

Rejuvant®, une formulation de composé potentiellement prolongeant la vie avec de l'alpha-cétoglutarate et des vitamines, a conféré une réduction moyenne de 8 ans du vieillissement biologique, après une moyenne de 7 mois d'utilisation, dans le test de méthylation de l'ADN TruAge

Oleksandr Demidenko^{1,*}, Diogo Barardo^{2,*}, Valery Budovskii¹, Robb Finnemore³, Francis R. Palmer III³, Brian K. Kennedy^{2,3,4,5}, Yelena V. Budovskaya¹

¹TruMe Inc., Alameda, CA 94502, États-Unis

²Healthy Longevity Translational Research Program, Yong Loo Lin School of Medicine, National University Singapore, Singapour 117456, Singapour ³Ponce de Leon Health, Fernandina, FL 32034, États-Unis ⁴Centre for Healthy Longevity, National University Health System, Singapour 117456, Singapour

⁵Institut des sciences cliniques de Singapour, A*STAR, Singapour 117609, Singapour

*Cotisation égale

Écrire à : Brian K. Kennedy, Yelena V. Budovskaya ; e-mail : bkennedy@nus.edu.sg, yelena@trumelabs.com Mots clés : vieillissement, méthylation de l'ADN, alpha-cétoglutarate (AKG), âge biologique, Rejuvant Reçu : 5 octobre 2021 Accepté : 15 novembre 2021
Publié : 30 novembre 2021

Droits d'auteur : © 2021 Demidenko et al. Ceci est un article en libre accès distribué sous les termes de la licence [Creative Commons Attribution \(CC BY 3.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/), qui autorise l'utilisation, la distribution et la reproduction sans restriction sur tout support, à condition que l'auteur et la source originaux soient crédités.

ABSTRAIT

La recherche se poursuit pour des interventions possibles qui retardent et/ou inversent le vieillissement biologique, ce qui entraîne une prolongation de la durée de vie et de la santé. Les interventions retardant le vieillissement dans les modèles animaux sont bien établies ; cependant, la plupart manquent de validation chez l'homme. La longueur de la durée de vie humaine rend impossible la réalisation d'une analyse de survie. Au lieu de cela, des biomarqueurs de vieillissement, tels que les horloges de méthylation de l'ADN (ADNm), ont été développés pour surveiller l'âge biologique. Nous rapportons ici une analyse rétrospective de l'âge de méthylation de l'ADN chez 42 personnes prenant Rejuvant®, une formulation à base d'alpha-cétoglutarate, pendant une période moyenne de 7 mois. Des tests ADN_m ont été effectués au départ et à la fin du traitement avec la supplémentation en Rejuvant®. Remarquablement, les individus ont montré une diminution moyenne du vieillissement biologique de 8 ans (p-value=6.538x10⁻¹²). De plus, la supplémentation en Rejuvant® est robuste aux différences individuelles, comme l'indique le fait qu'une grande majorité des participants ont diminué leur âge biologique. De plus, nous avons constaté que Rejuvant® présente un avantage supplémentaire pour les personnes chronologiquement et biologiquement plus âgées. Bien que des tests continus, en particulier dans une conception contrôlée par placebo, soient nécessaires, l'inversion de près de 8 ans de l'âge biologique des personnes prenant Rejuvant® pendant 4 à 10 mois est remarquable, faisant du cocktail de produits naturels un candidat intrigant pour affecter le vieillissement humain.

INTRODUCTION

Le vieillissement est un processus biologique quasi universel qui se manifeste par un déclin général de la santé et de la vitalité, menant éventuellement à la mort. Le vieillissement est associé au développement d'un large éventail de maladies chroniques, notamment le cancer, la maladie d'Alzheimer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et de nombreuses autres affections [1, 2]. Si le vieillissement

est retardé, l'apparition de maladies chroniques sera prévenue, la capacité fonctionnelle maintenue et, selon toute vraisemblance, les complications dues aux maladies infectieuses, telles que le Covid 19 et la grippe, réduites [3]. En bref, les humains auront une espérance de vie et une espérance de vie plus longues.

Le vieillissement est généralement mesuré chronologiquement en années, avec une survie humaine médiane de l'ordre de

huit décennies. Si nous espérons contrôler le processus de vieillissement, nous devons apprendre à mesurer le taux de vieillissement sur des périodes plus courtes. De plus, le vieillissement progresse à des rythmes différents selon les individus. Notre véritable âge biologique est influencé par de nombreux facteurs supplémentaires, tels que les antécédents génétiques, le mode de vie et la maladie. Pour relever ce défi, plusieurs marqueurs biologiques du vieillissement ont été développés. Ces marqueurs sont des ensembles uniques de molécules ou des changements dans l'état épigénétique de l'ADN d'un individu qui reflètent son état de vieillissement actuel [4–6]. Parmi les biomarqueurs les plus prometteurs du processus de vieillissement figurent les schémas de méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique qui joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes, le développement de l'organisme et la maladie [7, 8].

La méthylation des résidus de lysine dans les histones centrales, H3 et H4, initie une modification conformationnelle de la structure de la chromatine qui est associée à des changements dans l'activité transcriptionnelle. Cependant, la marque épigénétique la plus étudiée est la méthylation directe de l'ADN lui-même. Cette modification implique la conversion de la cytosine en 5'-méthylcytosine, catalysée par les ADN méthyltransférases, et se produit généralement dans les séquences de dinucléotides CpG (CpG). Ces séquences CpG, regroupées dans des régions appelées îlots CpG (CGI), se retrouvent le plus souvent dans des promoteurs de gènes domestiques [9, 10]. Il a été démontré que l'hyperméthylation des îlots CpG est liée au silence transcriptionnel, tandis que les îlots CpG déméthylés sont plus souvent trouvés au cours de l'embryogenèse et servent de marque de gènes activement transcrits. Au cours du vieillissement, deux types de changements dans la méthylation de l'ADN ont été observés et soigneusement caractérisés : (1) la dérive épigénétique, ou changements stochastiques progressifs dans les schémas de méthylation de l'ADN entre les individus qui se produisent avec l'âge [11], et (2) l'horloge épigénétique - une mesure dérivée de la méthylation de l'ADN qui est fortement corrélée à l'âge chronologique et proposée pour mesurer l'âge biologique [9, 12, 13].

L'horloge épigénétique est un biomarqueur attrayant du vieillissement car elle s'applique à la plupart des tissus humains, capturant des aspects de l'âge biologique tels que la fragilité [14], la forme cognitive/physique chez les personnes âgées [15], l'accélération de l'âge dans l'obésité [16], le vieillissement prématuré dans le syndrome de Down [17] et l'infection par le VIH [18], la maladie de Parkinson [19] et les neuropathologies liées à la maladie d'Alzheimer [20], ainsi que le cancer [21] et le stress au cours de la vie [22]. Les marqueurs du vieillissement biologique représentent un outil important pour valider cliniquement les effets des interventions basées sur la longévité. Pour la première fois, ces biomarqueurs du vieillissement donnent aux scientifiques l'opportunité d'étudier les effets des composés anti-âge en temps réel et directement chez l'homme. L'un des avantages de ce type de mesure est qu'elle permet de mesurer l'âge biologique en temps réel et directement chez l'homme.

composé découvert à ce jour est l'alpha-cétoglutarate (AKG) [23].

L'AKG est un métabolite intermédiaire endogène du cycle de Krebs dont les niveaux diminuent naturellement au cours du vieillissement. AKG est impliqué dans de multiples voies métaboliques et cellulaires. Ceux-ci incluent le fonctionnement comme une (une) molécule de signalisation, un donneur d'énergie, un précurseur dans la biosynthèse des acides aminés et un régulateur des processus épigénétiques et de la signalisation cellulaire via la liaison aux protéines [24-26]. Le déficit en AKG en cellules souches et progénitrices augmente avec l'âge [27]. À mesure que les animaux vieillissent, la fonction mitochondriale est progressivement altérée et le flux métabolique cellulaire dans les mitochondries diminue, ce qui exacerbe le déficit en AKG. Chin et al. ont rapporté que l'AKG augmentait la durée de vie de *C. elegans* [28]. Sur la base de ces résultats, l'AKG (et le sel de calcium) combinés à d'autres composés généralement reconnus comme sûrs (GRAS) ont été étudiés chez la souris. La souris non génétiquement modifiée est le modèle mammifère préféré pour étudier le vieillissement, puisque les processus biochimiques impliqués dans le vieillissement des souris peuvent s'appliquer à d'autres mammifères, y compris les humains [29]. Dans une étude récente, parrainée par Ponce de Leon Health et réalisée au Buck Institute for Research on Aging, l'effet de l'alpha-cétoglutarate (livré sous forme de sel de calcium - CaAKG) sur la santé et la durée de vie des souris C57BL/6 était signalé. Les auteurs ont montré que chez la souris, l'AKG réduisait la fragilité et augmentait la longévité, indiquant une compression de la morbidité [23]. Ces découvertes et d'autres suggèrent que l'AKG pourrait être un candidat idéal pour les études humaines pro-longévité.

