsolved problem of biology; an inaugural lecture delivered at University College, London, 6 December, 1951. (London: H.K. Lewis and Co.).

Medvedev, Z.A. (1990). An Attempt at a Rational Classification of Theories of Ageing. *Biological Reviews* 65, 375–398.

Melanson, K.J., Saltzman, E., Vinken, A.G., Russell, R., and Roberts, S.B. (1998). The effects of age on postprandial thermogenesis at four graded energetic challenges: findings in young and older women. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 53, B409-414.

Meneilly, G.S., Veldhuis, J.D., and Elahi, D. (1999). Disruption of the pulsatile and entropic modes of insulin release during an unvarying glucose stimulus in elderly individuals. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1938–1943.

Mercken, E.M., Crosby, S.D., Lamming, D.W., JeBailey, L., Krzysik-Walker, S., Villareal, D.T., Capri, M., Franceschi, C., Zhang, Y., Becker, K., et al. (2013). Calorie restriction in humans inhibits the PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile. *Aging Cell* 12, 645–651.

Merino, J., Martínez-González, M.A., Rubio, M., Inogés, S., Sánchez-Ibarrola, A., and Subirá, M.L. (1998). Progressive decrease of CD8^{high}+ CD28+ CD57– cells with ageing. *Clin Exp Immunol* 112, 48–51.

Meyerson, M., and Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14, 2077–2086.

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., Horst, C.M.A.M. van der, Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720–724.

Mieda, M., Kikuchi, Y., Hirate, Y., Aoki, M., and Okamoto, H. (1999). Compartmentalized expression of zebrafish ten-m3 and ten-m4, homologues of the *Drosophila* *tenm/oddOz* gene, in the central nervous system. *Mechanisms of Development* 87, 223–227.

Min, K.-J., and Tatar, M. (2006). Restriction of amino acids extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development* 127, 643–646.

Miyauchi, H., Minamino, T., Tateno, K., Kunieda, T., Toko, H., and Komuro, I. (2004). Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J.* 23, 212–220.

Moore, B.W. (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 739–744.

Moriguti, J.C., Das, S.K., Saltzman, E., Corrales, A., McCrory, M.A., Greenberg, A.S., and Roberts, S.B. (2000). Effects of a 6-week hypocaloric diet on changes in body composition, hunger, and subsequent weight regain in healthy young and older adults. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 55, B580-587.

Morin, C.L., Pagliassotti, M.J., Windmiller, D., and Eckel, R.H. (1997). Adipose tissue-derived tumor necrosis factor- α activity is elevated in older rats. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 52, B190-195.

Morishita, K., Shimada, E., Watanabe, Y., and Kimura, H. (2000). Anaphylactic transfusion reactions associated with anti-haptoglobin in a patient with ahaptoglobinemia. *Transfusion* 40, 120–121.

Morris, J.Z., Tissenbaum, H.A., and Ruvkun, G. (1996). A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382, 536–539.

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, aaf4445.

Mostoslavsky, R., Chua, K.F., Lombard, D.B., Pang, W.W., Fischer, M.R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M.M., et al. (2006). Genomic Instability and Aging-like Phenotype in the Absence of Mammalian SIRT6. *Cell* 124, 315–329.

Mounkes, L.C., Kozlov, S., Hernandez, L., Sullivan, T., and Stewart, C.L. (2003). A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. *Nature* 423, 298–301.

Naaman, C.E., Grum-Schwensen, B., Mansouri, A., Grigorian, M., Santoni-Rugiu, E., Hansen, T., Kriaevska, M., Schafer, B.W., Heizmann, C.W., Lukanidin, E., et al. (2004). Cancer predisposition in mice deficient for the metastasis-associated *Mts1(S100A4)* gene. *Oncogene* 23, 3670–3680.

Nagai, K., Matsushita, T., Matsuzaki, T., Takayama, K., Matsumoto, T., Kuroda, R., and Kurosaka, M. (2015). Depletion of SIRT6 causes cellular senescence, DNA damage, and telomere dysfunction in human chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* 23, 1412–1420.

Narita, M., Nuñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell* 113, 703–716.

Narita, M., Young, A.R.J., Arakawa, S., Samarajiwa, S.A., Nakashima, T., Yoshida, S., Hong, S., Berry, L.S., Reichelt, S., Ferreira, M., et al. (2011). Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science* 332, 966–970.

do Nascimento, C.O., Hunter, L., and Trayhurn, P. (2004). Regulation of haptoglobin gene expression in 3T3-L1 adipocytes by cytokines, catecholamines, and PPAR γ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 702–708.

Nelson, G., Wordsworth, J., Wang, C., Jurk, D., Lawless, C., Martin-Ruiz, C., and von Zglinicki, T. (2012). A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell* 11, 345–349.

Nishijima, T.F., Deal, A.M., Williams, G.R., Guerard, E.J., Nyrop, K.A., and Muss, H.B. (2017). Frailty and inflammatory markers in older adults with cancer. *Aging (Albany NY)* 9, 650–661.

Nogalska, A., and Swierczynski, J. (2004). Potential role of high serum leptin concentration in age-related decrease of fatty acid synthase gene expression in rat white adipose tissue. *Exp. Gerontol.* 39, 147–150.

Nogalska, A., Pankiewicz, A., Goyke, E., and Swierczynski, J. (2003). The age-related inverse relationship between ob and lipogenic enzymes genes expression in rat white adipose tissue. *Exp. Gerontol.* 38, 415–422.

Nogalska, A., Sucajty-Szulc, E., and Swierczynski, J. (2005). Leptin decreases lipogenic enzyme gene expression through modification of SREBP-1c gene expression in white adipose tissue of aging rats. *Metab. Clin. Exp.* 54, 1041–1047.

Nojima, A., Yamashita, M., Yoshida, Y., Shimizu, I., Ichimiya, H., Kamimura, N., Kobayashi, Y., Ohta, S., Ishii, N., and Minamino, T. (2013). Haploinsufficiency of akt1 prolongs the lifespan of mice. *PLoS ONE* 8, e69178.

Ocampo, A., Liu, J., Schroeder, E.A., Shadel, G.S., and Barrientos, A. (2012). Mitochondrial Respiratory Thresholds Regulate Yeast Chronological Life Span and its Extension by Caloric Restriction. *Cell Metabolism* 16, 55–67.

Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissenbaum, H.A., and Ruvkun, G. (1997). The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389, 994–999.

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. *Nature Communications* 8, 15691.

Ohashi, K., Parker, J.L., Ouchi, N., Higuchi, A., Vita, J.A., Gokce, N., Pedersen, A.A., Kalthoff, C., Tullin, S., Sams, A., et al. (2010). Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.* 285, 6153–6160.

Okoshi, R., Ozaki, T., Yamamoto, H., Ando, K., Koida, N., Ono, S., Koda, T., Kamijo, T., Nakagawara, A., and Kizaki, H. (2008). Activation of AMP-activated Protein Kinase Induces p53-dependent Apoptotic Cell Death in Response to Energetic Stress. *J. Biol. Chem.* 283, 3979–3987.

Oliviero, S., and Cortese, R. (1989). The human haptoglobin gene promoter: interleukin-6-responsive elements interact with a DNA-binding protein induced by interleukin-6. *The EMBO Journal* 8, 1145.

Olovnikov, A.M. (1973). A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology* 41, 181–190.

Oohashi, T., Zhou, X.-H., Feng, K., Richter, B., Mörgelin, M., Perez, M.T., Su, W.-D., Chiquet-Ehrismann, R., Rauch, U., and Fässler, R. (1999). Mouse Ten-m/Odz Is a New Family of Dimeric Type II Transmembrane Proteins Expressed in Many Tissues. *The Journal of Cell Biology* 145, 563–577.

Orjalo, A.V., Bhaumik, D., Gengler, B.K., Scott, G.K., and Campisi, J. (2009). Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 17031–17036.

Ortega Martinez de Victoria, E., Xu, X., Koska, J., Francisco, A.M., Scalise, M., Ferrante, A.W., and Krakoff, J. (2009). Macrophage content in subcutaneous adipose tissue: associations with adiposity, age, inflammatory markers, and whole-body insulin action in healthy Pima Indians. *Diabetes* 58, 385–393.

O’Sullivan, R.J., Kubicek, S., Schreiber, S.L., and Karlseder, J. (2010). Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1218–1225.

Pajvani, U.B., Trujillo, M.E., Combs, T.P., Iyengar, P., Jelicks, L., Roth, K.A., Kitis, R.N., and Scherer, P.E. (2005). Fat apoptosis through targeted activation of caspase 8: a new mouse model of inducible and reversible lipodystrophy. *Nat. Med.* 11, 797–803.

Palmer, H.J., and Paulson, K.E. (1997). Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Signal Transduction and Gene Expression. *Nutrition Reviews* 55, 353–361.

Parameshwaran, K., Irwin, M.H., Steliou, K., and Pinkert, C.A. (2010). D-Galactose Effectiveness in Modeling Aging and Therapeutic Antioxidant Treatment in Mice. *Rejuvenation Res* 13, 729–735.

Parise, G., Brose, A.N., and Tarnopolsky, M.A. (2005). Resistance exercise training decreases oxidative damage to DNA and increases cytochrome oxidase activity in older adults. *Exp. Gerontol.* 40, 173–180.

Park, K.U., Song, J., and Kim, J.Q. (2004). Haptoglobin genotypic distribution (including Hp0 allele) and associated serum haptoglobin concentrations in Koreans. *J. Clin. Pathol.* 57, 1094–1095.

Passos, J.F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C.J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., et al. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol* 6, 347.

Percheron, G., Hogrel, J.-Y., Denot-Ledunois, S., Fayet, G., Forette, F., Baulieu, E.-E., Fardeau, M., and Marini, J.-F. (2003). Effect of 1-Year Oral Administration of Dehydroepiandrosterone to 60- to 80-Year-Old Individuals on Muscle Function and Cross-sectional Area: A Double-blind Placebo-Controlled Trial. *Arch Intern Med* 163, 720–727.

