

Sénescence chez les champignons filamenteux

L'étude du vieillissement d'un organisme supérieur, tel qu'un mammifère, se heurte à des difficultés extrêmes dues à la complexité de son organisation et aux multiples réseaux d'interactions entre les différents systèmes, organes, tissus et types cellulaires qui le composent. La nécessité d'utiliser des systèmes modèles plus simples s'est imposée depuis longtemps. La sénescence des cellules diploïdes humaines en culture constitue le modèle d'étude le plus répandu auquel les méthodes de la biologie moléculaire moderne ont redonné un souffle nouveau. Cependant, l'étude de phénomènes de vieillissement chez les organismes eucaryotes inférieurs, dont l'organisation et le génome sont plus simples et qui se prêtent plus facilement que les cellules humaines à l'analyse génétique, peut fournir des informations précieuses sur les mécanismes moléculaires fondamentaux du vieillissement. Ces études sont, en outre, indispensables si l'on veut aborder la question de l'apparition et de l'évolution de ce phénomène dans le monde vivant.

Parmi les systèmes modèles, le syndrome de sénescence du champignon *Podospora anserina*, découvert par G. Rizet il y a maintenant 40 ans [1], a fait l'objet de nombreuses études. Chez ce champignon, la croissance végétative du mycélium est inéluctablement limitée. La sénescence s'exprime par un ralentissement puis un arrêt de la croissance accompagné de la mort de nombreuses cellules. Dans cette espèce, ce processus est systématique et se manifeste chez toutes les souches récoltées dans la nature. La durée moyenne de vie (longévité), depuis la germination de la spore jusqu'à la sénescence, varie d'un isolat à l'autre. Cette caractéristique

différencie cette espèce des autres champignons filamenteux connus chez lesquels la plupart des souches sont immortelles. Chez *Neurospora*, cependant, certains isolats naturels de *N. crassa* et *N. intermedia* peuvent manifester un syndrome dégénératif irréversible tout à fait comparable à la sénescence de *Podospora*. Dans tous les cas étudiés, aussi bien chez *Podospora* que chez *Neurospora*, le processus de sénescence est invariablement associé à des modifications de l'ADN mitochondrial, responsables de la détérioration des capacités respiratoires de l'organisme.

Chez *Podospora*, l'état sénéscent est systématiquement associé à l'amplification de séquences d'ADN mitochondrial sous forme de molécules circulaires multimériques qui progressivement remplacent le chromosome sauvage. La séquence la plus fréquemment amplifiée — et, semble-t-il, systématiquement amplifiée — dans des cultures sénéscentes indépendantes correspond au 1er intron du gène *cox1* (*cox1-il* ou intron α) codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase [2]. L'implication de cet intron dans le processus de sénescence est corroborée par la sélection de souches mutantes immortelles (« résistantes » à la sénescence) dont l'étude a montré qu'elles portaient une délétion de cet intron [3, 4]. Il s'agit d'un intron de groupe II qui possède une longue phase ouverte de lecture codant pour une protéine où l'on peut reconnaître des motifs peptidiques caractérisant les transcriptases inverses [5] des rétrovirus et des rétrotransposons.

Le rôle de cet intron dans le processus de sénescence et les mécanismes responsables des modifications de l'ADN mitochondrial associées à l'état sénéscent sont encore obscurs.

Cependant, des résultats récents apportent des éléments de réponse à ces questions. Nous avons montré en effet que des produits de transcription inverse (c'est-à-dire des molécules d'ADN dépourvues d'introns à l'image de l'ARN messager) sont plus abondants dans des cultures sénéscentes que dans des cultures jeunes et qu'ils sont absents dans des souches « immortelles » où l'intron α est délété. En particulier, des molécules d'ADN dont la séquence correspond au gène *cox1* dépourvu de ses 15 introns n'ont pu être détectées (par PCR) que dans des cultures sénéscentes [6]. Il semble donc que cet intron dirige la synthèse d'une transcriptase inverse dont l'activité augmente au cours de la sénescence. Par ailleurs, nous avons montré que cet intron se comporte comme un élément génétique mobile, capable de se transposer (*via* des étapes d'épissage et de transcription inverses) à un autre endroit du génome mitochondrial [7]. Cette propriété est, selon toute vraisemblance, à l'origine d'une délétion de l'ADN mitochondrial en un site particulier, responsable d'un phénomène de mort prématurée chez ce champignon (voir *m/s* n° 6, vol. 7, p. 628). Il faut noter que l'existence d'une activité transcriptase inverse codée par les introns mitochondriaux de groupe II [8] ainsi que la transposition d'un intron de groupe II [9] viennent d'être démontrées chez la levure. Cette transposition conduit, là aussi, à une délétion « site-spécifique » de l'ADN mitochondrial, responsable d'une déficience respiratoire.

