

## Diminution de l'activité du protéasome avec l'âge

Le déclin progressif et irréversible des différentes fonctions physiologiques de l'organisme dans la dernière partie de la vie, phénomène appelé communément vieillissement, est un processus complexe sous le contrôle de divers facteurs génétiques, mais aussi lié aux influences du milieu extérieur. L'accumulation de protéines endommagées constitue l'une des caractéristiques communes du vieillissement cellulaire [1, 2]. Les protéines sont en effet la cible de diverses modifications post-traductionnelles (oxydation, glycation, conjugaison avec des produits issus de la peroxydation lipidique) dont l'incidence augmente avec l'âge. Ces modifications qui viennent altérer leurs fonctions biologiques pourraient être directement impliquées dans le processus de vieillissement. Le rôle de certains gènes impliqués dans la réponse contre le stress (oxydatif notamment), dont la surexpression entraîne une longévité accrue, et l'augmentation liée à l'âge des composants cellulaires endommagés montrent l'importance des systèmes dits de « maintenance » dans le processus du vieillissement. L'accumulation de protéines endommagées avec l'âge pose donc le problème de l'efficacité des systèmes protéolytiques en charge de l'élimination de ces protéines et particulièrement celle du système protéasomal, impliqué non seulement dans l'élimination des protéines altérées, notamment par oxydation, mais aussi dans le renouvellement continu des protéines intracellulaires [3-5]. Dès 1956, Harman, dans sa « *Free radical theory of aging* » [6], proposait que les dommages des différents composants cellulaires, provoqués par les espèces réactives de l'oxygène, représentent un facteur important dans le processus de vieillissement : le vieillissement

cellulaire serait donc dépendant de la production d'espèces réactives de l'oxygène, des défenses anti-oxydantes et de l'efficacité des systèmes responsables de l'élimination des composants cellulaires endommagés. Ces derniers systèmes de maintenance cellulaire sont également impliqués dans le vieillissement selon la théorie plus récemment énoncée par Kirkwood sous le nom de « *Disposable soma theory of aging* » [7]. La quantité de protéines endommagées par les espèces réactives de l'oxygène résultant de l'équilibre entre les taux d'oxydation et de dégradation de ces protéines, l'accumulation de protéines oxydées avec l'âge peut provenir en principe soit d'une production

accrue des dommages, soit d'une baisse de leur dégradation, soit encore de la combinaison de ces deux phénomènes (figure 1). Notre intérêt s'est donc porté sur le rôle du protéasome dans le vieillissement cellulaire puisqu'il constitue le système majeur de maintenance des protéines intracellulaires [8].

### Les protéines : cibles des dommages oxydatifs

Les espèces réactives de l'oxygène sont formées majoritairement lors de la respiration aérobie par la chaîne mitochondriale de transport d'électrons, qui conduit à la production du radical superoxyde. Celui-ci est