Piard, J., Aral, B., Vabres, P., Holder-Espinasse, M., Mégarbané, A., Gauthier, S., Capra, V., Pierquin, G., Callier, P., Baumann, C., et al. (2015). Search for ReCQL4 mutations in 39

patients genotyped for suspected Rothmund-Thomson/Baller-Gerold syndromes. *Clin. Genet.* 87, 244–251.

Porter, S.A., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Vasan, R.S., O'Donnel, C.J., and Fox, C.S. (2009). Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue: A Protective Fat Depot? *Diabetes Care* 32, 1068–1075.

Prattichizzo, F., De Nigris, V., Mancuso, E., Spiga, R., Giuliani, A., Maticchione, G., Lazzarini, R., Marcheselli, F., Recchioni, R., Testa, R., et al. (2018). Short-term sustained hyperglycaemia fosters an archetypal senescence-associated secretory phenotype in endothelial cells and macrophages. *Redox Biol* 15, 170–181.

Purcell, M., Kruger, A., and Tainsky, M.A. (2014). Gene expression profiling of replicative and induced senescence. *Cell Cycle* 13, 3927–3937.

Qiao, L., and Shao, J. (2006). SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J. Biol. Chem.* 281, 39915–39924.

Qiu, W., Sahin, F., Iacobuzio-Donahue, C.A., Garcia-Carracedo, D., Wang, W.M., Kuo, C.-Y., Chen, D., Arking, D.E., Lowy, A.M., Hruban, R.H., et al. (2011). Disruption of p16 and activation of Kras in pancreas increase ductal adenocarcinoma formation and metastasis in vivo. *Oncotarget* 2, 862–873.

Racette, S.B., Weiss, E.P., Villareal, D.T., Arif, H., Steger-May, K., Schechtman, K.B., Fontana, L., Klein, S., and Holloszy, J.O. (2006). One Year of Caloric Restriction in Humans: Feasibility and Effects on Body Composition and Abdominal Adipose Tissue. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61, 943–950.

Radák, Z., Naito, H., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Cardozo-Pelaez, F., and Goto, S. (2002). Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 445, 273–278.

Radloff, L.S. (1977). The CES-D Scale: A self-report depression scale for research in the general population.

Reddy, P.H., McWeeney, S., Park, B.S., Manczak, M., Gutala, R.V., Partovi, D., Jung, Y., Yau, V., Searles, R., Mori, M., et al. (2004). Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1225–1240.

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.

Reeve, A., Meagher, M., Lax, N., Simcox, E., Hepplewhite, P., Jaros, E., and Turnbull, D. (2013). The impact of pathogenic mitochondrial DNA mutations on substantia nigra neurons. *J. Neurosci.* 33, 10790–10801.

Rezaie-Majd, A., Maca, T., Bucek, R.A., Valent, P., Müller, M.R., Husslein, P., Kashanipour, A., Minar, E., and Baghestanian, M. (2002). Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1194–1199.

Rigol, M., Solanes, N., Farré, J., Roura, S., Roqué, M., Berruezo, A., Bellera, N., Novensà, L., Tamborero, D., Prat-Vidal, C., et al. (2010). Effects of adipose tissue-derived stem cell therapy after myocardial infarction: impact of the route of administration. *J. Card. Fail.* 16, 357–366.

Rising, R., Tataranni, P.A., Snitker, S., and Ravussin, E. (1996). Decreased ratio of fat to carbohydrate oxidation with increasing age in Pima Indians. *J Am Coll Nutr* 15, 309–312.

Robert, J.-J., Cummins, J.C., Wolfe, R.R., Durkot, M., Matthews, D.E., Zhao, X.H., Bier, D.M., and Young, V.R. (1982). Quantitative Aspects of Glucose Production and Metabolism in Healthy Elderly Subjects. *Diabetes* 31, 203–211.

Roberts, S.B., Fuss, P., Heyman, M.B., Evans, W.J., Tsay, R., Rasmussen, H., Fiatarone, M., Cortiella, J., Dallal, G.E., and Young, V.R. (1994). Control of Food Intake in Older Men. *JAMA* 272, 1601–1606.

Rockwood, K., Song, X., MacKnight, C., Bergman, H., Hogan, D.B., McDowell, I., and Mitnitski, A. (2005). A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. *CMAJ* 173, 489–495.

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.

Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* 11, 973–979.

Rodriguez, M., Rodriguez-Sabate, C., Morales, I., Sanchez, A., and Sabate, M. (2015). Parkinson's disease as a result of aging. *Aging Cell* 14, 293–308.

Rogina, B., and Helfand, S.L. (2004). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15998–16003.

Roichman, A., Kanfi, Y., Glazz, R., Naiman, S., Amit, U., Landa, N., Tinman, S., Stein, I., Pikarsky, E., Leor, J., et al. (2017). SIRT6 Overexpression Improves Various Aspects of Mouse Healthspan. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 72, 603–615.

Rönn, T., Volkov, P., Davegårdh, C., Dayeh, T., Hall, E., Olsson, A.H., Nilsson, E., Tornberg, A., Dekker Nitert, M., Eriksson, K.-F., et al. (2013). A six months exercise intervention

influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet.* 9, e1003572.

Roos, C.M., Zhang, B., Palmer, A.K., Ogrodnik, M.B., Pirtskhalava, T., Thalji, N.M., Hagler, M., Jurk, D., Smith, L.A., Casaclang-Verzosa, G., et al. (2016). Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell* 15, 973–977.

Rowley, M., Buchanan, H., and Mackay, I. (1968). RECIPROCAL CHANGE WITH AGE IN ANTIBODY TO EXTRINSIC AND INTRINSIC ANTIGENS. *The Lancet* 292, 24–26.

Ruan, H., Hacohen, N., Golub, T.R., Parijs, L.V., and Lodish, H.F. (2002). Tumor Necrosis Factor- α Suppresses Adipocyte-Specific Genes and Activates Expression of Preadipocyte Genes in 3T3-L1 Adipocytes: Nuclear Factor- κ B Activation by TNF- α Is Obligatory. *Diabetes* 51, 1319–1336.

Rubin, B.P., Tucker, R.P., Martin, D., and Chiquet-Ehrismann, R. (1999). Teneurins: A Novel Family of Neuronal Cell Surface Proteins in Vertebrates, Homologous to the *Drosophila* Pair-Rule Gene Product Ten-m. *Developmental Biology* 216, 195–209.

Rudland, P.S., Platt-Higgins, A., Renshaw, C., West, C.R., Winstanley, J.H., Robertson, L., and Barraclough, R. (2000). Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res.* 60, 1595–1603.

Russo, A.A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nature Structural & Molecular Biology* 3, 696–700.

Ryu, S.J., Oh, Y.S., and Park, S.C. (2007). Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death and Differentiation* 14, 1020–1028.

Safdar, A., Bourgeois, J.M., Ogborn, D.I., Little, J.P., Hettinga, B.P., Akhtar, M., Thompson, J.E., Melov, S., Mocellin, N.J., Kujoth, G.C., et al. (2011). Endurance exercise rescues progeroid aging and induces systemic mitochondrial rejuvenation in mtDNA mutator mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4135–4140.

Sage, J., Mulligan, G.J., Attardi, L.D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E., and Jacks, T. (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G1 control and immortalization. *Genes Dev.* 14, 3037–3050.

Sage, J., Miller, A.L., Pérez-Mancera, P.A., Wysocki, J.M., and Jacks, T. (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* 424, 223–228.

Sahin, K., Pala, R., Tuzcu, M., Ozdemir, O., Orhan, C., Sahin, N., and Juturu, V. (2016). Curcumin prevents muscle damage by regulating NF- κ B and Nrf2 pathways and improves performance: an in vivo model. *J Inflamm Res* 9, 147–154.

Sakoda, K., Yamamoto, M., Negishi, Y., Liao, J.K., Node, K., and Izumi, Y. (2006). Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. *J. Dent. Res.* 85, 520–523.

Saremi, B., Al-Dawood, A., Winand, S., Müller, U., Pappritz, J., von Soosten, D., Rehage, J., Dänicke, S., Häussler, S., Mielenz, M., et al. (2012). Bovine haptoglobin as an adipokine: serum concentrations and tissue expression in dairy cows receiving a conjugated linoleic acids supplement throughout lactation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 146, 201–211.

Saretzki, G. (2010). Cellular senescence in the development and treatment of cancer. *Curr. Pharm. Des.* 16, 79–100.

Saunders, T.J., Davidson, L.E., Janiszewski, P.M., Després, J.-P., Hudson, R., and Ross, R. (2009). Associations of the limb fat to trunk fat ratio with markers of cardiometabolic risk in elderly men and women. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 64, 1066–1070.

Schafer, M.J., White, T.A., Evans, G., Tonne, J.M., Verzosa, G.C., Stout, M.B., Mazula, D.L., Palmer, A.K., Baker, D.J., Jensen, M.D., et al. (2016). Exercise Prevents Diet-Induced Cellular Senescence in Adipose Tissue. *Diabetes* 65, 1606–1615.

Scheen, A.J., Sturis, J., Polonsky, K.S., and Van Cauter, E. (1996). Alterations in the ultradian oscillations of insulin secretion and plasma glucose in aging. *Diabetologia* 39, 564–572.

Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 26746–26749.

Schmidt, M.I., Duncan, B.B., Sharrett, A.R., Lindberg, G., Savage, P.J., Offenbacher, S., Azambuja, M.I., Tracy, R.P., and Heiss, G. (1999). Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet* 353, 1649–1652.

Schneider, J., and Bennett, D. (2010). Where Vascular meets Neurodegenerative Disease. *Stroke* 41, S144–S146.

Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M., and Barrett, J.C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 6, 168–170.

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.

Seluanov, A., Gorbunova, V., Falcovitz, A., Sigal, A., Milyavsky, M., Zurer, I., Shohat, G., Goldfinger, N., and Rotter, V. (2001). Change of the Death Pathway in Senescent Human Fibroblasts in Response to DNA Damage Is Caused by an Inability To Stabilize p53. *Mol Cell Biol* 21, 1552–1564.