Dans cette étude, nous avons examiné l'association transversale et longitudinale entre l'horloge épigénétique, l'état de santé, la condition physique et les effets de la prise de Rejuvant® (CaAKG à libération prolongée + une vitamine spécifique selon le sexe) sur le vieillissement biologique humain.

Nous avons suivi 42 personnes en bonne santé autodéclarées qui avaient pris une supplémentation en AKG pendant une période de 4 à 10 mois. Les effets de l'AKG sur le vieillissement biologique et la corrélation possible d'autres effets physiologiques sont discutés.

RÉSULTATS

Pour cette étude, nous avons examiné 42 participants qui avaient choisi de prendre Rejuvant® pendant une période de 4 à 10 mois. Tous les participants prenaient activement le produit Rejuvant®. La nécessité de faire suivre cette étude d'une étude contrôlée contre placebo est décrite dans la Discussion. Les caractéristiques générales de cette cohorte sont décrites dans le tableau 1. Tous les participants ont déclaré un état de santé bon ou excellent sans aucune condition médicale chronique.

Un âge biologique plus jeune au départ et

Tableau 1. Caractéristiques descriptives des participants à l'étude.

Nombre total de participants	42
Genre féminin masculin)	14/ 28
Femme:	
Âge chronologique (médian ; intervalle)	64,09 ; 43,49 à 72,46
Âge biologique au départ (médiane ; intervalle)	62,15 ; 46,4 à 73
Âge biologique à T7* (médiane ; intervalle)	55,55 ; 33,4 à 63,7
Homme:	
Âge chronologique (médian ; intervalle)	62,78 ; 41,31 à 79,57
Âge biologique au départ (médiane ; intervalle)	61,85 ; 41,9 à 79,7
Âge biologique à T7* (médiane ; intervalle)	53,3 ; 33 à 74,9

*Indique l'âge biologique tel que mesuré par le test TruMe après une moyenne de sept mois de traitement.

continué à fumer tout au long de l'étude. La majorité des participants à l'étude (66,7 %, n = 28) étaient des hommes. L'âge chronologique moyen de cette cohorte était d'environ 63 ans.

Pour les 42 participants, nous avons pu mesurer l'âge biologique de base à l'aide du modèle de prédiction de l'âge TruMe avant qu'ils ne commencent à prendre Rejuvant®. Nous avons utilisé le modèle de prédiction TruAge avec séquençage Sanger pour l'analyse de la méthylation de l'ADN. Au total, 3 gènes dont 9 sites CpG ont été analysés par le séquençage Sanger. Les valeurs de méthylation de l'ADN obtenues pour tous les sites CpG ont été incluses dans le modèle de prédiction de l'âge TruMe (en attente de publication).

Nous avons évalué l'erreur de prédiction du test épigénétique TruAge, comme décrit précédemment. La comparaison des valeurs d'âge prévues et réelles donne une erreur absolue médiane de 4,23 ans. L'erreur moyenne de 0,35 an montre que cette population dans son ensemble pourrait être légèrement plus jeune que prévu. Il est connu que la normalisation avant le traitement des ensembles de données de méthylation de l'ADN et leur variance d'âge peuvent biaiser la différence entre l'âge estimé et l'âge chronologique. Une mesure de la robustesse à ces facteurs implique le calcul des résidus d'une régression linéaire de l'âge prédit par rapport à l'âge réel. Nous avons constaté que l'âge estimé avait un coefficient de régression de 0,88 et que la régression linéaire (ligne ajustée à la figure 1) affichait un R-carré ajusté de 0,59 avec une erreur absolue médiane de 3,97 ans. Enfin, nous avons également trouvé une corrélation linéaire de Pearson statistiquement significative (valeur $p = 2,026 \times 10^{-9}$) de 0,77 (IC à 95 % : 0,61 à 0,87) entre l'âge estimé et réel de notre cohorte au départ.

Nous avons également examiné s'il y avait un biais sexuel dans l'évaluation de l'âge biologique en analysant les hommes (28) et les femmes (14) séparément. En suivant la même procédure que précédemment, pour les hommes, nous avons trouvé une erreur absolue médiane de

l'âge prédit par rapport à l'âge réel de 4,92 ans et une erreur moyenne de -0,22 ans. L'erreur absolue médiane de la régression linéaire était de 4,64 ans, avec un R au carré ajusté de 0,6 et un coefficient de régression de 0,90 (Figure 2). De plus, l'âge estimé et réel au départ pour les hommes étaient corrélés linéairement (valeur $p = 7,74 \times 10^{-7}$) avec une amplitude de 0,78 (IC à 95 % : 0,58 à 0,9). Pour les femmes, la procédure de régression analogue a affiché une erreur absolue médiane de 3,887 ans, avec un R-carré ajusté de 0,51 et un coefficient de régression de 0,83 (Figure 2). De plus, nous avons trouvé une erreur absolue médiane de l'âge prédit par rapport à l'âge réel de 3,41 ans. L'erreur moyenne de 1,48 ans pourrait indiquer que les femmes de notre cohorte sont susceptibles d'être plus jeunes que prévu. Pour explorer cela, nous avons appliqué une régression multilinéaire avec le sexe comme variable supplémentaire à l'ensemble de notre cohorte. Le sexe ne s'est pas avéré être un prédicteur statistiquement significatif de l'âge chronologique au départ (tableau 2). De plus, il y avait une corrélation linéaire statistiquement significative (valeur de $p = 0,002$) de 0,74 (IC à 95 % : 0,35 à 0,91) entre l'âge estimé et l'âge réel au départ pour les femmes. En conclusion, dans le contexte de cet ensemble de données limité, il n'y avait pas de différence statistique dans la capacité prédictive du test épigénétique TruAge par rapport aux hommes et aux femmes.

Les participants ont répondu à un sondage au début et à la fin de l'essai. Ce questionnaire autodéclaré comprenait des informations sur l'alimentation, la consommation d'alcool, la consommation antérieure de Rejuvant®, la santé, la taille et le poids (ce qui permettait d'estimer l'IMC), la durée du sommeil, le statut tabagique, la fréquence d'exercice, le niveau d'activité physique, la fréquence des repas, les collations fréquence, nombre de compléments alimentaires supplémentaires consommés et fréquence, état des cheveux, éducation, mode de vie sain et confiance dans les compléments alimentaires (tableau supplémentaire 1).

Nous avons tiré parti des informations de l'enquête de base pour vérifier s'il y avait d'autres facteurs de confusion dans notre cohorte, en effectuant

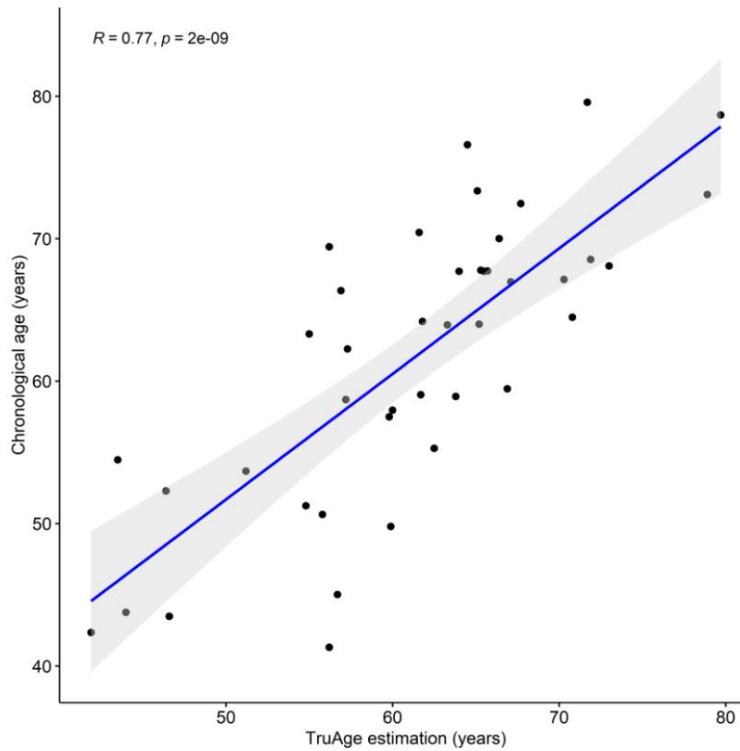


Figure 1. L'estimation de l'âge TruAge et l'âge chronologique de référence sont linéairement corrélés. L'âge biologique TruAge est hautement (R-carré ajusté = 0,77) statistiquement significatif (valeur de $p = 2 \times 10^{-9}$) corrélé avec l'âge chronologique des 42 patients.