Chez *Neurospora*, des données récentes permettent de préciser les mécanismes responsables de la sénescence. En effet, la prédisposition de certains isolats naturels à la sénes-

cence et à la mort semble être toujours associée à la présence de plasmides localisés dans les mitochondries mais dont la séquence ne présente pas d'homologie avec l'ADN mitochondrial. Deux grands types de plasmides ont été décrits, les plasmides linéaires, *kalilo* et *maranhar*, et les plasmides circulaires dont les plus étudiés sont *Varkud* et *Mauriceville*. Ces plasmides ne sont présents que dans certaines souches de *N. intermedia* et *N. crassa* [10]. Les plasmides linéaires possèdent de longues répétitions terminales inversées et codent pour une ADN et une ARN polymérase [11]. Dans les souches qui les portent, la sénescence est systématique; elle est induite par l'insertion de ces plasmides dans le chromosome mitochondrial, le rendant non fonctionnel [12]. Les mécanismes responsables de cette intégration et de l'accumulation des génomes non fonctionnels ne sont pas encore élucidés. Les plasmides circulaires présentent à la fois des caractéristiques de rétrotransposons et d'introns mitochondriaux. Ils codent pour une transcriptase inverse impliquée dans leur répllication [13]. Dans les souches possédant ces plasmides, la sénescence se produit plus rarement. Elle est due à la désorganisation de l'ADN de la mitochondrie résultant de l'intégration de séquences du chromosome mitochondrial dans ces plasmides et de l'intégration de séquences plasmidiques dans le chromosome mitochondrial. Ces modifications mettent en jeu, semble-t-il, des « recombinaisons » au niveau de l'ARN suivies d'une étape de transcription inverse [14].

L'ensemble des données accumulées ces dernières années montre que, chez les champignons filamenteux, au moins deux grands types de mécanismes sont impliqués dans l'instabilité du génome mitochondrial et sont à l'origine de remaniements moléculaires associés à la sénescence : la recombinaison entre séquences d'ADN et la transcription inverse d'ARN « recombinés ». Le premier mécanisme a été proposé depuis longtemps pour expliquer certains remaniements associés à la

sénescence, tant chez *Podospora* que chez *Neurospora*. C'est par recombinaison illégitime que se ferait également l'intégration des plasmides linéaires dans le chromosome mitochondrial [10]. En revanche, la mise en évidence (directe chez les souches de *Neurospora* portant des plasmides circulaires, indirecte chez *Podospora*) d'une activité transcriptase inverse mitochondriale est une donnée nouvelle. Cette activité joue sans doute un rôle important dans la plasticité du génome mitochondrial.

La mitochondrie n'est pas un organe autonome au sein de la cellule, et on peut penser raisonnablement qu'un grand nombre de gènes nucléaires contrôlent l'intégrité du génome mitochondrial et influent donc, par là même, sur le processus de sénescence.

Chez *Neurospora*, un gène nucléaire, *nd* (*natural death*), qui contrôle le processus de sénescence, a été identifié. Une mutation récessive de ce gène est responsable d'une augmentation de la recombinaison mitochondriale [15].