Senolt, L., Grigorian, M., Lukanidin, E., Simmen, B., Michel, B.A., Pavelka, K., Gay, R.E., Gay, S., and Neidhart, M. (2006). S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid

arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 1645–1648.

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.

Shah, P.P., Donahue, G., Otte, G.L., Capell, B.C., Nelson, D.M., Cao, K., Aggarwala, V., Cruickshanks, H.A., Rai, T.S., McBryan, T., et al. (2013). Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes Dev.* 27, 1787–1799.

Shamsi, K.S., Pierce, A., Ashton, A.S., Halade, D.G., Richardson, A., and Espinoza, S.E. (2012). Proteomic Screening of Glycoproteins in Human Plasma for Frailty Biomarkers. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67, 853–864.

Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, P.S., Choi, D., and Funk, W.D. (1999). Microarray analysis of replicative senescence. *Current Biology* 9, 939–945.

Shen, H., Song, Y., Colangelo, C.M., Wu, T., Bruce, C., Scabia, G., Galan, A., Maffei, M., and Goldstein, D.R. (2012). Haptoglobin activates innate immunity to enhance acute transplant rejection in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 383–387.

Shen, H., Heuzey, E., Mori, D.N., Wong, C.K., Colangelo, C.M., Chung, L.M., Bruce, C., Slizovskiy, I.B., Booth, C.J., Kreisel, D., et al. (2015). Haptoglobin enhances cardiac transplant rejection. *Circ. Res.* 116, 1670–1679.

Shimada, E., Odagiri, M., Chaiwong, K., Watanabe, Y., Anazawa, M., Mazda, T., Okazaki, H., Juji, T., O'Charoen, R., and Tadokoro, K. (2007). Detection of Hpdel among Thais, a deleted allele of the haptoglobin gene that causes congenital haptoglobin deficiency. *Transfusion* 47, 2315–2321.

Siitonen, H.A., Sotkasiira, J., Biervliet, M., Benmansour, A., Capri, Y., Cormier-Daire, V., Crandall, B., Hannula-Jouppi, K., Hennekam, R., Herzog, D., et al. (2009). The mutation spectrum in RECQL4 diseases. *Eur. J. Hum. Genet.* 17, 151–158.

Siklova-Vitkova, M., Klimcakova, E., Polak, J., Kovacova, Z., Tencerova, M., Rossmeislova, L., Bajzova, M., Langin, D., and Stich, V. (2012). Adipose Tissue Secretion and Expression of Adipocyte-Produced and Stromavascular Fraction-Produced Adipokines Vary during Multiple Phases of Weight-Reducing Dietary Intervention in Obese Women. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E1176–E1181.

Simon, A.K., Hollander, G.A., and McMichael, A. (2015). Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci* 282.

Sirk, D., Zhu, Z., Wadia, J.S., Shulyakova, N., Phan, N., Fong, J., and Mills, L.R. (2007). Chronic exposure to sub-lethal beta-amyloid (A β) inhibits the import of nuclear-encoded proteins to mitochondria in differentiated PC12 cells. *J. Neurochem.* 103, 1989–2003.

Skulachev, V.P. (2001). The programmed death phenomena, aging, and the Samurai law of biology. *Experimental Gerontology* 36, 995–1024.

Smith, M.L., Murphy, K., Doucette, C.D., Greenshields, A.L., and Hoskin, D.W. (2016). The Dietary Flavonoid Fisetin Causes Cell Cycle Arrest, Caspase-Dependent Apoptosis, and Enhanced Cytotoxicity of Chemotherapeutic Drugs in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *J. Cell. Biochem.* 117, 1913–1925.

Snell, G.D. (1929). DWARF, A NEW MENDELIAN RECESSIVE CHARACTER OF THE HOUSE MOUSE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 15, 733–734.

Sohal, R.S., and Brunk, U.T. (1989). Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. *Adv. Exp. Med. Biol.* 266, 17–26; discussion 27–29.

Solon-Biet, S.M., McMahon, A.C., Ballard, J.W.O., Ruohonen, K., Wu, L.E., Cogger, V.C., Warren, A., Huang, X., Pichaud, N., Melvin, R.G., et al. (2014). The Ratio of Macronutrients, Not Caloric Intake, Dictates Cardiometabolic Health, Aging, and Longevity in Ad Libitum-Fed Mice. *Cell Metabolism* 19, 418–430.

Song, I.-U., Kim, Y.-D., Chung, S.-W., and Cho, H.-J. (2015). Association between serum haptoglobin and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Intern. Med.* 54, 453–457.

Spagnuolo, M.S., Maresca, B., Mollica, M.P., Cavaliere, G., Cefaliello, C., Trinchese, G., Esposito, M.G., Scudiero, R., Crispino, M., Abrescia, P., et al. (2014). Haptoglobin increases with age in rat hippocampus and modulates Apolipoprotein E mediated cholesterol trafficking in neuroblastoma cell lines. *Front Cell Neurosci* 8.

Spalding, K.L., Arner, E., Westermark, P.O., Bernard, S., Buchholz, B.A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783–787.

Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and Dulić, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2109–2117.

Strong, R., Miller, R.A., Astle, C.M., Baur, J.A., de Cabo, R., Fernandez, E., Guo, W., Javors, M., Kirkland, J.L., Nelson, J.F., et al. (2013). Evaluation of resveratrol, green tea extract, curcumin, oxaloacetic acid, and medium-chain triglyceride oil on life span of genetically heterogeneous mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 68, 6–16.

Suh, Y., Atzmon, G., Cho, M.-O., Hwang, D., Liu, B., Leahy, D.J., Barzilai, N., and Cohen, P. (2008). Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 3438–3442.

Sun, J.-B., Holmgren, J., Larena, M., Terrinoni, M., Fang, Y., Bresnick, A.R., and Xiang, Z. (2017). Deficiency in Calcium-Binding Protein S100A4 Impairs the Adjuvant Action of Cholera Toxin. *Front. Immunol.* 8.

Sun, Y., Hu, X., Hu, G., Xu, C., and Jiang, H. (2015). Curcumin Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Premature Senescence via the Activation of SIRT1 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1134–1141.

Svensson, J., Sjögren, K., Fältdt, J., Andersson, N., Isaksson, O., Jansson, J.-O., and Ohlsson, C. (2011). Liver-derived IGF-I regulates mean life span in mice. *PLoS ONE* 6, e22640.

Tang, H.-N., Tang, C.-Y., Man, X.-F., Tan, S.-W., Guo, Y., Tang, J., Zhou, C.-L., and Zhou, H.-D. (2017). Plasticity of adipose tissue in response to fasting and refeeding in male mice. *Nutr Metab (Lond)* 14.

Tang, Y., Wallace, M., Sanchez-Gurmaches, J., Hsiao, W.-Y., Li, H., Lee, P.L., Vernia, S., Metallo, C.M., and Guertin, D.A. (2016). Adipose tissue mTORC2 regulates ChREBP-driven de novo lipogenesis and hepatic glucose metabolism. *Nat Commun* 7, 11365.

Tao, W., and Levine, A.J. (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6937–6941.

Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M., and Garofalo, R.S. (2001). A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 292, 107–110.

Taylor, S., Herrington, S., Prime, W., Rudland, P.S., and Barraclough, R. (2002). S100A4 (p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes. *Br. J. Cancer* 86, 409–416.

Theilgaard-Mönch, K., Jacobsen, L.C., Nielsen, M.J., Rasmussen, T., Udby, L., Gharib, M., Arkwright, P.D., Gombart, A.F., Calafat, J., Moestrup, S.K., et al. (2006). Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood* 108, 353–361.

Theou, O., Stathokostas, L., Roland, K.P., Jakobi, J.M., Patterson, C., Vandervoort, A.A., and Jones, G.R. (2011). The effectiveness of exercise interventions for the management of frailty: a systematic review. *J Aging Res* 2011, 569194.

Thweatt, R., and Goldstein, S. (1993). Werner syndrome and biological ageing: a molecular genetic hypothesis. *Bioessays* 15, 421–426.

Tissenbaum, H.A., and Guarente, L. (2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410, 227–230.

Tran, T.T., Yamamoto, Y., Gesta, S., and Kahn, C.R. (2008). Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab.* 7, 410–420.

Trape, J.F., and Fribourg-Blanc, A. (1988). AHAPTOGLOBINEMIA IN AFRICAN POPULATIONS AND ITS RELATION TO MALARIA ENDEMICITY. *American Journal of Epidemiology* 127, 1282–1288.

- Trevisan, M., Browne, R., Ram, M., Muti, P., Freudenheim, J., Carosella, A.M., and Armstrong, D. (2001). Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population. *Am J Epidemiol* 154, 348–356.
- Trougakos, I.P., Saridakis, A., Panayotou, G., and Gonos, E.S. (2006). Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development* 127, 88–92.
- Tsai, T., Davalath, S., Rankin, C., Radich, J.P., Head, D., Appelbaum, F.R., and Boldt, D.H. (1996). Tumor suppressor gene alteration in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). Analysis of retinoblastoma (Rb) and p53 gene expression in lymphoblasts of patients with de novo, relapsed, or refractory ALL treated in Southwest Oncology Group studies. *Leukemia* 10, 1901–1910.
- Tucker, J.D., Spruill, M.D., Ramsey, M.J., Director, A.D., and Nath, J. (1999). Frequency of spontaneous chromosome aberrations in mice: effects of age. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 425, 135–141.
- Twersky, J., Hoffman, B.B., and Reaven, G.M. (1991). Age-Associated Differences in Beta Adrenergic-Stimulated Lipolysis in Adipocytes From Sprague-Dawley and Fischer 344 Rats. *J Gerontol* 46, B125–B129.
- Umpierrez, G.E., and Pasquel, F.J. (2017). Management of Inpatient Hyperglycemia and Diabetes in Older Adults. *Diabetes Care* 40, 509–517.
- Uranga, A.P., Levine, J., and Jensen, M. (2005). Isotope tracer measures of meal fatty acid metabolism: reproducibility and effects of the menstrual cycle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 288, E547–E555.
- Van Harmelen, V., Röhrig, K., and Hauner, H. (2004). Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metab. Clin. Exp.* 53, 632–637.
- Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R.C., Thomas, T.E., Harley, C.B., and Lansdorp, P.M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9857–9860.
- Veldhuis, J.D., Patrie, J.T., Frick, K., Weltman, J.Y., and Weltman, A. (2004). Sustained growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I responses to prolonged high-dose twice-daily GH-releasing hormone stimulation in middle-aged and older men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 6325–6330.
- Veldhuis, J.D., Patrie, J.M., Frick, K., Weltman, J.Y., and Weltman, A.L. (2005). Administration of recombinant human GHRH-1,44-amide for 3 months reduces abdominal visceral fat mass and increases physical performance measures in postmenopausal women. *Eur. J. Endocrinol.* 153, 669–677.