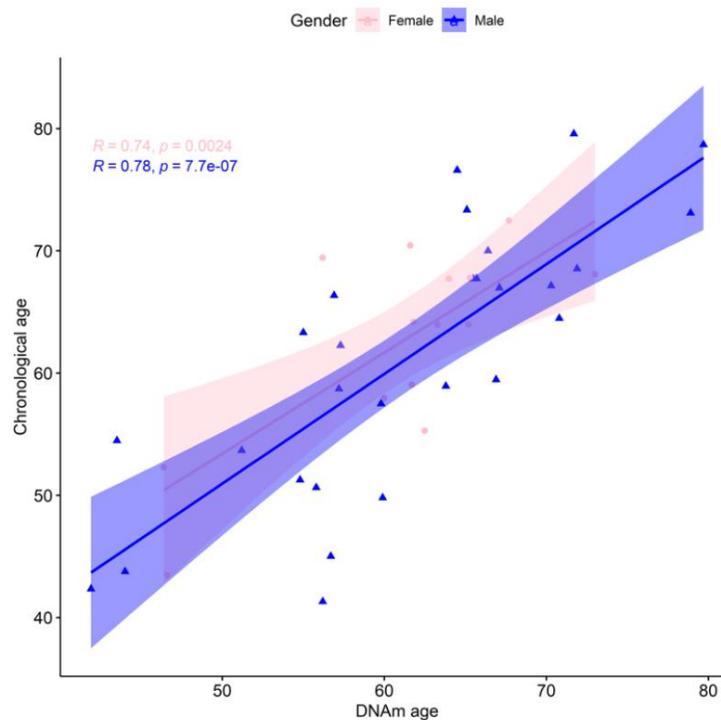


Figure 2. L'estimation de l'âge TruAge et l'âge chronologique de référence sont linéairement corrélés, dans les deux sexes. L'axe des x représente l'âge de méthylation de l'ADN estimé par TruAge, et l'axe des y l'âge chronologique des 42 patients au départ. Les tracés de corrélation linéaire rose et bleu illustrent la corrélation linéaire statistiquement significative similaire entre les deux axes, pour les patients féminins et masculins, respectivement.

Tableau 2. Effet du Rejuvant® sur l'âge biologique des participants à l'étude.

Répartition par âge biologique	Participants masculins (en années)	Participants féminins (en années)	41,9 46,4
Âge biologique minimum au départ			
Âge biologique médian au départ	61,85	62,15	
Âge biologique moyen au départ	61,38	61,09	
Âge biologique maximal au départ	79,7	73	
Âge biologique minimum à T7*	33	33,4	
Âge biologique médian à T7*	53,3	55,55	
Âge biologique moyen à T7*	53,53	54,66	
Âge Biologique Maximum à T7*	74,9	63,7	
Changement minimum de l'âge biologique	-1,86	-0,41	
Changement médian de l'âge biologique	7,09	5,83	
Changement moyen de l'âge biologique	8,44	6,98	
Changement maximal de l'âge biologique	22,7	14,09	

*Indique l'âge biologique tel que mesuré par le test TruMe après une moyenne de sept mois de traitement.

une régression linéaire multivariable. En raison du nombre considérable de variables prédictives, nous avons effectué une régression linéaire pas à pas. Bien qu'il y ait eu des covariables supplémentaires sélectionnées dans le modèle pas à pas, lorsque cela a été comparé, au moyen d'une analyse de variance, avec la régression linéaire univariée plus simple utilisant uniquement l'âge estimé TruAge, la valeur p obtenue était de 0,12 (tableau supplémentaire 2). Cela indique qu'en termes de comparaison, les deux modèles ne sont pas statistiquement significativement différents et, par conséquent, le modèle le plus simple a été sélectionné.

Il était intéressant de déterminer si la différence entre l'âge chronologique et TruAge est liée au mode de vie ou à des facteurs démographiques. En d'autres termes, il est important d'évaluer si ces covariables sont associées à des individus biologiquement plus jeunes ou plus âgés. Nous avons sélectionné l'IMC, la consommation d'alcool, l'état de santé auto-évalué, la durée du sommeil, les antécédents de tabagisme, la fréquence et l'intensité de l'exercice et l'abondance des cheveux comme variables prédictives, car ce sous-ensemble des informations recueillies dans le cadre de l'enquête peut clairement être associé à et/ou influencer l'âge biologique. La régression linéaire pas à pas n'a trouvé aucune association statistiquement significative entre l'une de ces variables et la différence entre l'âge biologique chronologique et TruAge (tableau supplémentaire 2). Il convient de noter que le nombre de participants est assez faible (par exemple, il y avait un fumeur et seulement 6 ont déclaré avoir fumé). Par conséquent, il est probable qu'un ou plusieurs de ces paramètres de style de vie influencent l'âge biologique tel que mesuré par le test TruAge et qu'un ensemble de données plus important permettrait de découvrir des associations.

Résultats de la consommation de CaAKG sur l'âge biologique

Le but de l'étude était de déterminer l'effet de
Supplémentation en Rejuvant® sur le vieillissement biologique humain

en mesurant la méthylation de l'ADN. Suite à la mesure de base, chaque participant à l'étude a reçu du Rejuvant® pour la durée de l'étude. Même s'il était conseillé aux participants d'utiliser le traitement pendant 4 à 6 mois, il y avait des différences individuelles considérables dans la durée du traitement. À la fin de la période de traitement choisie par eux-mêmes, les participants ont soumis leurs échantillons de salive pour l'analyse de leur âge biologique à l'aide de tests TruMe disponibles dans le commerce.

Sur la base des questionnaires soumis au départ et à la fin de l'essai, nous avons identifié un sous-ensemble de 13 personnes qui n'ont signalé aucun changement dans le type de régime alimentaire, la fréquence de consommation, la consommation de compléments alimentaires supplémentaires, la durée du sommeil et la fréquence de l'exercice. Ce sous-ensemble homogène a donc été utilisé pour l'évaluation préliminaire de l'effet indépendant du CaAKG, les autres covariables étant contrôlées par conception.

Au départ, ce sous-ensemble ou notre cohorte était en moyenne de 2,06 ans biologiquement plus jeune que son âge chronologique. À la fin du traitement, cette sous-population était en moyenne de 9,74 ans biologiquement plus jeune que son âge chronologique respectif. En utilisant le test t unilatéral de Welch à deux échantillons appariés, cette différence de moyenne de 7,69 ans s'est avérée statistiquement significative, avec une valeur p de $7,263 \times 10^{-5}$ (Figure 3). Il est à noter que tous les sujets de ce petit groupe ont diminué leur âge biologique.

Après avoir découvert que la supplémentation en CaAKG diminuait systématiquement l'âge épigénétique dans une petite population homogène, nous avons continué en évaluant ses effets sur l'ensemble de la cohorte de 42 patients. Au départ, la cohorte était en moyenne de 0,35 an biologiquement plus jeune que son âge chronologique. À la fin du traitement, cette valeur est passée à une moyenne de 8,31 ans biologiquement plus jeune que leurs parents respectifs.

âge chronologique. En utilisant le test t unilatéral de Welch à deux échantillons appariés, cette différence de moyenne de 7,96 ans s'est avérée statistiquement significative, avec une valeur de p de $6,538 \times 10^{-12}$ (Figure 4).

La formulation du supplément Rejuvant® est elle-même différente pour les hommes et les femmes. Plus précisément, en plus du CaAKG, de la vitamine A et de la vitamine D sont ajoutées

à la formulation commerciale pour hommes ou pour femmes, respectivement (voir Méthodes). Quoi qu'il en soit, l'effet de la supplémentation en Rejuvant® diminue l'âge épigénétique de manière statistiquement significative chez les hommes et les femmes (Figure 5). La diminution moyenne appariée est de 8,44 ans chez les hommes et de 6,98 ans chez les femmes. Seuls 2 individus (1 mâle et 1 femelle) ont présenté une légère augmentation de l'âge biologique.