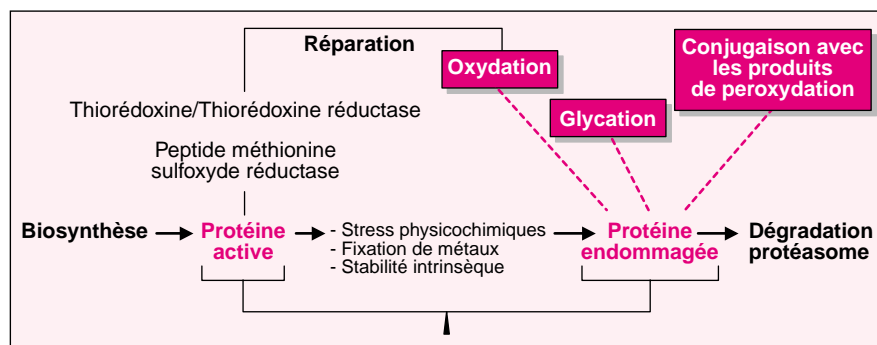


Figure 1. **Devenir des protéines intracellulaires.** Après leur biosynthèse, les protéines cellulaires acquièrent leur forme native dotée de l'activité biologique. Cependant, elles peuvent être soumises à divers types d'agressions ou de stress qui conduisent à la formation de protéines endommagées selon des mécanismes variés. Selon la nature de l'altération, la protéine peut être soit réparée, soit dégradée. Hormis la réduction des ponts disulfures et celle de la méthionine sulfoxyde, seuls mécanismes de réparation connus pour les protéines, l'élimination des autres types de dommages s'effectue par la voie de dégradation intracellulaire des protéines dépendante du protéasome. Dans les cellules jeunes, le contrôle de qualité des protéines est très strict et le taux de protéines endommagées est maintenu à un niveau très bas. En revanche, on assiste avec l'âge à une accumulation de protéines endommagées, ce qui pose le problème, en général, d'un relâchement dans le contrôle de qualité des protéines et, en particulier, d'une baisse d'efficacité du système protéasomal.

Tableau I  
ACIDES AMINÉS LES PLUS SENSIBLES À L'OXYDATION

Acide aminé	Produits d'oxydation
Cystéine	Pont disulfure, acide cystéique
Méthionine	Méthionine sulfoxyde, méthionine sulfone
Tryptophane	Hydroxytryptophane, kynurénine, hydroxy- et formyl-kynurénine
Phénylalanine	Hydroxyphénylalanine, dihydroxyphénylalanine
Tyrosine	Dihydroxyphénylalanine, ponts tyrosine-tyrosine, nitrotyrosine
Histidine	Oxohistidine, asparagine, acide aspartique
Arginine	Semialdéhyde glutamique
Lysine	Semialdéhyde $\alpha$ -aminoadipique
Proline	Semialdéhyde glutamique, hydroxyproline, pyrrolidone
Thréonine	Acide 2-amino 3-céto butyrique
Acide glutamique	Acide oxalique, acide pyruvique

La formation d'oxo-acides et d'aldéhydes comme produits d'oxydation de certains acides aminés conduit à l'apparition de groupements carbonyles sur les protéines oxydées.

converti par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène qui, en présence de traces de métaux (fer, cuivre), peut conduire à la formation du radical hydroxyle, très nocif car très oxydant et très réactif. L'oxydation des acides aminés et des protéines a été étudiée dans de nombreux laboratoires [9, 10]. Les protéines oxydées sont généralement moins actives et plus thermolabiles que les protéines natives. Presque tous les acides aminés sont susceptibles d'être oxydés, les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) et les acides aminés aromatiques étant les plus sensibles (Tableau I). Les dérivés d'oxydation des acides aminés sont constitués notamment de groupements hydroxyles et carbonyles. L'oxydation des polypeptides et protéines peut entraîner, en plus des modifications propres de leurs acides aminés, la fragmentation des chaînes polypeptidiques et/ou la formation de réticulations inter- ou intra-moléculaires. En outre, les protéines peuvent aussi être modifiées par des mécanismes secondaires, résultant de la réaction des espèces réactives de l'oxygène avec d'autres constituants cellulaires comme les carbohydrates et les lipides. Ceux-ci sont alors capables de réagir avec les protéines pour conduire à la formation d'une grande variété d'adduits [1].