Vellai, T., Takacs-Vellai, K., Zhang, Y., Kovacs, A.L., Orosz, L., and Müller, F. (2003). Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 426, 620.

Vijg, J., and Suh, Y. (2013). Genome instability and aging. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 645–668.

Villareal, D.T., and Holloszy, J.O. (2004). Effect of DHEA on Abdominal Fat and Insulin Action in Elderly Women and Men: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 292, 2243–2248.

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. *Arch. Intern. Med.* 166, 2502–2510.

Villaret, A., Galitzky, J., Decaunes, P., Estève, D., Marques, M.-A., Sengenès, C., Chiotasso, P., Tchkonja, T., Lafontan, M., Kirkland, J.L., et al. (2010). Adipose Tissue Endothelial Cells From Obese Human Subjects: Differences Among Depots in Angiogenic, Metabolic, and Inflammatory Gene Expression and Cellular Senescence. *Diabetes* 59, 2755–2763.

Viswanadha, S., and Londos, C. (2006). Optimized conditions for measuring lipolysis in murine primary adipocytes. *J. Lipid Res.* 47, 1859–1864.

de Vries, N.M., van Ravensberg, C.D., Hobbelen, J.S.M., Olde Rikkert, M.G.M., Staal, J.B., and Nijhuis-van der Sanden, M.W.G. (2012). Effects of physical exercise therapy on mobility, physical functioning, physical activity and quality of life in community-dwelling older adults with impaired mobility, physical disability and/or multi-morbidity: a meta-analysis. *Ageing Res. Rev.* 11, 136–149.

Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 381, 713–716.

Wang, E. (1995). Senescent Human Fibroblasts Resist Programmed Cell Death, and Failure to Suppress bcl2 Is Involved. *Cancer Res* 55, 2284–2292.

Wang, Z., and Sun, D. (2018). Adipose-derived mesenchymal stem cells: a new tool for the treatment of renal fibrosis. *Stem Cells Dev.*

Wang, H.H., Wang, J.J., Wong, S.Y., Wong, M.C., Li, F.J., Wang, P.X., Zhou, Z.H., Zhu, C.Y., Griffiths, S.M., and Mercer, S.W. (2014). Epidemiology of multimorbidity in China and implications for the healthcare system: cross-sectional survey among 162,464 community household residents in southern China. *BMC Med* 12.

Wang, P., Lv, C., Zhang, T., Liu, J., Yang, J., Guan, F., and Hong, T. (2017a). FOXQ1 regulates senescence-associated inflammation via activation of SIRT1 expression. *Cell Death and Disease* 8, e2946.

Wang, R., Yu, Z., Sunchu, B., Shoaf, J., Dang, I., Zhao, S., Caples, K., Bradley, L., Beaver, L.M., Ho, E., et al. (2017b). Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging Cell* 16, 564–574.

Wang, Y., Chang, J., Liu, X., Zhang, X., Zhang, S., Zhang, X., Zhou, D., and Zheng, G. (2016). Discovery of piperlongumine as a potential novel lead for the development of senolytic agents. *Aging (Albany NY)* 8, 2915–2926.

Wang, Z.-W., Pan, W.-T., Lee, Y., Kakuma, T., Zhou, Y.-T., and Unger, R.H. (2001). The role of leptin resistance in the lipid abnormalities of aging. *The FASEB Journal* 15, 108–114.

Wei, M., Fabrizio, P., Hu, J., Ge, H., Cheng, C., Li, L., and Longo, V.D. (2008). Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet.* 4, e13.

Wei, S., Wei, W., and Sedivy, J.M. (1999). Expression of Catalytically Active Telomerase Does Not Prevent Premature Senescence Caused by Overexpression of Oncogenic Ha-Ras in Normal Human Fibroblasts. *Cancer Res* 59, 1539–1543.

Weintraub, S.J., Prater, C.A., and Dean, D.C. (1992). Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 358, 259–261.

Weng, N.P., Levine, B.L., June, C.H., and Hodes, R.J. (1995). Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11091–11094.

Werner, C., Hanhoun, M., Widmann, T., Kazakov, A., Semenov, A., Pöss, J., Bauersachs, J., Thum, T., Pfreundschuh, M., Müller, P., et al. (2008). Effects of physical exercise on myocardial telomere-regulating proteins, survival pathways, and apoptosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 470–482.

West, M.D., Shay, J.W., Wright, W.E., and Linskens, M.H. (1996). Altered expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during cellular senescence. *Exp. Gerontol.* 31, 175–193.

White, M.C., Holman, D.M., Boehm, J.E., Peipins, L.A., Grossman, M., and Henley, S.J. (2014). Age and Cancer Risk. *Am J Prev Med* 46, S7-15.

Wikby, A., Johansson, B., Ferguson, F., and Olsson, J. (1994). Age-related changes in immune parameters in a very old population of Swedish people: A longitudinal study. *Experimental Gerontology* 29, 531–541.

Wiley, C.D., Schaum, N., Alimirah, F., Lopez-Dominguez, J.A., Orjalo, A.V., Scott, G., Desprez, P.-Y., Benz, C., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2018). Small-molecule MDM2 antagonists attenuate the senescence-associated secretory phenotype. *Scientific Reports* 8, 2410.

Willcox, B.J., Donlon, T.A., He, Q., Chen, R., Grove, J.S., Yano, K., Masaki, K.H., Willcox, D.C., Rodriguez, B., and Curb, J.D. (2008). FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *PNAS* 105, 13987–13992.

Williams, G.C. (1957). Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution* 11, 398–411.

Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., et al. (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368, 32–38.

Wirdefeldt, K., Adami, H.-O., Cole, P., Trichopoulos, D., and Mandel, J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur. J. Epidemiol.* 26 Suppl 1, S1-58.

Wong, A., Boutis, P., and Hekimi, S. (1995). Mutations in the Clk-1 Gene of *Caenorhabditis Elegans* Affect Developmental and Behavioral Timing. *Genetics* 139, 1247–1259.

Wronska, A., Lawniczak, A., Wierzbicki, P.M., Goyke, E., Sledzinski, T., and Kmiec, Z. (2015). White Adipose Tissue Depot-Specific Activity of Lipogenic Enzymes in Response to Fasting and Refeeding in Young and Old Rats. *Gerontology* 61, 448–455.

Wu, D., Ren, Z., Pae, M., Guo, W., Cui, X., Merrill, A.H., and Meydani, S.N. (2007). Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue. *J. Immunol.* 179, 4829–4839.

Wu, J., Niu, J., Li, X., Wang, X., Guo, Z., and Zhang, F. (2014). TGF- β 1 induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via increase of mitochondrial ROS production. *BMC Dev. Biol.* 14, 21.

Xu, M., Tchkonja, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E.R., Pirtskhalava, T., White, T.A., Johnson, K.O., Stout, M.B., Mezera, V., et al. (2015a). JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E6301-6310.

Xu, M., Palmer, A.K., Ding, H., Weivoda, M.M., Pirtskhalava, T., White, T.A., Sepe, A., Johnson, K.O., Stout, M.B., Giorgadze, N., et al. (2015b). Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *Elife* 4, e12997.

Xu, M., Palmer, A.K., Ding, H., Weivoda, M.M., Pirtskhalava, T., White, T.A., Sepe, A., Johnson, K.O., Stout, M.B., Giorgadze, N., et al. (2015c). Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *ELife Sciences* 4, e12997.

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.

Yakar, S., Liu, J.L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., and LeRoith, D. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7324–7329.

Yamaguchi, S., Katahira, H., Ozawa, S., Nakamichi, Y., Tanaka, T., Shimoyama, T., Takahashi, K., Yoshimoto, K., Imaizumi, M.O., Nagamatsu, S., et al. (2005). Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289, E643-649.

Yang, W., and Hekimi, S. (2010). A Mitochondrial Superoxide Signal Triggers Increased Longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* 8.

Yang, P.-M., Tseng, H.-H., Peng, C.-W., Chen, W.-S., and Chiu, S.-J. (2012). Dietary flavonoid fisetin targets caspase-3-deficient human breast cancer MCF-7 cells by induction of caspase-7-associated apoptosis and inhibition of autophagy. *Int. J. Oncol.* 40, 469–478.

Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahar, E., Condiotti, R., et al. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* 7, 11190.

Yoshida, S., Yamahara, K., Kume, S., Koya, D., Yasuda-Yamahara, M., Takeda, N., Osawa, N., Chin-Kanasaki, M., Adachi, Y., Nagao, K., et al. (2018). Role of dietary amino acid balance in diet restriction-mediated lifespan extension, renoprotection, and muscle weakness in aged mice. *Aging Cell* e12796.

Young, A.R.J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F.J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., et al. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 23, 798–803.

Yu, B.P., Masoro, E.J., Murata, I., Bertrand, H.A., and Lynd, F.T. (1982). Life span study of SPF Fischer 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: longevity, growth, lean body mass and disease. *J Gerontol* 37, 130–141.