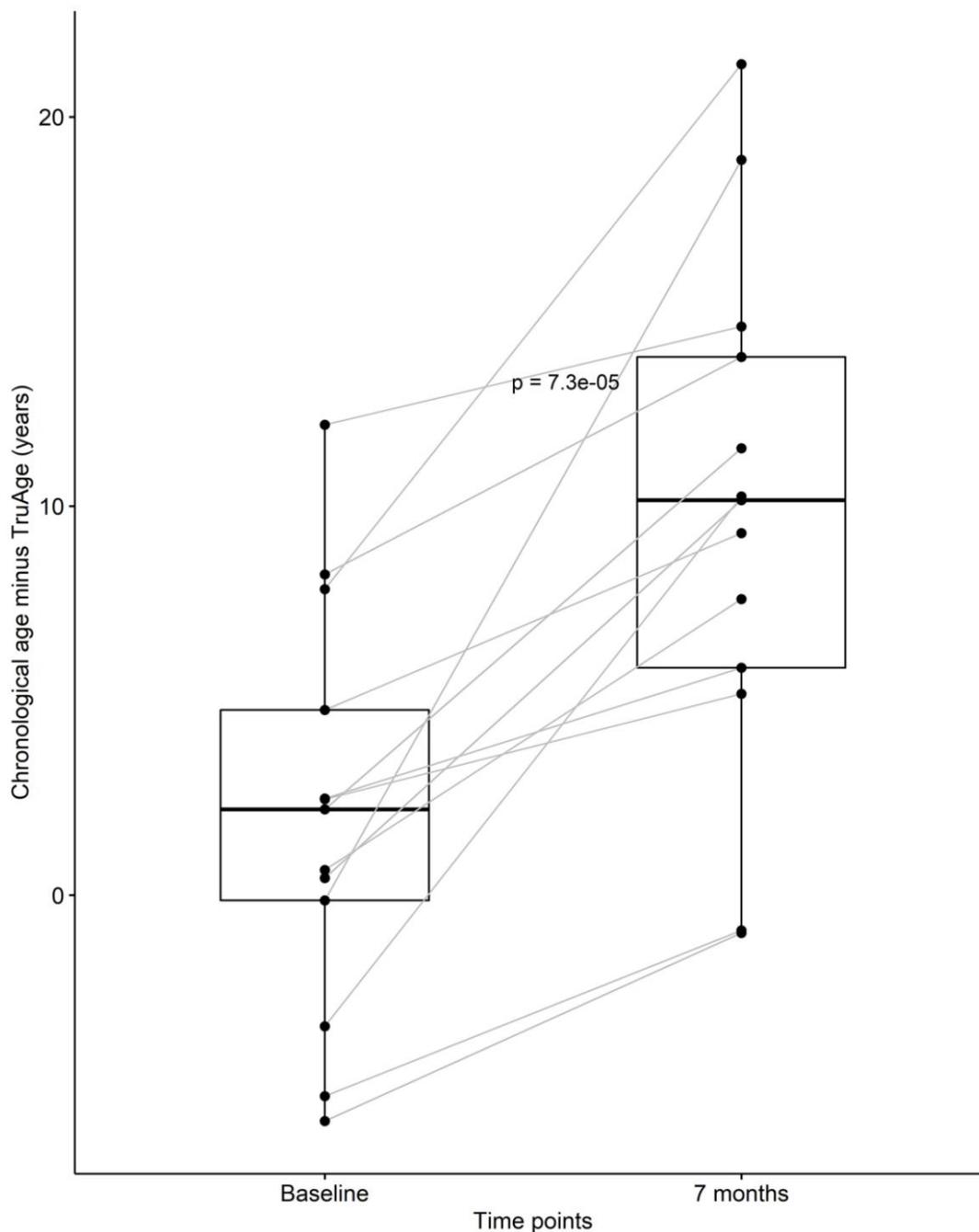


Figure 3. CaAKG a diminué l'âge de méthylation parmi une sous-population homogène. Les diagrammes en boîte appariés représentent les effets du traitement au niveau du patient et du groupe ($n = 13$), entre le début et la fin de l'essai (dont la durée moyenne était de 7 mois). Les diagrammes en boîte représentent la médiane et les 25e et 75e quartiles.

La validité de l'analyse statistique utilisant l'ensemble de la cohorte repose sur la modélisation des covariables, pour la détection des variables qui entraînent une différence statistiquement significative dans le test de méthylation de l'ADN TruMe, nous avons utilisé des régressions pas à pas de manière itérative. Cette procédure a abouti au modèle le plus parcimonieux utilisant uniquement l'âge chronologique de référence, et la

les âges chronologique et biologique de base, comme seuls prédicteurs statistiquement significatifs de l'ampleur de la diminution de l'âge épigénétique par Rejuvant®. En conséquence, nous avons modélisé l'effet de la supplémentation en Rejuvant® sur l'âge de méthylation comme une régression linéaire de ces deux variables. Ces données indiquent que les personnes ayant un âge biologique plus élevé (par rapport à leur âge chronologique)

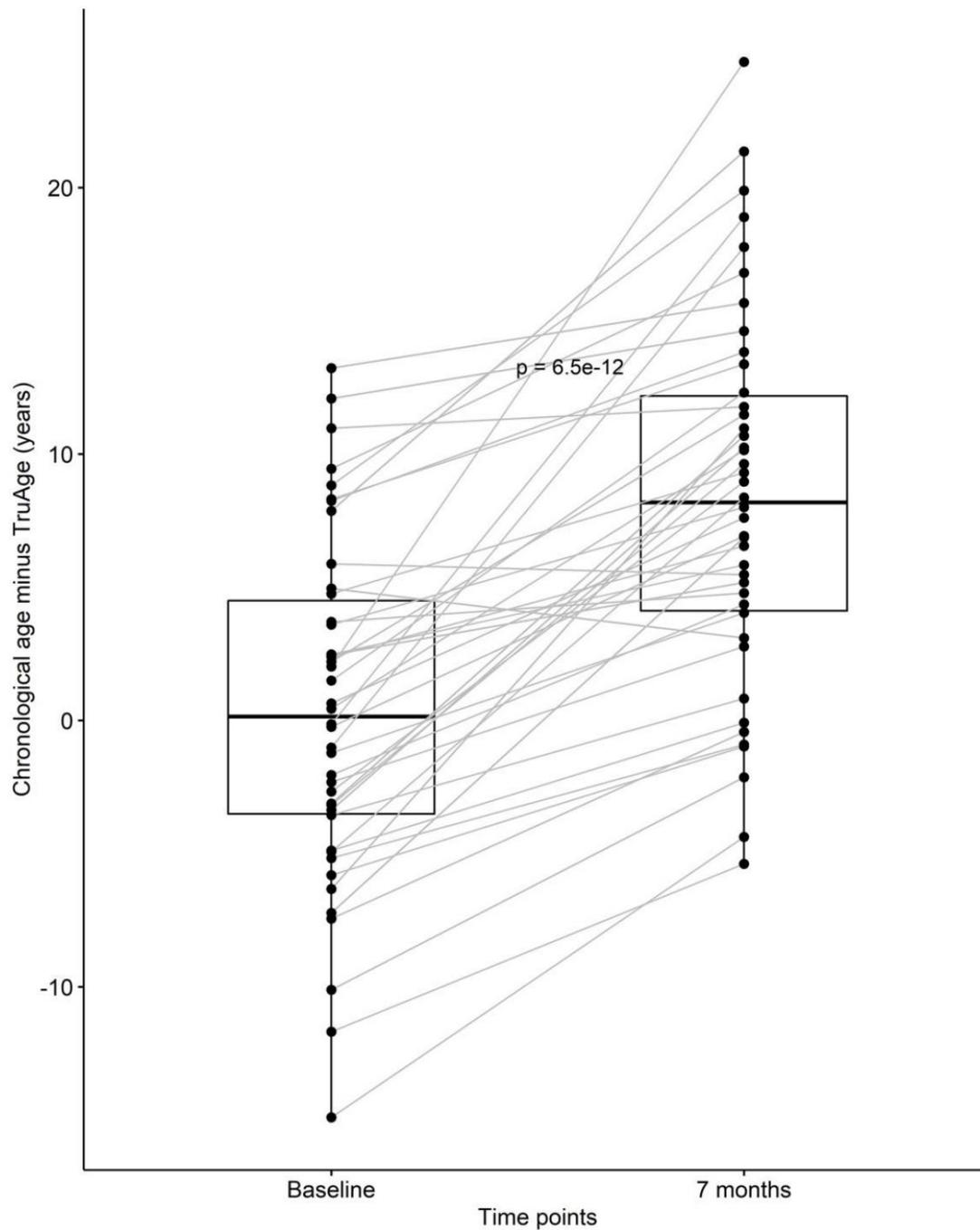


Figure 4. CaAKG a diminué l'âge de méthylation dans l'ensemble de la cohorte. Les diagrammes en boîte appariés représentent les effets du traitement au niveau du patient et du groupe (n = 42), entre le début et la fin de l'essai (dont la durée moyenne était de 7 mois). Les diagrammes en boîte représentent la médiane et les 25e et 75e quartiles.

et/ou les personnes ayant un âge chronologique de base élevé ont la plus grande réponse au Rejuvant®.

En utilisant le modèle réduit final, avec seulement les deux variables trouvées statistiquement significativement liées à une diminution de l'âge épigénétique au cours du traitement, la différence d'âge épigénétique (en années) d'environ 7 mois de supplémentation en CaAKG peut être modélisée par l'équation:

$$\text{Diminution de TruAge} = 0,22 \times \text{diffAge} - 0,45$$

avec « âge » représentant l'âge chronologique au début du traitement et « diffAge » défini comme la différence entre l'âge chronologique et l'âge TruMe au départ.