En utilisant le contenu en groupements carbonyles des protéines comme index de leur degré d'oxyda-

tion, il a été clairement montré qu'il existe une augmentation significative de la quantité de protéines oxydées en fonction de l'âge dans des fibroblastes de derme, des érythrocytes et le cerveau humains, des hépatocytes de rat et aussi chez la drosophile [1, 11]. Plus récemment, nous avons montré une augmentation liée à l'âge du contenu en carbonyle des protéines dans des biopsies d'épiderme ainsi que dans les kératino-cytes en culture [12]. L'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement les protéines glyquées ou conjuguées avec des produits issus de la peroxydation lipidique, nous a permis de montrer que, parmi ces protéines porteuses de groupements carbonyles, certaines étaient également modifiées par des adduits dérivés des carbohydrates et des lipides [12]. La réduction substantielle de l'activité d'enzymes importants et l'accumulation de formes endommagées de protéines sont légitimement soupçonnées affecter l'intégrité cellulaire. On peut souligner qu'une accumulation de protéines oxydées est également observée dans un grand nombre de maladies associées au vieillissement comme la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la cataractogenèse, l'arthrite rhumatoïde ou les pathologies caractérisées par un vieillissement accéléré comme la progeria et le syndrome de Werner [1]. Une caractéristique supplémentaire de ces protéines endommagées

qui s'accumulent au cours du vieillissement est qu'on les retrouve le plus souvent sous forme de protéines réticulées et/ou agrégées. L'exemple type est la lipofuscine, un pigment insoluble fluorescent de composition mal connue et issu de la réticulation de protéines, lipides et carbohydrates, qui s'accumule au cours du vieillissement dans les cellules post-mitotiques [13]. Comme ces agrégats fluorescents sont retrouvés principalement dans les lysosomes, un dysfonctionnement de ce système de dégradation a été proposé par différents auteurs [14]. On peut aussi envisager que la formation de ces agrégats découle d'un dysfonctionnement, en amont, du système protéasomal de dégradation des protéines endommagées dans le cytosol.

Les protéines représentent donc une cible cellulaire des espèces réactives de l'oxygène mais, à l'inverse des acides nucléiques dont les lésions oxydatives peuvent être réparées par des systèmes enzymatiques spécifiques, il n'existe que très peu de systèmes enzymatiques capables d'inverser celles des protéines. En effet, hormis le système thioredoxine-thioredoxine réductase capable de réduire les ponts disulfures issus de l'oxydation des cystéines [15] et la peptide méthionine sulfoxyde réductase permettant de réduire la méthionine sulfoxyde (produit d'oxydation de la méthionine) [16] (figure 1), le seul processus d'élimination

des protéines cellulaires endommagées est leur dégradation, en particulier par le protéasome.

### Dégradation des protéines oxydées par le protéasome

Les protéines ayant été exposées à divers oxydants sont, d'une façon générale, plus sensibles à la dégradation par les protéases. Cet effet est corrélé à une augmentation de l'hydrophobicité des protéines due à l'exposition à leur surface de séquences hydrophobes qui sont normalement localisées à l'intérieur de la protéine. Le protéasome fixant plus volontiers les acides aminés aromatiques et hydrophobes, il a été proposé que ces séquences hydrophobes exposées à la surface des protéines favoriseraient leur reconnaissance et leur clivage protéolytique [4].

Dès 1985, J. Rivett avait montré que la dégradation sélective de la glutamine synthétase oxydée était due à une protéase non-lysosomale, appelée alors la protéase multicatalytique et connue maintenant sous le nom de protéasome [17]. Depuis, de nombreuses autres études ont démontré que le protéasome constitue le principal processus de dégradation des protéines oxydées, en utilisant principalement une voie indépendante de l'ubiquitine et de l'ATP [4]. Cependant, certaines études, notamment celles de A. Taylor *et al.*, ont montré que la dégradation des protéines oxydées dans les cellules épithéliales du cristallin était accomplie à la fois par les voies dépendantes et indépendantes de l'ATP et de l'ubiquitine [18].