Zadik, Z., Chalew, S.A., McCarter, R.J., Meistas, M., and Kowarski, A.A. (1985). The influence of age on the 24-hour integrated concentration of growth hormone in normal individuals. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60, 513–516.

Zakaria, R., Platt-Higgins, A., Rath, N., Crooks, D., Brodbelt, A., Chavredakis, E., Lawson, D., Jenkinson, M.D., and Rudland, P.S. (2016). Metastasis-inducing proteins are widely expressed in human brain metastases and associated with intracranial progression and radiation response. *Br. J. Cancer* 114, 1101–1108.

Zdanov, S., Remacle, J., and Toussaint, O. (2006). Establishment of H₂O₂-induced premature senescence in human fibroblasts concomitant with increased cellular production of H₂O₂. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067, 210–216.

Zhang, B., Fu, D., Xu, Q., Cong, X., Wu, C., Zhong, X., Ma, Y., Lv, Z., Chen, F., Han, L., et al. (2018). The senescence-associated secretory phenotype is potentiated by feedforward regulatory mechanisms involving Zscan4 and TAK1. *Nature Communications* 9, 1723.

Zhang, R., Poustovoitov, M.V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., et al. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell* 8, 19–30.

Zhou, X.-H., Brandau, O., Feng, K., Oohashi, T., Ninomiya, Y., Rauch, U., and Fässler, R. (2003). The murine Ten-m/Odz genes show distinct but overlapping expression patterns during development and in adult brain. *Gene Expression Patterns* 3, 397–405.

Zhou, Y., Xu, B.C., Maheshwari, H.G., He, L., Reed, M., Lozykowski, M., Okada, S., Cataldo, L., Coschigamo, K., Wagner, T.E., et al. (1997). A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13215–13220.

Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., and Bishop, J.M. (1998). Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* 12, 2997–3007.

Zhu, W., Wu, Y., Meng, Y.-F., Wang, J.-Y., Xu, M., Tao, J.-J., and Lu, J. (2015a). Effect of curcumin on aging retinal pigment epithelial cells. *Drug Des Devel Ther* 9, 5337–5344.

Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A.C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A.K., Ikeno, Y., Hubbard, G.B., Lenburg, M., et al. (2015b). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14, 644–658.

Zhu, Y., Tchkonja, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H.M., Ling, Y.Y., Stout, M.B., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Johnson, K.O., Giles, C.B., et al. (2016). Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* 15, 428–435.

Zhu, Y., Doornebal, E.J., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Wentworth, M., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Niedernhofer, L.J., Robbins, P.D., Tchkonja, T., and Kirkland, J.L. (2017). New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY)* 9, 955–963.

Zibert, J.R., Skov, L., Thyssen, J.P., Jacobsen, G.K., and Grigorian, M. (2010). Significance of the S100A4 protein in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 130, 150–160.

Zindy, F., Quelle, D.E., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1997). Expression of the p16^{INK4a} tumor suppressor **versus** other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 15, 203–211.

Zwerschke, W., Mazurek, S., Stöckl, P., Hütter, E., Eigenbrodt, E., and Jansen-Dürr, P. (2003). Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochemical Journal* 376, 403–411.

ANNEXE



Diet-induced obesity and associated disorders are prevented by natural bioactive type 1 fish collagen peptides (Naticol®) treatment

Gwendoline Astre¹ · Simon Deleruyelle¹ · Alizée Dortignac¹ · Christelle Bonnet² · Philippe Valet¹ · Cédric Dray¹

Received: 20 November 2017 / Accepted: 12 September 2018
© University of Navarra 2018

Abstract

To fight against metabolic disorders such as insulin resistance, new alimentary behaviors are developed. For instance, hyperproteinated, gluten-free, or collagen-enriched diets could be preconized in order to reduce the consequences of obesity. In this aim, this study evaluates the potential effects of warm sea fish collagen peptides (Naticol®) on representative metabolic and inflammatory parameters. For that, male C57Bl6/J mice fed with either a chow- (CD) or high-fat diet (HFD) were submitted or not to specific collagen peptides in drinking water (4 g/kg bw/d) for 20 weeks. Weight, body composition, glucose tolerance, and insulin sensitivity were followed up. Effects of fish collagen peptides on various blood parameters reflecting the metabolism status were also measured (free fatty acids, triglycerides, cholesterol, hormones) together with adipocyte inflammation. Results showed that HFD-fed mice supplemented by fish collagen peptides exhibited a significant lower increase in body weight as soon as the twelfth week of treatment whereas no effect of the peptide was observed in CD fed mice. In line with this result, a weaker increase in fat mass in HFD-fed mice supplemented with Naticol® at both 9 and 18 weeks of treatment was also observed. In spite of this resistance to obesity promoted by fish collagen peptides treatment, no difference in glucose tolerance was found between groups whereas mice treated with Naticol® exhibited a lower basal glycemia. Also, even if no effect of the treatment on adipocyte lipolysis was found, a decrease of inflammatory cytokines was retrieved in collagen-supplemented group arguing for a potential better insulin sensitivity. Altogether, these results need to be completed but are the first describing a benefic role of warm sea fish collagen peptides in a context of metabolic disease paving the route for a potential utilization in human obesity-associated disorders.

Keywords Collagen · Glycemia · Adipose tissue · Obesity · Low-grade inflammation · Adipokine

Introduction

Obesity is defined as an abnormal or excessive fat accumulation that may impair health. This excess of adipose tissue results in a chronic low-grade inflammatory state (macrophage infiltration, TNF α , IL-6, ...) leading to insulin pathway alteration. Consequently, obesity is strongly associated with insulin resistance, which, when coupled with relative insulin deficiency, leads to the development of type 2 diabetes. As the incidence of diabetes is increasing worldwide and currently affects more

than 194 million individuals [20], it will become one of the major public health concerns in the next decades. Among the different types of diabetes, type 2 diabetes mellitus (T2DM) is highly prevalent, accounting for about 90% of the total diabetic patients [10]. In T2DM, patients often face the problem of lack of insulin sensitivity. Both insulin resistance and β -cell dysfunction are important parameters of T2DM [1]. During the pathogenic process of T2DM, many factors contribute to the development of insulin resistance and β -cell dysfunction including genetic, environmental, and individual behavioral factors, such as overweight, sedentarily, hypertension, and stress.

T2DM is believed to be associated with obesity, considered to be caused by unhealthy eating habits and lifestyle patterns [2, 16]. A large number of studies have reported the strong relationship between obesity/overweight and the onset of type 2 diabetes [7, 18]. Conversely, they have shown that increased physical exercise, weight loss, or adoption of a certain diet may reduce the incidence of T2DM [4, 13].

✉ Cédric Dray
cedric.dray@inserm.fr

¹ Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM U1048, Université de Toulouse, UPS, Toulouse, France

² Weishardt International, Rond-Point Georges Jolimaitre BP 259, 81305 Graulhet, France

In this context, different new alimentation behaviors are considered such as collagen peptides from warm sea fishes. Collagen is the major structural protein present in skins and bones of all animals where it accounts for 30% of the total protein content [8]. Type I and III collagens are synthesized from precursor called pro-collagen which is derived from dermal fibroblasts. Collagen synthesis is increased by transforming growth factor- β (TGF- β), a cytokine that promotes collagen production, and activator protein-1 (AP-1), a transcription factor that promotes collagen breakdown by up regulating matrix metalloproteinases. Collagen is mainly sought for the production of gelatin, a high value functional protein due to its unique gel-forming capacity.

In 2009, Veldhorst et al. [15] reported that gelatin alone or gelatin added with tryptophan and alpha-lactalbumine were 40% more satiating than other proteins (casein, soy, whey, or whey-GMP) and induced a related 20% reduction of subsequent energy intake.

Other studies showed that treatment with dietary cod proteins improved the insulin sensitivity in insulin-resistant individuals and reduced insulin-resistance-related metabolic disorders, contributing to the prevention of T2DM [5, 12]. Treatment with oligopeptides from marine salmon (*Oncorhynchus keta*) skin demonstrated inhibited inflammation by reducing the production of proinflammatory cytokines in mice [22]. More recently, a study showed that oral L-arginine acted as a glucagon-like peptide 1 (GLP-1) to increase postprandial insulin secretion and improve glucose tolerance. An increasing number of studies have been performed to investigate the metabolic effects of dietary proteins on insulin /glucose homeostasis and satiety but until now, there are no conclusions demonstrating the effects of collagen peptides from warm sea fishes on body composition and metabolic parameters (glycemia, insulinemia, cholesterolemia, triglycerides, and free fatty acids), in obese non-insulin dependent type 2 diabetes subjects.

The present article aimed to evaluate the potential effects of warm sea fish collagen peptides on representative metabolic parameters to prompt the development of innovative compounds for the prevention and delay of diabetes and other metabolic-associated disorders.

Materials and methods

Animals

Animals were handled with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research. Male C57Bl6/j mice were obtained from Charles River Laboratory (L'Arbresle, France). Mice were housed conventionally in a constant temperature (20–22 °C) and humidity (50–60%) animal room, with a 12/12 h light/dark cycle and

free access to food and water. In the supplemented diet, Naticol®-2 kDa® (4 g/kg/day) were added to the drinking water (in water, Naticol® have no specific color, taste, or smell). Water intake was first evaluated to use the appropriate dilution of Naticol®. For that purpose, food/water intake was measured 2 days and 6 weeks after the beginning of the treatment. Mice were housed individually on a 12-cm-diameter grid of metabolic cages (BioSeb, Spain). They were given free access to food and water, and the food/water was weighed every 12 h during 48 h, after 24 h of acclimatization. When fed a high fat diet (HFD), energy contents of the specific diets were (percent kilocalories): 20% protein, 70% carbohydrate, 15% fat for CD and 20% protein, 20% carbohydrate, and 60% fat for HFD. The main source of fat in HFD was lard (20 g per 100 g of food). During the treatment, mice were followed every week with measurement of body weight until 20 weeks of treatment.