Le plan représentant cette régression est représenté (Figure 6).

Fait intéressant, la durée du traitement n'est pas corrélée à l'ampleur de l'effet de la supplémentation en Rejuvant®. Cela indique que la durée médiane de traitement de notre cohorte, environ 7 mois, peut être suffisante pour saturer les bénéfices de la supplémentation.

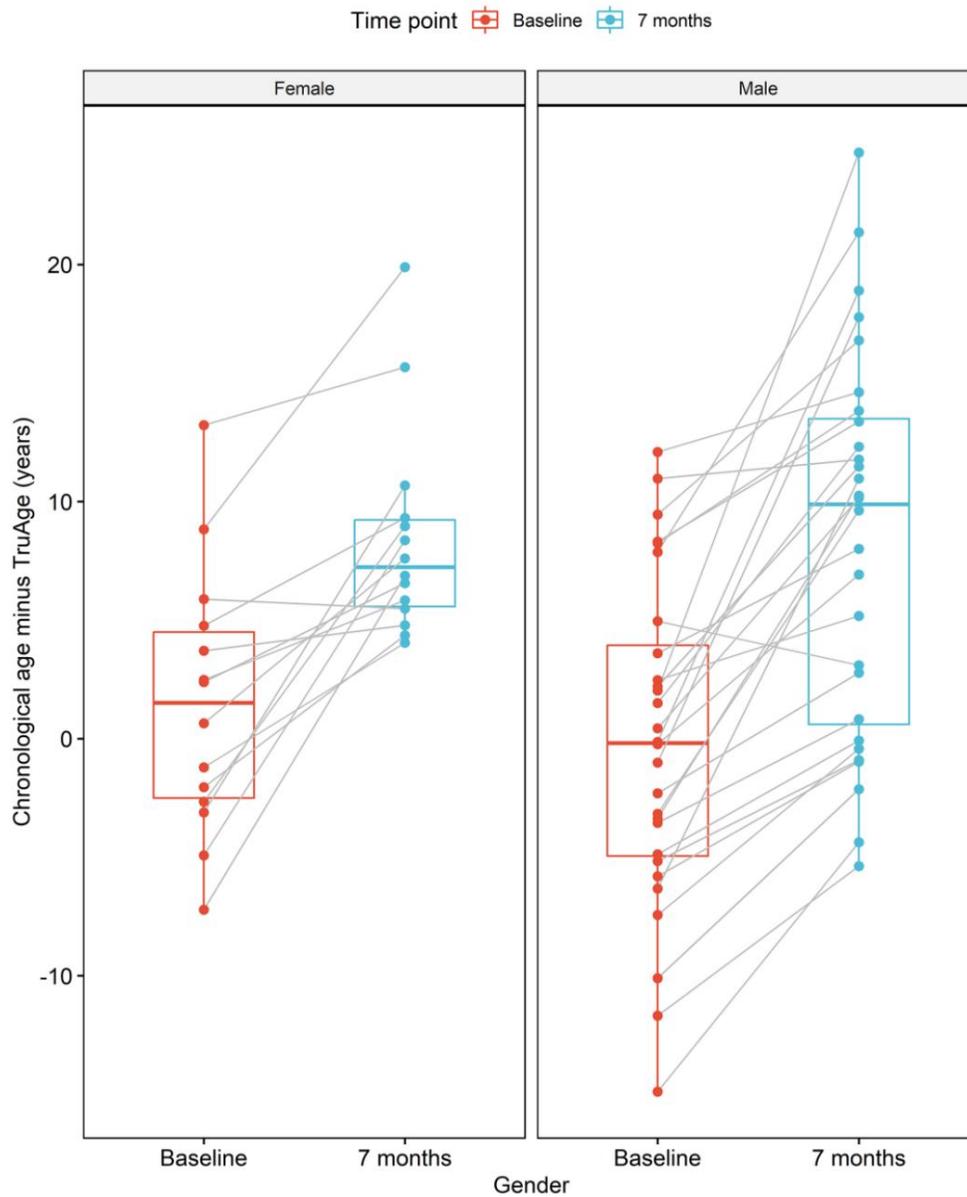


Figure 5. CaAKG diminue l'âge de méthylation quel que soit le sexe. L'image montre les effets du CaAKG sur l'âge de méthylation entre le début et la fin du traitement, ventilés par sexe. Pour chaque sexe, les diagrammes en boîte appariés rouges et bleus représentent les données au départ et au point final, respectivement. Les boîtes à moustaches sont basées sur la médiane et les 25e et 75e quartiles.

Fait intéressant, cette découverte est cohérente avec les extrapolations mathématiques d'une étude à grande échelle de mesures de numération globulaire complète, qui prévoient que les effets d'une intervention de longévité dans une population en bonne santé satureront dans un court laps de temps [30]. Cette même étude a prédit que les avantages de telles interventions seraient plus importants chez les personnes proches d'un état fragile, conformément à nos données.

Cela dit, il reste très peu de données sur l'utilisation à plus long terme de Rejuvant® ou de doses plus élevées du produit, et d'autres effets sur l'âge biologique sont possibles. Nous n'avons pas non plus mesuré si les avantages de l'âge biologique sont perdus si le supplément est interrompu, par conséquent, une supplémentation continue peut être nécessaire pour maintenir les effets observés.

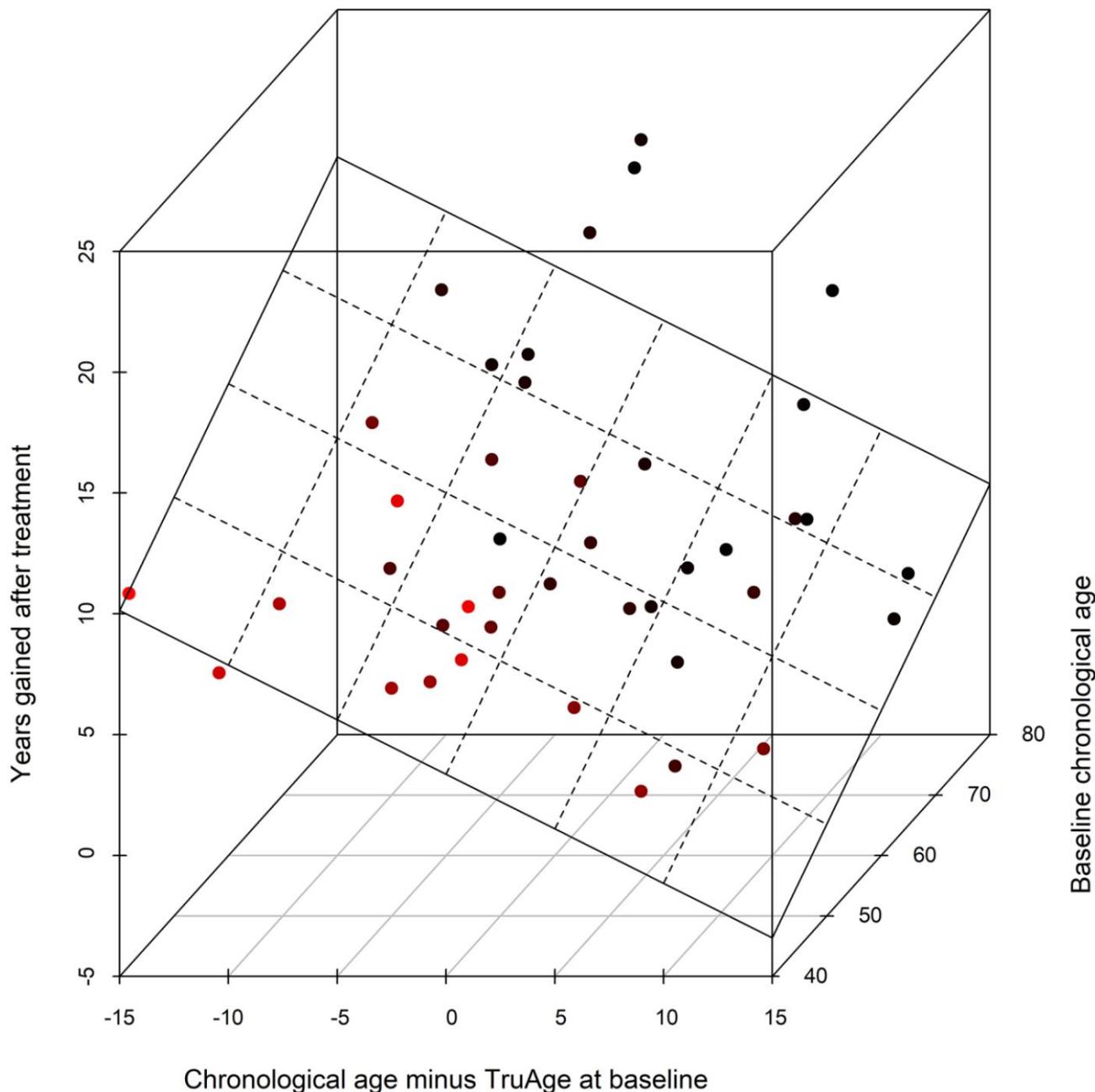


Figure 6. Nuage de points 3D des covariables influençant l'efficacité du traitement CaAKG. L'axe des x fait référence à la différence, en années, entre les âges chronologique et biologique au départ (un patient dans un état plus âgé aura une valeur positive plus élevée). L'axe des ordonnées représente l'effet du traitement CaAKG en termes d'années pendant lesquelles l'âge de méthylation a diminué (des valeurs plus élevées indiquent des avantages plus importants). L'axe z est l'âge chronologique au départ (les patients plus âgés seront « plus profonds »). Le plan 3D a été tracé en utilisant la régression linéaire des deux covariables à l'effet du traitement.