Le système protéasomique est constitué d'un complexe catalytique, le protéasome 20S, et de plusieurs composants régulateurs qui influent sur son activité et sa spécificité [3, 5]. Il est maintenant admis que le protéasome est localisé dans les cellules de mammifères à la fois dans le cytosol et dans le noyau, et qu'il existe des interactions avec le réticulum endoplasmique et la membrane cellulaire. Le protéasome 20S est composé de 14 sous-unités différentes codées par des gènes soit de type  $\alpha$ , soit de type  $\beta$ , et arrangées en un empilement

cylindrique de 4 anneaux de 7 sous-unités, les anneaux apicaux étant constitués de sous-unités  $\alpha$  et les anneaux centraux de sous-unités  $\beta$ . Ce complexe protéolytique clive préférentiellement les protéines au niveau de l'extrémité carboxy-terminale des résidus basiques (activité *trypsin-like*), hydrophobes (activité *chymotrypsin-like*) et acides (activité *peptidylglutamyl-peptide hydrolase*). Ces activités peptidases sont portées par 3 sous-unités  $\beta$  différentes et sont localisées à l'intérieur de la structure, évitant ainsi la dégradation intempestive des protéines cellulaires mais posant le problème de l'accessibilité des sites actifs à leurs substrats potentiels. L'association du régulateur 19S au protéasome 20S forme le protéasome 26S qui assure la dégradation des protéines ubiquitinylées. Un autre activateur du protéasome est le PA 28 ou régulateur 11S dont l'association avec le protéasome 20S conduit à une activation de 3 à 25 fois de la dégradation de peptides fluorogènes couramment utilisés pour mesurer les activités peptidases individuelles du protéasome 20S.

Le rôle du stress oxydant sur l'activité du protéasome est encore mal connu. Aucune modification de la quantité de sous-unités du protéasome n'a en effet été mise en évidence. De plus, si une inactivation du protéasome a été observée dans certaines études [8], d'autres auteurs ont rapporté une augmentation transitoire des activités peptidases du protéasome qu'ils ont interprétée comme résultant de l'association du régulateur 11S au protéasome 20S [19]. D'autre part, nous avons montré que le traitement prolongé d'une enzyme, la glucose 6-phosphate déshydrogénase, par le produit de peroxydation lipidique 4-hydroxy-2-nonenal, entraîne une inactivation de la protéine qui devient plus résistante que la protéine native à la protéolyse par le protéasome. Cette résistance s'accompagne de la formation de protéines réticulées qui, bien que non dégradées par le protéasome, interagissent avec celui-ci et inhibent de façon non compétitive son activité de dégradation d'autres protéines oxydées, substrats du protéasome [20]. Ces résultats pourraient rendre

compte, au moins pour partie, à la fois de l'accumulation dans la cellule de protéines riches en groupements carbonyles et de l'inhibition du protéasome au cours du vieillissement.

### Protéasome et vieillissement

L'augmentation avec l'âge de la quantité de protéines endommagées par voie oxydative et, d'une façon plus générale, de la demi-vie des protéines [21], est en faveur d'une possible réduction de l'efficacité du système protéasomique. Comme les connaissances sur la fonction, la régulation et l'interaction des différents composants du protéasome restent encore limitées, les études entreprises pour répondre à cette question ont tout d'abord porté sur les activités peptidases du protéasome 20S. L'activité protéolytique du protéasome est délicate à déterminer dans des homogénats cellulaires: elle peut en effet être affectée par la présence d'inhibiteurs ou d'activateurs endogènes ou encore de substrats protéiques compétiteurs. Cependant, il avait été suggéré que l'activité « protéase neutre », qui avait été assimilée à celle du protéasome, diminuait avec l'âge. La mesure des activités peptidases individuelles (*trypsin-like*, *chymotrypsin-like* et *peptidylglutamyl-peptide hydrolase*) du protéasome, purifié à partir du foie de rat Fisher 344 âgé de 8 et 24 mois, nous a permis de montrer une diminution d'activité avec l'âge, tout particulièrement l'activité *peptidylglutamyl-peptide hydrolase* [22]. Des résultats semblables ont été observés dans le foie et d'autres organes [8]. Dans une étude avec le groupe de Y. Milner\*, nous avons également observé, sur des biopsies d'épiderme humain et des kératinocytes en culture, que l'augmentation de la quantité de protéines oxydées avec l'âge était accompagnée d'une diminution de l'activité du protéasome.