Body mass composition

To determine fat and lean mass, mice were placed in a clear plastic holder without anesthesia or sedation and inserted into the EchoMRI-3-in-1 system from Echo medical systems (Houston, TX, USA). Total body fat and lean mass as well as water content were measured at 9 and 18 weeks of treatment and whole body fat gain was calculated.

Product

The products used in this study were fish collagen peptides derived from a special enzymatic hydrolysis of fish type I (mainly) and III collagen. The products were provided by WEISHARDT (Graulhet, France), commercially available under the name Naticol®. Naticol®-2 kDa represents a blend of specific fish collagen peptides obtained from warm sea fish skins with a mean molecular weight (Mw) evaluated by standardized GME (Gelatine Manufacturers of Europe, leading association of Europe's foremost gelatine manufacturers supporting the products gelatine and collagen peptides and also informing, educating, and communicating with customers and authorities) method as equal to 2 kDa. Amino acids composition of Naticol is presented in Table 1. Control group in CD and HFD diet received tap water.

Oral glucose tolerance test

OGTT was performed at week 9 and 18 of the protocol. After 6 h fast, mice received glucose (3 g/kg body weight) by gavage through a gastric tube (outer diameter 1.2 mm). Glycemia was monitored from the tail vein 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min after glucose administration, using a glucometer (Accu-check, Roche Diagnostic, Grenoble, France). The area under the curve was calculated.

Table 1 Amino acid composition of Naticol® (Fish collagen peptides, Weishardt). Values are expressed in percentage of each amino acid reported to all amino acids. Tryptophan has been retrieved as traces

	% of amino acid
Glycine	20.9
Proline	12.6
Glutamic acid	11.6
Hydroxyproline	10.5
Arginine	8.9
Alanine	8.3
Aspartic acid	5.1
Lysine	3.5
Serine	3.5
Threonine	2.7
Leucine	2.6
Phenylalanine	2.3
Valine	2.0
Isoleucine	1.5
Hydroxylysine	1.5
Histidine	1.3
Methionine	0.8
Tyrosine	0.4
Cysteine + cystine	0.03

Adipocyte preparation and lipolysis

Isolated adipocytes were obtained after mincing adipose tissue in 5 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 1 mg/mL collagenase and 1% albumin (BSA) for 30 min at 37 °C under shaking. Adipose tissue parts were digested by collagenase (type II, Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO) in order to get isolated adipocytes. Digestion was followed by filtration through a 150-µm screen and the floating adipocytes were separated from the medium containing the stroma vascular fraction and washed twice in DMEM.

Lipolysis was realized in KRHB (Krebs Ringer Hepes buffer with 2% BSA). One hundred microliters of adipocytes (1/10 dilution) were incubated in 1 mL of KRHB for 1 h at 37 °C under gentle shaking in the presence of different concentrations of a lipolytic agent: isoprenaline (a β -adrenergic agonist). The reaction was stopped once the tubes were in ice. Glycerol released in the medium was measured on 30 µL aliquot using the Glycerol Free Reagent kit (Sigma) while non esterified fatty acids (NEFA) were measured on 15 µL of medium by the WAKO NEFA kit (WAKO chemicals).

Plasma parameters

After 12 h overnight fast, Naticol®-treated or untreated mice were killed by cervical dislocation and blood was collected in EDTA-wetted syringes from the descending vena cava. Blood glucose levels were immediately measured with a gluco-meter

(Accu-check Actine, Roche) and plasma was separated by centrifugation at 5000 x g for 10 min. Plasma samples were immediately frozen for further analyses. Plasma-free fatty acids (FFA), cholesterol, and triglycerides (TG) were determined in the fed state at the end of the treatment in 5 µL of plasma collected from the tail blood, by an enzymatic colorimetric technique with the Wako NEFA kit (Wako Chemicals). Plasma insulin and IGF1 levels were measured using an ELISA Kit (Mercodia, Uppsala, Sweden).

Gene expression study

Immediately after euthanasia, adipose tissue was taken and frozen in liquid nitrogen, and total RNAs were isolated using the GeneJET RNA Purification kit (Fermentas). Total RNAs (500 ng) were reverse transcribed using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, UK) in the presence of a random hexamer. The same reaction was performed without Superscript II to estimate DNA contamination. Real-time PCR was performed as previously described (Boucher et al. 2005). Analysis of HPRT expression was performed to normalize gene expression.

Statistical analysis

Data are presented as means $\pm$ SEM. Analysis of differences between groups was performed with Student's *t* test, and *p* < 0.05 was considered to be significant.

Results

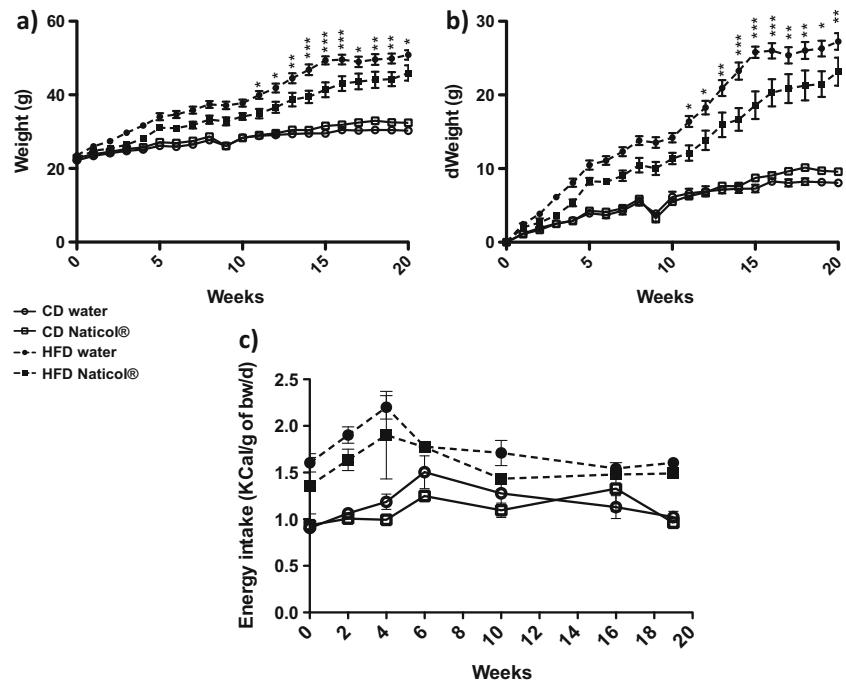
Body weight and composition

Whatever the regimen used (chow diet (CD) or high fat diet (HFD)), the Naticol®-supplemented diet did not alter food or water intake (Fig. 1c). Moreover, in the CD fed groups, the body weight did not vary between the groups during the 20 weeks of the experiment. In the HFD groups, Naticol®-supplemented diet promoted a significantly lower increase in body weight as soon as the twelfth week of treatment (Fig. 1a, b). As shown in Fig. 2, this decrease of body weight is due to a lower increase in fat mass in HF fed mice supplemented with Naticol®. Surprisingly, body composition was significantly altered in Naticol®-supplemented group in CD at week 18 although no variation in total body weight was observed. Whatever the group studied, no significant variation of lean mass and water content was found (Fig. 2b, c).

Plasma metabolic parameters

Regarding the carbohydrate-related parameters, we observed a lower rise in basal plasma glucose levels in

Fig. 1 **a** Body weight time course and **b** variation in body weight time courses of either chow- (empty symbols) and high fat- (full symbols) fed (CD and HFD respectively) mice supplemented with Naticol® (squares) or not (circles). **c** Represents the food intake in CD and HFD mice supplemented or not by Naticol®. Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 6$)



HFD groups when they were Naticol®-supplemented (Fig. 3a). However, no modification of glucose tolerance was obtained after glucose load in the different group of mice (Fig. 4a, b). Other blood metabolic-related parameters have been measured (Fig. 3) and showed that HFD-

fed mice supplemented with collagen exhibited higher levels of triglycerides with lower amount of plasma cholesterol (Fig. 3e, f). Finally, a slight but not significant decrease in plasma insulin was found in the same groups of mice (Fig. 3b).