DISCUSSION

Il a été démontré qu'AKG prolonge la durée de vie de divers systèmes modèles. Dans cette étude, nous avons utilisé un algorithme précédemment développé qui prédit l'âge biologique humain pour déterminer si Rejuvant®, vitamines CaAKG + à libération prolongée, a un effet bénéfique sur la longévité humaine. Un total de 42 personnes, connues pour prendre Rejuvant® et qui avaient soumis des échantillons de salive pour des tests de méthylation de l'ADN, ont été sélectionnées pour participer à une enquête et à une analyse des résultats de vieillissement biologique des clients.

Leur indice DNAm TruAge avait été mesuré au départ (avant de commencer Rejuvant®) et retesté après une moyenne de 7 mois d'utilisation. Dans l'ensemble, ces 42 individus ont montré une réduction moyenne statistiquement significative de leur âge biologique d'environ 8 ans.

La pensée générale dans le domaine de la recherche sur le vieillissement est que les interventions sont susceptibles d'affecter des sous-ensembles de la population, et qu'aucune intervention (mode de vie ou petite molécule) ne retardera ou ne réduira l'âge biologique de l'ensemble de la population. Étonnamment, dans ce groupe, la grande majorité des participants ont répondu avec un âge biologique réduit après le traitement Rejuvant®. Bien que l'étude ait des limites (décrites ci-dessous), ces résultats sont encourageants. Fait intéressant, deux paramètres ont influencé l'ampleur de la réponse : les participants ayant un âge biologique plus élevé par rapport à l'âge chronologique et ceux ayant un âge chronologique plus élevé au départ. Cela suggère, peut-être contrairement aux attentes étant donné le rôle connu de l'AKG dans l'augmentation de la performance physique, que Rejuvant® a une réponse plus importante chez les participants biologiquement plus âgés que leur âge chronologique. On pourrait également prédire ce résultat pour une intervention de longévité sur la base de l'hypothèse que les individus ayant un âge biologique relatif bas subissent déjà un vieillissement presque optimisé et ont moins à gagner. Actuellement, les données sur le vieillissement humain sont insuffisantes pour prédire quelles populations répondront à une intervention particulière.

Le test de méthylation TruAge, qui reste exclusif, a été développé en examinant un nombre limité de sites de méthylation dans les îlots CpG de promoteurs, sur la base d'une optimisation de l'âge chronologique à l'aide d'une approche d'apprentissage automatique. Bien qu'elle étudie une plus petite partie du génome que les autres horloges de méthylation, elle a l'avantage d'être plus abordable. De plus, le test TruAge est facilement utilisé par les consommateurs, qui placent la salive sur une carte papier et l'envoient par la poste dans l'échantillon pour analyse. Il a été démontré que le test TruAge rapporte des résultats similaires par rapport à d'autres horloges épigénétiques (non publié), mais des tests supplémentaires utilisant d'autres horloges de méthylation et différents biomarqueurs du vieillissement seraient bénéfiques pour mesurer les effets de Rejuvant®

sur la longévité humaine. Une question fondamentale concernant les différentes mesures biologiques du vieillissement concerne leur niveau de concordance : mesurent-elles les mêmes aspects, qui se chevauchent ou sont-ils complètement différents du processus de vieillissement ?

Les données de cette étude, bien que limitées, suggèrent que le CaAKG peut effectivement avoir un impact sur le vieillissement, du moins tel que mesuré par la méthylation. Il convient également de noter que l'AKG est un substrat connu pour les ADN déméthylases [31], qui déméthylent potentiellement les sites d'ADN interrogés par TruAge. Cependant, la supplémentation en AKG conduit à la fois à la déméthylation et à l'hyperméthylation de certains sites CpG dans les cellules salivaires, ce qui suggère que Rejuvant® pourrait avoir un effet plus important sur les horloges de vieillissement basées sur la méthylation que d'autres indicateurs de l'âge biologique.

Il y a plusieurs limites à cette étude. Principalement, il n'est pas contrôlé par placebo. Par conséquent, une préoccupation potentielle est que l'effet placebo peut avoir contribué dans une certaine mesure aux changements observés. Cependant, la confiance autodéclarée dans l'efficacité des compléments alimentaires n'a été considérée comme un prédicteur statistiquement significatif dans aucun de nos modèles de régression, ce qui atténue le risque dans une certaine mesure. De plus, l'étude décrit une taille d'échantillon limitée et nous n'avons pas été en mesure de collecter d'autres types de données pertinentes pour le vieillissement, par exemple des marqueurs cliniques du vieillissement et de la maladie, et d'appliquer d'autres horloges biologiques du vieillissement [6]. De futurs essais cliniques randomisés seront nécessaires pour confirmer les résultats présentés ici. Néanmoins, les résultats de ce manuscrit suggèrent que Rejuvant® peut avoir des effets significatifs sur l'âge biologique tel que mesuré par la méthylation de l'ADN des échantillons de salive.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Intervenants

Un groupe de 42 personnes en bonne santé autodéclarées (14 femmes et 28 hommes) qui avaient soumis des échantillons de salive (deux échantillons par sujet). Des échantillons de salive ont été prélevés au départ (T0) et 4 à 10 mois après que le participant a commencé à prendre Rejuvant® (T7) à une dose fixe de deux comprimés par jour. Chaque dose contenait 1 gramme d'alpha-cétoglutarate de calcium, ainsi que de la vitamine A pour la formulation du participant masculin ou de la vitamine D pour la formulation de la participante, et délivrée dans une formulation à libération prolongée, comme illustré sur les étiquettes de formulation.

TruMe a identifié les participants potentiels à l'étude de tous les clients avec deux tests ADNm précédemment effectués (un test de base avant le début et un second test de 4 à 10 mois de supplémentation en Rejuvant(R). Les sujets potentiels ont été autorisés et invités à remplir un questionnaire signalant les changements de mode de vie avant et après supplémentation dans l'alimentation, l'exercice, le sommeil, l'alcool

la consommation, le tabagisme et l'utilisation de suppléments nutritionnels. Le formulaire de consentement comprenait la déclaration suivante : "TruMe aimerait avoir votre permission d'utiliser vos résultats d'âge biologique à des fins scientifiques et académiques. Vous serez toujours anonyme et aucune information personnellement identifiable ne sera jamais partagée.

TruMe n'utilise pas le séquençage complet du génome et ne génère ni ne conserve donc aucune donnée génétiquement identifiable. Nous ne vendons jamais vos données ou vos informations personnelles. » Les participants qui ont fourni un consentement approprié conformément aux principes des BPC ont été inclus dans l'étude. L'analyse des données des participants a été effectuée de manière agrégée et anonyme (tableau 1).

Vitamine A (sous forme de palmitate de rétinyle) 900 mcg 100 %
Calcium 190mg 15%

Alpha-cétoglutarate de calcium 1 000 mg †
Monohydrate (LifeAKG™)

Vitamine D 25 mcg

Calcium 190 mg

Alpha-cétoglutarate de calcium 1000mg
Monohydrate (LifeAKG™)

Prélèvement d'échantillons et séquençage du bisulfate

Des échantillons de salive ont été auto-prélevés par les participants à domicile à l'aide de kits d'échantillonnage TruMe disponibles dans le commerce. Les participants ont été invités à prélever environ 200 à 300 ml de leurs échantillons de salive sur des cartes classiques FTA (cartes classiques FTA, #WB120205, de GE Healthcare Life Sciences). Les échantillons de salive ont été laissés sécher à l'air pendant 30 à 45 minutes, avant d'être expédiés à TruMe Labs.