\* Membres contracteurs de l'Action à frais partagés « Protage: The role of proteasome in human ageing: implication for anti-ageing strategies » (QLK6-CT1999-02193), 5<sup>e</sup> PCRD de la Communauté européenne, programme: « Quality of life and management of living resources », action clé n° 6.2: « The ageing population-determinants of healthy ageing ». Autres membres contracteurs: B. Clark, J. Rivett et O. Toussaint; coordonnateur: B. Friguet.

some [12]. Cette baisse d'activité est due en partie à une inactivation du protéasome [23] mais aussi à la diminution de la quantité de protéasome [12].

Ces résultats suggéraient que l'expression du protéasome diminue avec l'âge, hypothèse confirmée par deux études récentes sur le transcriptome, l'une portant sur le vieillissement post-mitotique de cellules musculaires squelettiques de rats [24], et l'autre sur des fibroblastes humains [25], cellules qui conservent la capacité de se diviser jusqu'à leur entrée en sénescence répliative. Dans ces deux études, l'expression de plus de 6 000 gènes a été étudiée par la technique de *micro-arrays*. Les auteurs n'ont observé de variation du transcriptome que pour une soixantaine de gènes, soit moins de 1 % des gènes testés, avec pratiquement aucun recoupement entre les deux études, à l'exception notable de certains gènes impliqués dans la réponse au stress et ceux du système protéasomal dont l'expression était diminuée. Dans l'étude de T. Prolla *et al.* [24], qui analysait en outre les effets de la restriction calorique, seul moyen actuellement connu pour ralentir le vieillissement chez les mammifères, le profil transcriptionnel observé permettait aux auteurs de proposer que la restriction calorique puisse agir *via* l'augmentation du renouvellement des protéines et la diminution des dommages aux macromolécules. Enfin, en collaboration avec les groupes de E. Gonos et de C. Franceschi\*, nous avons analysé l'expression et l'activité protéolytique du protéasome dans des fibroblastes de derme humain de donneurs de différents âges dont des centenaires [26]. De manière intéressante, si on observe dans des cellules provenant de donneurs âgés une diminution de l'expression des transcrits pour les 3 sous-unités du protéasome analysées (X, N3 et C2) couplée à une diminution de l'activité protéolytique, les cellules en culture des quatre centenaires conservent un niveau d'expression et d'activité du protéasome proche de celui des jeunes donneurs. Si des études supplémentaires sont encore nécessaires pour évaluer précisément le rôle du

protéasome dans le processus de vieillissement, cette étude apporte des éléments qui permettent d'envisager que le maintien du niveau de l'expression et de l'activité du protéasome, observé dans les cultures de fibroblastes de centenaires, ait pu contribuer au vieillissement « en bonne santé » de ces individus. En conclusion, l'ensemble de ces résultats indique clairement qu'il existe une diminution de l'activité du protéasome avec l'âge, qui pourrait participer directement à l'accumulation des protéines endommagées au cours du vieillissement et pendant la progression de certaines pathologies associées. Le prochain objectif sera de définir précisément, parmi les mécanismes potentiellement impliqués, celui ou ceux qui sont les plus pertinents *in vivo*, diminution de l'expression du protéasome, modifications structurales et fonctionnelles, inhibition de l'activité par certains types de protéines endommagées, afin de développer des stratégies destinées à prévenir les effets du vieillissement sur la fonction du système protéasomal ■

## RÉFÉRENCES

1. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 20313-6.
2. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998 ; 78 : 547-81.
3. Coux O, Piechaczyk M. Le système ubiquitine/protéasome : un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines. *Med Sci* 2000 ; 16 : 623-9.
4. Grune T, Reinheckel T, Davies KJA. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J* 1997 ; 11 : 526-34.