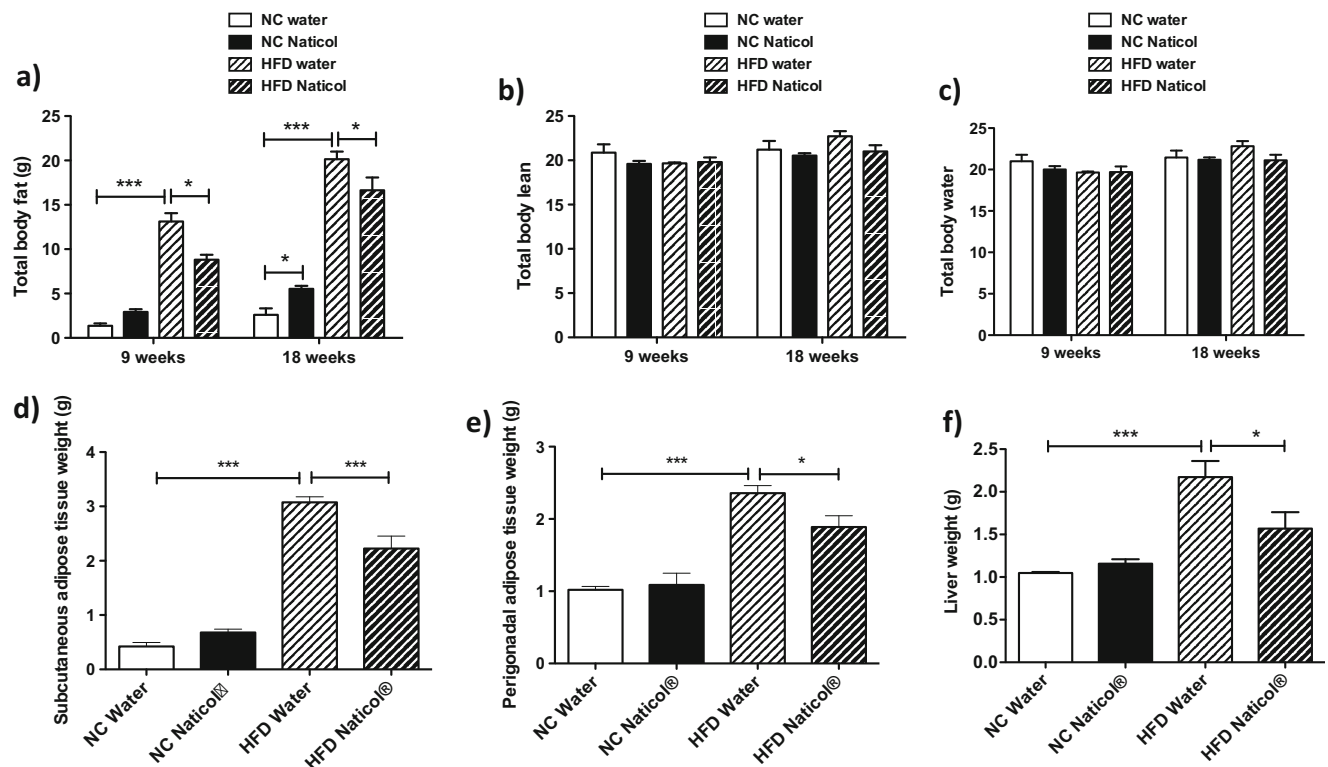


Fig. 2 Assessment of body composition in mice (hatched bar when high fat fed) supplemented 9 and 18 weeks with Naticol® (black bars) or not (white bars). Fat stores **a**, lean mass **b**, and total water **c** are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 6$)

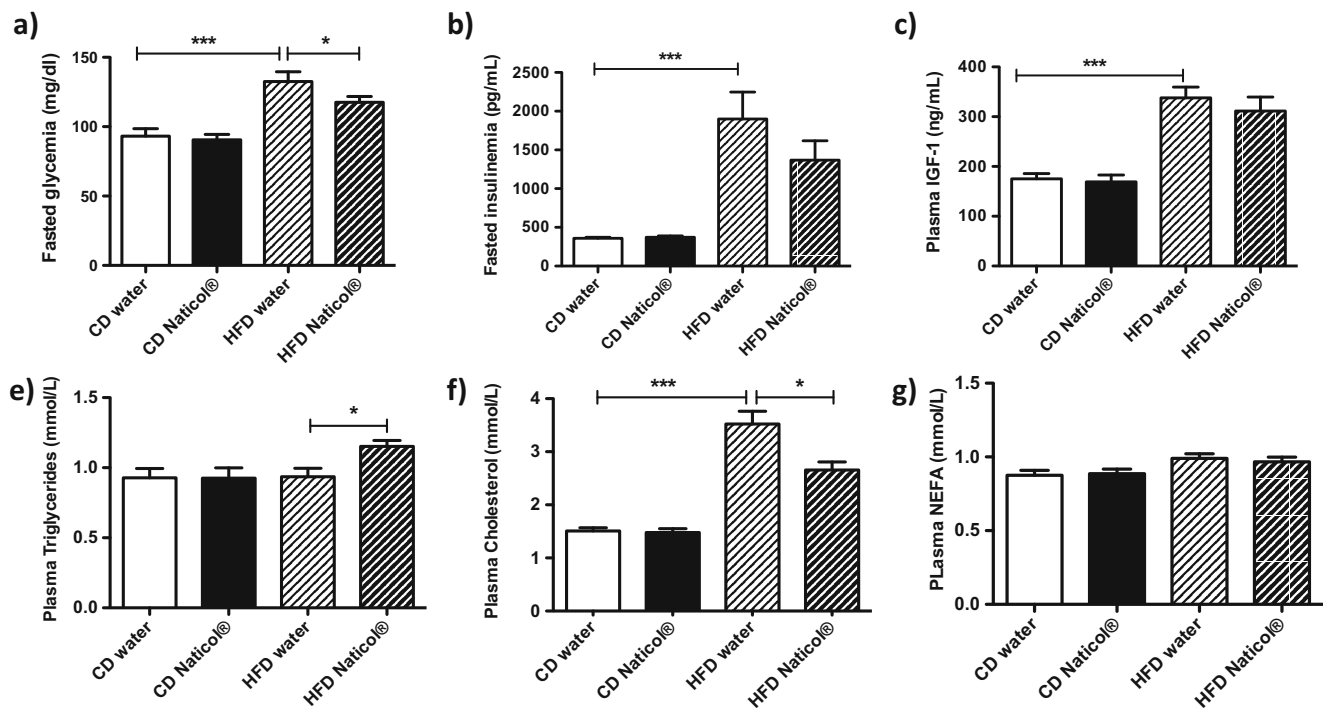


Fig. 3 Blood carbohydrates related and lipids in mice (hatched bar when high fat fed) supplemented 20 weeks with Naticol® (black bars) or not (white bars). Plasma glucose **a**, insulin **b**, IGF-1 **c**, triglycerides **d**, cholesterol **e**, and NEFA **f** are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 6$)

Adipose tissue function and inflammatory profile

To better understand the mechanisms by which Naticol® induced weight gain reduction associated to an enhanced control of plasma glycemia, we measured functional capacities and inflammatory profile in isolated adipocytes (Fig. 5). Surprisingly, in the chow diet group, the lipolytic activity was induced in Naticol®-supplemented mice (Fig. 5a). When fed a high fat diet, no modification of lipolytic activity was observed in adipocytes from both control and Naticol®-supplemented.

In adipocytes collected from Naticol®-supplemented mice, the inflammation-related gene IL6 was decreased in both CD and HFD groups (Fig. 5b). IL-1 β was decrease by Naticol® treatment only in HFD group (Fig. 5c) and TNF- α did not significantly vary (Fig. 5d) while the antidiabetic adipokine apelin was increased (Fig. 5e). No significant variation in the expression of the adipocyte-related gene studied such as leptin, fatty acid binding protein-4 (FABP4), and hormone sensitive lipase (HSL) were observed data not shown.

Discussion

The present data showed the beneficial effects of fish collagen peptides, so-called Naticol®, on body weight and composition under HFD. Fat mass was decreased while lean mass and water content did not show variation in HF-fed mice

supplemented with Naticol® after 9 weeks of treatment. These results were not demonstrated in the CD group treated by fish collagen peptides.

The lower gain of weight and fat mass may be linked to a delay of obesity and consequently an improvement of metabolic factors such as glycemia, insulinemia, and cholesterolemia as described by previous studies [4, 13].

It is also well established that obesity is associated with type 2 diabetes, hypertension, and hyperlipidemia. A moderate weight loss has a beneficial effect on the cardiovascular risk factors associated with obesity [17, 21]. Weight reduction (5–10%) is associated with an improvement in fasting glycemia, blood pressure, and plasma lipid profile/cholesterol levels [14]. The UK Prospective Diabetes Study showed a significant correlation between the amount of weight loss during 3 months' dieting after the diagnosis of type 2 diabetes and the decrease in fasting plasma glucose over the same time period [3, 19]. Vidal et al. also reported that modest weight loss could help to prevent the most common condition associated with obesity: type 2 diabetes [17]. Consequently, the lower rise in plasma glucose and the clear absence of increase in plasma cholesterol levels recorded in HF fed mice supplemented with Naticol® may be correlated to the lower weight gain and the lower rise of fat mass. It is also well documented that dietary supplementation with L-arginin improves glyce-mic control [6]. Collagen is a protein which represents a good source of L-arginin. It may explain the result obtained in HFD for the glyce-mic control in Naticol®-supplemented groups.

Fig. 4 Oral glucose tolerance test in 6-h-fasted mice performed in mice of either chow- (empty symbols) and high fat- (full symbols) fed (CD and HFD respectively) mice supplemented 9 **a** and 18 **b** weeks with Naticol® (squares) or not (circles). Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 6$)