Méthylation de l'ADN et calcul de l'âge de l'ADNm

À partir de chaque échantillon, des cercles de 1 pouce de diamètre ont été obtenus et l'ADN a été élué avec le kit Quick-DNA Microprep Plus (ZymoResearch, CA, USA) conformément au protocole du fabricant. 200 à 500 ng d'ADN élué ont été convertis au bisulfite avec le kit EZ DNA Methylation Lighting™ conformément aux instructions du fabricant (ZymoResearch, CA, USA). L'amplification par PCR de l'ADN converti au bisulfite a été réalisée à l'aide d'amorces standard spécifiques à la cible (IDT, Newark, NJ, USA). La réaction PCR a été mise en place à l'aide de ZymoTaq PreMix E2004 (ZymoResearch, CA, USA).

Chaque fragment de PCR a été analysé à l'aide du protocole de séquençage standard de Sanger et les niveaux de méthylation ont été analysés à l'aide d'un algorithme propriétaire, développé par TruMe Inc. L'algorithme de prédiction de l'âge de TruMe utilise un

modèle multivarié pour prédire l'âge biologique de l'individu.

analyses statistiques

Les données ont été analysées et les tracés générés à l'aide du langage de programmation R. Les variables continues ont été testées pour la normalité à l'aide du test de Shapiro-Wilk.

Dans les cas où nous ne parvenons pas à rejeter l'hypothèse nulle (valeur de p non inférieure à 0,05), le test t unilatéral de Welch à deux échantillons a été utilisé, sinon le test unilatéral de rang signé de Wilcoxon avec correction de continuité a été déployé [32]. Les figures 1 à 5 ont été réalisées à l'aide du package R « ggpubr ». La figure 6 a été créée à l'aide du package R 'scatterplot3d' [33].

CONTRIBUTIONS D'AUTEUR

OD a aidé à la mise en place du test TruMe Age et était responsable des expériences impliquant son utilisation.

DB a effectué une analyse statistique des données et a participé à la rédaction du manuscrit. VB a participé à l'analyse statistique des données. RF a aidé au contrôle et à l'analyse de la qualité des données, ainsi qu'à la composition du manuscrit. FRP a participé à la conception de l'étude, à la composition du manuscrit et à l'analyse des données. BKK a participé à la conception de l'étude, à la composition du manuscrit et à l'analyse des données. YVB a participé à l'établissement du test TruMe Age, à la conception de l'étude, à la composition du manuscrit et à l'analyse des données.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier les membres du laboratoire Kennedy à NUS, ainsi que les employés de TruMe Labs et PDL Health pour leurs commentaires sur le manuscrit.

LES CONFLITS D'INTÉRÊTS

En juillet 2019, TruMe a conclu un accord de service client non exclusif pour le test de méthylation de l'ADN des clients de Ponce de Leon Health prenant Rejuvant®. Ni TruMe ni Ponce de Leon Health n'ont de propriété croisée ou d'autres intérêts financiers à signaler. BKK est consultant scientifique et membre du conseil d'administration de Ponce de Leon Health.

FINANCEMENT

Les données du manuscrit ont été acquises auprès des utilisateurs du produit Rejuvant de Ponce de Leon Health et de l'analyse de méthylation de l'ADN fournie par TruMe Labs. Les données ont été fournies à l'Université nationale de Singapour pour analyse statistique, qui a fourni un soutien financier pour cette composante du projet.

LES RÉFÉRENCES

1. Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, Franceschi C, Lithgow GJ, Morimoto RI, Pessin JE, Rando TA, Richardson A, Schadt EE, et al. Gérosience : relier le vieillissement aux maladies chroniques. *Cellule*. 2014 ; 159:709–13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.039> PMID:25417146
2. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Les caractéristiques du vieillissement. *Cellule*. 2013 ; 153:1194–217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039> PMID:23746838
3. Kennedy BK, Pennypacker JK. Les médicaments qui modulent le vieillissement : la voie prometteuse mais difficile à parcourir. *Trad Res*. 2014 ; 163:456–65. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.007> PMID:24316383
4. Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B. Biomarqueurs du vieillissement : de la fonction à la biologie moléculaire. *Nutriments*. 2016 ; 8:338. <https://doi.org/10.3390/nu8060338> PMID:27271660
5. Justice JN, Ferrucci L, Newman AB, Aroda VR, Bahnson JL, Divers J, Espeland MA, Marcovina S, Pollak MN, Kritchevsky SB, Barzilai N, Kuchel GA. Un cadre pour la sélection de biomarqueurs sanguins pour les essais cliniques guidés par la gérosience : rapport du groupe de travail sur les biomarqueurs TAME. *Gérosience*. 2018 ; 40:419–36. <https://doi.org/10.1007/s11357-018-0042-y> PMID:30151729
6. Kudryashova KS, Burka K, Kulaga AY, Vorobyeva NS, Kennedy BK. Biomarqueurs du vieillissement : des tests fonctionnels aux approches multi-omiques. *Protéomique*. 2020 ; 20:e1900408. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900408> PMID:32084299
7. Cavalli G, Heard E. Les progrès de l'épigénétique lient la génétique à l'environnement et à la maladie. *Nature*. 2019 ; 571:489–99. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1411-0> PMID:31341302
8. Unnikrishnan A, Freeman WM, Jackson J, Wren JD, Porter H, Richardson A. Le rôle de la méthylation de l'ADN dans l'épigénétique du vieillissement. *Pharmacol Ther*. 2019 ; 195 : 172–85. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.11.001> PMID:30419258
9. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sadda S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, et al. À l'échelle du génome les profils de méthylation révèlent des vues quantitatives des taux de vieillissement humain. *Cellule Mol*. 2013 ; 49:359–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016> PMID:23177740
10. Jin B, Li Y, Robertson KD. Méthylation de l'ADN : supérieure ou subordonnée dans la hiérarchie épigénétique ? *Gènes Cancer*. 2011 ; 2:607–17. <https://doi.org/10.1177/1947601910393957> PMID:21941617
11. Teschendorff AE, West J, Beck S. Dérive épigénétique associée à l'âge : implications et cas d'économie épigénétique ? *Hum Mol Genet*. 2013 ; 22:R7–15. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt375> PMID:23918660
12. Horvath S. Âge de méthylation de l'ADN des tissus humains et des types de cellules. *Génome Biol*. 2013 ; 14:R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115> PMID:24138928
13. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E. Prédicteur épigénétique de l'âge. *PLoS One*. 2011 ; 6:e14821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014821> PMID:21731603
14. Breitling LP, Saum KU, Perna L, Schöttker B, Holleczeck B, Brenner H. La fragilité est associée à l'horloge épigénétique mais pas à la longueur des télomères dans une cohorte allemande. *Clin Épigénétique*. 2016 ; 8h21. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0186-5> PMID:26925173
15. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Ritchie SJ, Muniz Terrera G, Harris SE, Gibson J, Redmond P, Cox SR, Pattie A, Corley J, Taylor A, Murphy L, et al. L'horloge épigénétique est corrélée à la condition physique et cognitive dans la cohorte de naissance de Lothian 1936. *Int J Epidemiol*. 2015 ; 44:1388–96. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu277> PMID:25617346
16. Horvath S, Erhart W, Brosch M, Ammerpohl O, von Schönfels W, Ahrens M, Heits N, Bell JT, Tsai PC, Spector TD, Deloukas P, Siebert R, Sipsos B, et al. L'obésité accélère le vieillissement épigénétique du foie humain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014 ; 111:15538–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412759111> PMID:25313081
17. Horvath S, Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Salvioli S, Gentilini D, Di Blasio AM, Giuliani C, Tung S, Vinters HV, Franceschi C. Vieillesse épigénétique accélérée dans le syndrome de Down. *Cellule vieillissante*. 2015 ; 14:491–95. <https://doi.org/10.1111/accel.12325> PMID:25678027
18. Lagathu C, Cossarizza A, Béréziat V, Nasi M, Capeau J, Pinti M. Science fondamentale et pathogenèse du vieillissement avec le VIH : mécanismes potentiels et biomarqueurs. *SIDA*. 2017 (supplément 2); 31:S105–19.