Chez *Podospora*, une relation entre la fidélité de la traduction (fidélité avec laquelle le message génétique est exprimé au cours de la synthèse des protéines) et la longévité du champignon a été établie depuis longtemps. En effet, la majorité des mutations sélectionnées pour affecter la fidélité de la synthèse des protéines (soit en l'augmentant — mutations antisuppresseurs —, soit en la diminuant — mutations supprimeurs) modifient fortement la longévité du champignon [16, 17]. L'effet de certaines de ces mutations est spectaculaire puisqu'une même mutation (dans le gène *ASI*), qui augmente la fidélité de la traduction, peut conduire, soit à un syndrome de mort prématurée (durée de vie inférieure à une semaine), soit à une « immortalisation » (durée de vie supérieure à deux ans) selon le contexte génétique. Nous avons démontré que la mort prématurée s'accompagne d'un remaniement précis du chromosome mitochondrial associé à la mobilité de l'intron α [7,17]. Le clo-

nage et le séquençage du gène *ASI* ont montré qu'il codait pour une protéine de la petite sous-unité du ribosome cytosolique, homologue de la protéine humaine S15 [18]. Cette protéine n'est pas détectable dans la mitochondrie [19].

Un autre gène, *AS4*, dans lequel de nombreuses mutations antisuppresseurs avaient été identifiées et qui, toutes, augmentent la longévité, a été séquencé. Il code pour une protéine nécessaire à l'élongation de la chaîne protéique en cours de synthèse (facteur protéique EF1- α) [20]. Il faut noter que la surproduction de ce facteur chez la drosophile est également responsable d'une longévité accrue des mouches [21]. La relation entre la fidélité de la traduction cytoplasmique et le processus de sénescence mérite d'être précisée. La manipulation du gène *AS4* par mutagenèse *in vitro* (en y introduisant des mutations qui augmentent ou diminuent la fidélité) et sa réintroduction dans l'organisme vivant, en cours actuellement, devraient permettre d'établir s'il existe bien une corrélation entre le degré de fidélité de la traduction cytoplasmique et la longévité du champignon.

En résumé, le phénomène de sénescence chez les champignons filamenteux subit un double contrôle. Il semble que des modifications du génome mitochondrial soient, *in fine*, responsables de l'arrêt de croissance et de la mort cellulaire. De nombreux gènes nucléaires, en particulier chez *Podospora* ceux qui interviennent dans la fidélité de la traduction par les ribosomes cytosoliques, jouent un rôle important dans le processus de sénescence par le biais, au moins dans certains cas, d'un contrôle de la stabilité du génome mitochondrial. Les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels ce contrôle est exercé restent pour le moment totalement mystérieux et doivent être élucidés. S'il est évident que la compréhension de ce phénomène chez les champignons filamenteux ne fournira pas « l'explication » du vieillissement des organismes supérieurs, on peut néanmoins espérer qu'elle

contribuera à cette explication en fournissant des pistes et des idées expérimentalement testables. D'ores et déjà, certains parallèles ont été établis entre les modifications de l'ADN mitochondrial associées à la mort prématurée et à la sénescence de *Podospora* et les délétions de l'ADN mitochondrial associées à plusieurs maladies dégénératives [22, 23]. Enfin, il faut noter que des chromosomes mitochondriaux délétés, identiques à ceux trouvés dans ces situations pathologiques, apparaissent en faible proportion chez l'homme sain au cours du vieillissement [24] ■

Remerciements

Les auteurs remercient l'INSERM, l'AFM et la LNCC pour leur soutien financier.