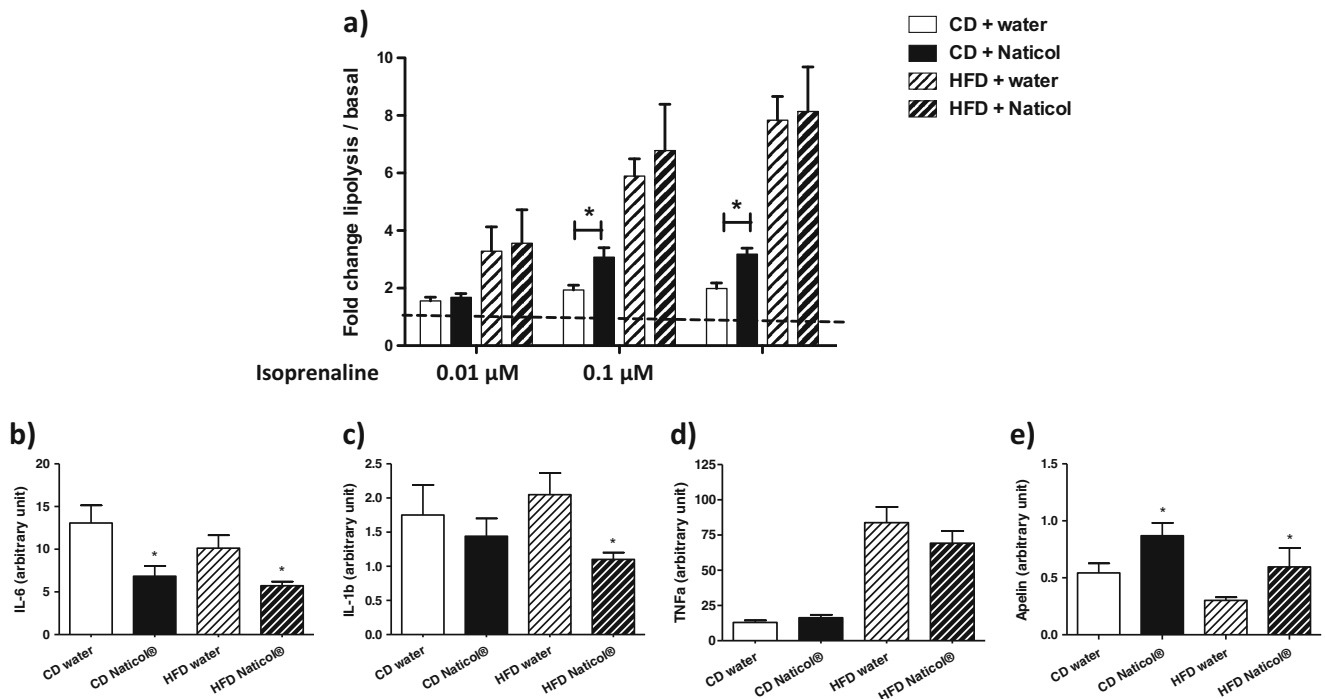
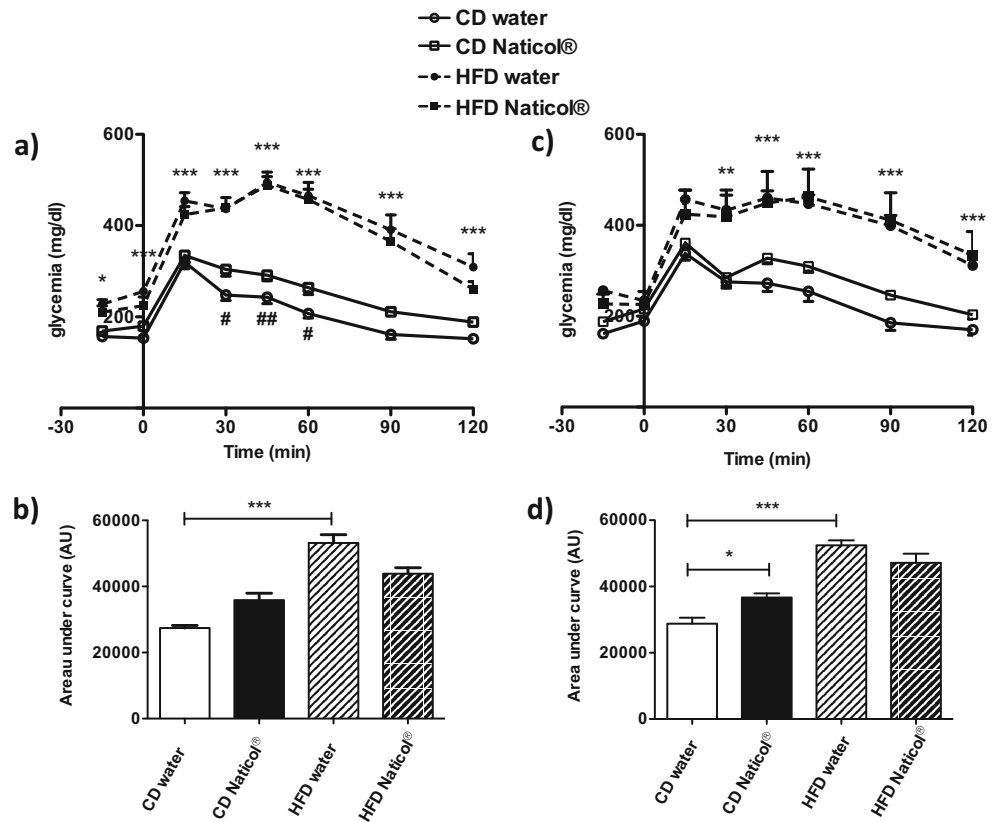


Fig. 5 Functional activity and inflammatory profile in isolated adipocytes. **a** Fold change in glycerol release upon isoprenaline-stimulated lipolysis either chow mice supplemented with Naticol® or not. Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 6$). **b, c, d, e** Gene expression

profile in mice (hatched bar when high fat fed) supplemented 20 weeks with Naticol® (black bars) or not (white bars). Interleukin-6 (IL-6, **b**), Interleukin-1 β (IL-1 β , **c**), Tumor necrosis factor- α (TNF- α , **d**), and apelin mRNA quantifications are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 6$)

Regarding lipid-related parameters, plasma cholesterol was significantly decreased by the treatment under HF conditions. This result suggests that Naticol® may act by reducing cholesterol uptake from alimentation or efflux from liver. Since this effect could be essential to fight against high cholesterolemia-associated pathologies, further experiments are needed to identify the potentials targets of Naticol®. Surprisingly, CD mice chronically submitted to Naticol® exhibited a strong increase of basal adipocyte lipolysis. The explanation may reside in the fact that Naticol®-supplemented mice presented a lower level of glycemia after glucose load and consequently needed to mobilize lipid from adipose tissue.

Results also showed that TNF- α did not significantly vary even if it tended to decrease in Naticol®-supplemented groups, in HFD. However, IL-6 and IL-1 β are reduced in adipose tissue of Naticol® treated mice concomitantly with an increase of the insulin-sensitizer cytokine apelin. These results suggested that Naticol® could directly or indirectly target inflammatory processes to improve metabolism of adipose tissues in non-obese or obese mice. Indeed, IL-1 β is a multifunctional pro-inflammatory cytokine produced by numerous innate immune cells including monocytes and macrophages [11]. Increased circulating IL-1 β concentrations have been associated with greater risk of developing type 2 diabetes [9]. Consequently, the decrease of IL-1 β in adipose tissue of Naticol®-supplemented groups could be correlated with a reduced risk of type 2 diabetes. IL-6 decrease may also suggest a lower state of adiposity and a mechanism to increase insulin sensitivity during the obese insulin-resistant state. Finally, adipose tissue apelin overexpression during Naticol®-supplemented diet indicated that this peptide could be considered as a potential trigger of Naticol® effects at least in adipose.

Even if the targets and the mechanisms used by Naticol® need to be investigated in the future, this study showed the potential effects of warm sea fish collagen peptides, on representative metabolic parameters to prompt the development of innovative natural collagen peptides for the prevention and delay of diabetes and other metabolic-associated disorders.

Acknowledgements We gratefully acknowledge the animal facilities and phenotypage staff (Inserm US006) and the company Weishardt for providing fish collagen peptides, Naticol®.

Funding information This study is financially supported by the Région Midi-pyrénées.

References

- Gloyn AL, McCarthy MI (2008) Genetics: how the UKPDS contributed to determining the genetic landscape of type 2 diabetes. *Diabet Med* 25(Suppl 2):35–40
- Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC (2001) Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med* 345:790–797
- Kelley DE, Wing R, Buonocore C, Sturis J, Polonsky K, Fitzsimmons M (1993) Relative effects of calorie restriction and weight loss in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1287–1293
- Knowler, Barrett-Connor, Fowler, Hamman, Lachin, Walker, Nathan, Diabetes Prevention Program Research (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346:393–403
- Lavigne C, Tremblay F, Asselin G, Jacques H, Marette A (2001) Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E62–E71
- McKnight JR, Satterfield MC, Jobgen WS, Smith SB, Spencer TE, Meininger CJ, McNeal CJ, Wu G (2010) Beneficial effects of L-arginine on reducing obesity: potential mechanisms and important implications for human health. *Amino Acids* 39:349–357
- Meigs JB, Wilson PW, Fox CS, Vasan RS, Nathan DM, Sullivan LM, D'Agostino RB (2006) Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2906–2912
- Sousa SC, Vazquez JA, Perez-Martin RI, Carvalho AP, Gomes AM (2017) Valorization of by-products from commercial fish species: extraction and chemical properties of skin gelatins. *Molecules* 22:E1545
- Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF (2003) Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European prospective investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52:812–817
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW (2005) Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365:1333–1346
- Tiig H, Moschen AR (2008) Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med* 14:222–231
- Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A (2003) Dietary cod protein restores insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and GLUT4 translocation to the T-tubules in skeletal muscle of high-fat-fed obese rats. *Diabetes* 52:29–37
- Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukkaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M, Finnish Diabetes Prevention Study (2001) Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344:1343–1350
- Van Gaal LF, Wauters MA, De Leeuw IH (1997) The beneficial effects of modest weight loss on cardiovascular risk factors. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21(Suppl 1):S5–S9
- Veldhorst MA, Nieuwenhuizen AG, Hochstenbach-Waelen A, van Vught AJ, Westerterp KR, Engelen MP, Brummer RJ, Deutz NE, Westerterp-Plantenga MS (2009) Dose-dependent satiating effect of whey relative to casein or soy. *Physiol Behav* 96:675–682
- Vereecken CA, Todd J, Roberts C, Mulvihill C, Maes L (2006) Television viewing behaviour and associations with food habits in different countries. *Public Health Nutr* 9:244–250
- Vidal J (2002) Updated review on the benefits of weight loss. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(Suppl 4):S25–S28
- Wannamethee SG, Shaper AG, Walker M (2005) Overweight and obesity and weight change in middle aged men: impact on cardiovascular disease and diabetes. *J Epidemiol Community Health* 59:134–139
- Wing RR, Blair EH, Bononi P, Marcus MD, Watanabe R, Bergman RN (1994) Caloric restriction per se is a significant factor in improvements in glycemic control and insulin sensitivity during weight loss in obese NIDDM patients. *Diabetes Care* 17:30–36

20. Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Goico J, Ochoa C, Marroquin A, Tan S, Hodis HN, Azen SP, Buchanan TA (2004) Pharmacological treatment of insulin resistance at two different stages in the evolution of type 2 diabetes: impact on glucose tolerance and beta-cell function. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2846–2851
21. Zhu CF, Peng HB, Liu GQ, Zhang F, Li Y (2010) Beneficial effects of oligopeptides from marine salmon skin in a rat model of type 2 diabetes. *Nutrition* 26:1014–1020
22. Zoetendal EG, Vaughan EE, de Vos WM (2006) A microbial world within us. *Mol Microbiol* 59:1639–1650