- <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001441>
PMID:28471941
19. Horvath S, Ritz BR. Augmentation de l'âge épigénétique et du nombre de granulocytes dans le sang des patients atteints de la maladie de Parkinson. *Viellissement (Albany NY)*. 2015 ; 7:1130–42. <https://doi.org/10.18632/aging.100859> PMID:26655927
20. Levine ME, Lu AT, Bennett DA, Horvath S. L'âge épigénétique du cortex préfrontal est associé aux plaques neuritiques, à la charge amyloïde et au fonctionnement cognitif lié à la maladie d'Alzheimer. *Viellissement (Albany NY)*. 2015 ; 7:1198–211. <https://doi.org/10.18632/aging.100864> PMID:26684672
21. Ambatipudi S, Horvath S, Perrier F, Cuenin C, Hernandez-Vargas H, Le Calvez-Kelm F, Durand G, Byrnes G, Ferrari P, Bouaoun L, Sklias A, Chajes V, Overvad K, et al. L'analyse du méthylome d'ADN identifie le vieillissement épigénétique accéléré associé à la prédisposition au cancer du sein post-ménopausique. *Eur J Cancer*. 2017 ; 75:299–307. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.01.014> PMID:28259012
22. Zannas AS, Arloth J, Carrillo-Roa T, Iurato S, Röh S, Ressler KJ, Nemeroff CB, Smith AK, Bradley B, Heim C, Menke A, Lange JF, Brückl T, et al. Le stress au cours de la vie accélère le vieillissement épigénétique dans une cohorte urbaine afro-américaine : pertinence de la signalisation des glucocorticoïdes. *Génome Biol*. 2015 ; 16:266. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0828-5> PMID:26673150
23. Asadi Shahmirzadi A, Edgar D, Liao CY, Hsu YM, Lucanic M, Asadi Shahmirzadi A, Wiley CD, Gan G, Kim DE, Kasler HG, Kuehnemann C, Kaplowitz B, Bhaumik D, et al. L'alpha-cétoglutarate, un métabolite endogène, prolonge la durée de vie et réduit la morbidité chez les souris vieillissantes. *Cellule Metab*. 2020 ; 32:447–56.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.004> PMID:32877690
24. Xiao D, Zeng L, Yao K, Kong X, Wu G, Yin Y. Le métabolisme de la glutamine-alpha-cétoglutarate (AKG) et ses implications nutritionnelles. *Acides aminés*. 2016 ; 48:2067–80. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2254-8> PMID:27161106
25. Wu N, Yang M, Gaur U, Xu H, Yao Y, Li D. Alpha cétoglutarate : applications physiologiques. *Ann N Y Acad Sci*. 2016 ; 1183:1–13. <https://doi.org/10.1111/nyas.12818> PMID:26655927
26. Zdzisińska B, Żurek A, Kandefer-Szerszeń M. Alpha cétoglutarate en tant que molécule à activité pléiotrope : possibilités bien connues et nouvelles d'utilisation thérapeutique. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2017 ; 65:21–36. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0406-x> PMID:27326424
27. Harrison AP, Pierzynowski SG. Effets biologiques du 2-oxoglutarate avec un accent particulier sur la régulation de l'absorption/métabolisme des protéines des acides gras, la lipase et la cancérogenèse, le tout vu du point de vue du vieillissement en bonne santé - article de synthèse. *J Physiol Pharmacol*. 2008 (Suppl 1); 59:91–106. PMID:18802218
28. Chin RM, Fu X, Pai MY, Vergnes L, Hwang H, Deng G, Diep S, Lomenick B, Meli VS, Monsalve GC, Hu E, Whelan SA, Wang JX, et al. Le métabolite α cétoglutarate prolonge la durée de vie en inhibant l'ATP synthase et TOR. *Nature*. 2014 ; 510:397–401. <https://doi.org/10.1038/nature13264> PMID:24828042
29. Liao CY, Kennedy BK. Modèles de souris et vieillissement : longévité et progeria. *Curr Top Dev Biol*. 2014 ; 109:249–85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397920-9.00003-2> PMID:24947239
30. Pyrkov TV, Avchaciov K, Tarkhov AE, Menchikov LI, Gudkov AV, Fedichev PO. L'analyse longitudinale des marqueurs sanguins révèle une perte progressive de résilience et prédit la limite de la durée de vie humaine. *Nat Commun*. 2021 ; 12:2765. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23014-1> PMID:34035236
31. Salminen A, Kauppinen A, Hiltunen M, Kaamiranta K. Les intermédiaires du cycle de Krebs régulent la méthylation de l'ADN et des histones : impact épigénétique sur le processus de vieillissement. *Viellissement Rév*. 2014 ; 16:45–65. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.05.004> PMID:24910305
32. PN de Runyon. *Statistiques non paramétriques : une approche contemporaine*. Société d'édition Addison-Wesley. 1977.
33. Ligges U, Maechler M. scatterplot3d - Un package R pour la visualisation de données multivariées. *Logiciel J Stat*. 2003 ; 8:1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v008.i11>

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE

Tableaux supplémentaires

Veillez parcourir la version texte intégral pour voir les données du tableau supplémentaire 2.

Tableau supplémentaire 1. Caractéristiques des participants au départ.

	Femme	Homme
n	14	28
Origine ethnique (%)		
asiatique	1 (7,1)	1 (3,6)
Hispanique/Latino	(7,1) 12	(3,6) 23
Blanc/Caucasien	(85,7) 0	(82,1) 2 (7,1)
Blanc/Caucasien, Amérindien ou natif de l'Alaska	(0,0) 0	1 (3,6)
Blanc / Caucasien, Hawaïen indigène ou autre insulaire du Pacifique	(0,0) 62,57	61,16
Âge chronologique T0 (moyenne (ET))	(8,11) 63,12	(11,03) 61,76
Âge chronologique T7* (moyenne (ET))	(8,11) 61,09	(11,01) 61,38
Âge biologique T0 (moyenne (ET))	(7,27) 54,66	(9,64) 53,53
Âge biologique T7* (moyenne (ET))	(8,17)	(8,62)
Consommation hebdomadaire d'alcool dans les boissons (%)		
0	5 (35,7)	2 (17,9)
1 à 4	(14,3) 6	(35,7) 8
5 à 8	(42,9) 1	(28,6) 5
9 à 14	(7,1)	(17,9)
Nombre actuel de compléments alimentaires (%)		
0	2 (14,3)	4 (14,3)
1 à 2	(28,6) 5	(10,7) 6
3 à 4	(35,7) 3	(21,4) 15
5	(21,4)	(53,6)
État de santé général autoévalué (%)		
Modéré	1 (7,1)	7 (3,6)
Bien	(50,0) 6	(32,1) 18
Très bien	(42,9)	(64,3)
Durée du sommeil (%)		
4-6 heures	1 (7,1)	2 (7,1)
7-8 heures	13 (92,9)	0 (85,7)
Plus de 8 heures	(0,0)	(7,1)
Antécédents de tabagisme (%)		
Ancien fumeur mais j'ai arrêté	3 (21,4)	3 (10,7)
Jamais fumeur		
Fréquence d'exercice hebdomadaire (%)		
Rarement	1 (7,1)	0 (0,0)
1 à 2 fois/semaine	(0,0) 7	(17,9) 17
3+ fois/semaine	(50,0) 6	(60,7) 6
Quotidien	(42,9)	(21,4)
IMC (moyenne (ET))	21,84 (2,60)	25,70 (3,97)
Jours de traitement (moyenne (ET))	200,57 (35,78)	218,36 (41,57)
Éducation (%)		
Diplôme d'études secondaires (ou GED)	1 (7,1)	3 (0,0)
Un diplôme	(21,4) 2	4 (14,3)
universitaire de 4 ans	(14,3) 8	10 (35,7)
Diplôme d'études supérieures	(57,1)	14 (50,0)
Nombre moyen de repas quotidiens (%)		
2	6 (42,9)	11 (39,3)

3	7 (50,0)	14 (50,0)
4 ou plus	1 (7,1)	3 (10,7)
Nombre de collations quotidiennes (%)		
1	6 (42,9)	18 (64,3)
2	6 (42,9)	8 (28,6) 2
3	2 (14,3)	(7,1)
Avis sur les compléments alimentaires (%)		
Sceptique	2 (14,3)	3 (10,7) 0
Pas d'opinion	2 (14,3)	(0,0) 4
Intéressé	6 (42,9)	(14,3) 21
Croyant ferme	4 (28,6)	(75,0)
Fréquence hebdomadaire des compléments alimentaires (%)		
Jamais	1 (7,1)	0 (0,0)
Rarement	0 (0,0)	1 (3,6)
Quotidien	13 (92,9)	27 (96,4)
État d'esprit de vie sain (%)		
Prêt à commencer	1 (7,1)	1 (3,6)
Pratiquant	10 (71,4)	15 (53,6)
Dédié	3 (21,4)	12 (42,9)
Niveau d'activité (%)		
Sédentaire	1 (7,1)	2 (7,1)
Légèrement actif	2 (14,3)	5 (17,9)
Actif	5 (35,7)	12 (42,9)
Très actif	6 (42,9)	9 (32,1) 0
Athlétique	0 (0,0)	(0,0)
Cheveux (%)		
Chauve	0 (0,0)	4 (14,3)
Amincissement	5 (35,7)	11 (39,3)
Épais et/ou plein	9 (64,3)	13 (46,4)

*Indique l'âge biologique tel que mesuré par le test TruMe après une moyenne de sept mois de traitement.

Tableau supplémentaire 2. Modèles de régression utilisés (avec coefficients).