RÉFÉRENCES

1. Rizet G. Sur l'impossibilité d'obtenir la multiplication végétative ininterrompue et illimitée de l'ascomycète *Podospora anserina*. *CR Hebd Séances Acad Sci* 1953; 237: 838-40.
2. Osiewacz HD, Esser K. The mitochondrial plasmid of *Podospora anserina*: a mobile intron of a mitochondrial gene. *Curr Genet* 1984; 8: 299-305.
3. Belcour L, Vierny C. Variable DNA splicing sites of a mitochondrial intron: relationship to the senescence process in *Podospora*. *EMBO J* 1986; 5: 609-14.
4. Sainsard-Chanet A, Begel O. Insertion of a LrDNA gene fragment and of filler DNA at a mitochondrial exon-intron junction in *Podospora*. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 1-7.
5. Michel F, Lang F. Mitochondrial class II introns encode proteins related to the reverse transcriptases of retroviruses. *Nature* 1985; 316: 641-3.
6. Sainsard-Chanet A, Begel O, Belcour L. DNA deletion of mitochondrial introns is correlated with the process of senescence in *Podospora anserina*. *J Mol Biol* 1993; 234: 1-7.
7. Sellem CH, Lecellier G, Belcour L. Transposition of a group II intron. *Nature* 1993; 366: 176-8.
8. Kennell JC, Moran JV, Perlman PS, Butow RA, Lambowitz AM. Reverse transcriptase activity associated with maturase-encoding group II introns in yeast mitochondria. *Cell* 1993; 73: 133-46.
9. Mueller MW, Allmaler M, Eskes R, Schweyen RJ. Transposition of group II intron ail in yeast and invasion of mitochondrial genes at new locations. *Nature* 1993; 366: 174-6.
10. Griffiths AJF. Fungal senescence. *Annu Rev Genet* 1992; 26: 351-72.
11. Shiu-Shing Chan B, Court DA, Vierula PJ, Bertrand H. The kalilo linear senescence-inducing plasmid of *Neurospora* is an invertron and encodes DNA and RNA polymerases. *Curr Genet* 1991; 20: 225-7.
12. Myers CJ, Griffiths AJM, Bertrand H. Linear kalilo DNA is a *Neurospora* mitochondrial plasmid that integrates into the mitochondrial DNA. *Mol Gen Genet* 1989; 220: 113-20.
13. Wang H, Lambowitz AM. The *Mauriceville* plasmid reverse transcriptase can initiate cDNA synthesis *de novo* and may be related to reverse transcriptase and DNA polymerase progenitor. *Cell* 1993; 75: 1071-81.
14. Akins RA, Kelley RL, Lambowitz AM. Characterization of mutant mitochondrial plasmids of *Neurospora spp.* that have incorporated tRNAs by reverse transcription. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 678-91.
15. Bertrand H, Wu Q, Seidel-Rogol BL. Hyperactive recombination in the mitochondrial DNA of the natural death nuclear mutant of *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 6778-88.
16. Picard-Bennoun M. Introns, protein syntheses and aging. *FEBS Lett* 1985; 184: 1-5.
17. Belcour L, Begel O, Picard M. A site-specific deletion in the mitochondrial DNA of *Podospora* is under the control of nuclear genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3579-83.
18. Dequard-Chablat M. Translation, oncogenesis and myopathies. *Trends Genet* 1991; 7: 240-1.
19. Dequard-Chablat M, Sellem CH. The S12 ribosomal protein of *Podospora anserina* belongs to the S19 bacterial family and controls the mitochondrial genome integrity through cytoplasmic translation. *J Biol Chem* 1994 (sous presse).
20. Silar P, Picard M. Increased longevity of EF-1a high fidelity mutants in *Podospora anserina*. *J Mol Biol* 1994; 235: 231-6.
21. Shepherd JCW, Walldorf U, Hug P, Gehring WG. Fruit flies with additional expression of the elongation factor EF-1 α live longer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7520-1.
22. Rötig A, Bonnefont JP, Colonna M, Cormier V, Rustin P, Saudubray JM, Munnich A. Les remaniements du génome mitochondrial dans les déficits énergétiques de l'enfant. De nouvelles maladies de système. *médecine/sciences* 1989; 5: 459-71.
23. Nelson I, Degoul F, Marsac C, Ponsot G, Lestienne P. Des délétions de l'ADN mitochondrial dans le syndrome de Kearns-Sayre et autres myopathies avec ophtalmoplégie externe progressive. *médecine/sciences* 1989; 5: 472-9.
24. Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7370-4.

Annie Sainsard-Chanet
Carole Sellem
Philippe Silar
Léon Belcour

Centre de génétique moléculaire, centre national de la recherche scientifique, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

Michelle Dequard-Chablat
Marguerite Picard

Institut de génétique et microbiologie, URA D1354, bâtiment 400, université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.

TIRÉS A PART

L. Belcour.

m/s n° 5 vol. 10, mai 94