### Bertrand Friguet

Université Paris 7-Denis-Diderot, Laboratoire de biologie et biochimie cellulaire du Vieillessement, EA 3106, cc 7128, 2, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France.

5. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 1999 ; 68 : 1015-68.
6. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956 ; 11 : 298-300.
7. Kirkwood TB. Immortality of the germline versus disposability of the soma. *Basic Life Sci* 1987 ; 42 : 209-18.
8. Friguet B, Bulteau AL, Chondrogianni N, Conconi M, Petropoulos I. Protein degradation by the proteasome and its implication in aging. *Ann NY Acad Sci* 2000 ; 908 : 143-54.
9. Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals: I. General aspects. *J Biol Chem* 1987 ; 262 : 9895-901.
10. Stadtman ER. Oxidation of free aminoacids and aminoacid residues in proteins by radiolysis and metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 1993 ; 62 : 797-821.
11. Sohal RS, Agarwal S, Dubey A, Orr WC. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 7255-9.
12. Petropoulos I, Conconi M, Wang X, *et al.* Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells. *J Gerontol A Biol Sci* 2000 ; 55A : B220-7.
13. Yin D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic Biol Med* 1996 ; 21 : 871-88.
14. Terman A. The effect of age on formation and elimination of autophagic vacuoles in mouse hepatocytes. In: Kitani K, Ivy GO, Shimasaki H, eds. *Lipofuscin and ceroid pigments*. Basel: S. Karger, 1995: 319-25.
15. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 13963-6.
16. Moskovitz J, Berlett BS, Poston JM, Stadtman ER. Methionine sulfoxide reductase in antioxidant defense. *Meth Enzymol* 1999 ; 300 : 239-44.
17. Rivett AJ. Purification of a liver alkaline protease which degrades oxidatively modified glutamine synthetase: characterization as a high molecular weight cysteine proteinase. *J Biol Chem* 1985 ; 260 : 12600-6.
18. Shang F, Taylor A. Oxidative stress and recovery from oxidative stress are associated with altered ubiquitin conjugating and proteolytic activities in bovine lens epithelial cells. *Biochem J* 1995 ; 307 : 297-303.
19. Strack PR, Waxman L, Fagan JM. Activation of the multicatalytic endopeptidase by oxidants. Effects on enzyme structure. *Biochemistry* 1996 ; 35 : 7142-9.

## RÉFÉRENCES

20. Friguet B, Szweda LI. Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein. *FEBS Lett* 1997 ; 405 : 21-5.
21. Goto S, Hasegawa A, Nakamoto H, Nakamura A, Takahashi R, Kurochkin IV. Age-associated changes of oxidative modification and turnover of proteins. In: Cutler RG, Packer L, Bertram J, Mori A, eds. *Oxidative stress and aging*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1995 : 151-8.
22. Conconi M, Szweda LI, Levine RL, Stadtman ER, Friguet B. Age-related decline of rat liver multicatalytic proteinase activity and protection from oxidative inactivation by heat-shock protein 90. *Arch Biochem Biophys* 1996 ; 331 : 232-40.
23. Bulteau AL, Petropoulos I, Friguet B. Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. *Exp Gerontol* 2000 ; 35 : 767-77.
24. Lee C-K, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 1999 ; 285 : 1390-3.
25. Ly DH, Lockhart DJ, Lerner RA, Schultz PG. Mitotic misregulation and human aging. *Science* 2000 ; 287 : 2486-92.
26. Chondrogianni N, Petropoulos I, Franceschi C, Friguet B, Gonos ES. Fibroblast cultures from healthy centenarians express an active proteasome. *Exp Gerontol* 2000 ; 35 : 721-8.

## TIRÉS À PART

B. Friguet.

## BRÈVES

### ■ ■ ■ Bricoleurs du génome, attention ! Un phénotype peut en cacher un autre...

Si les modifications du génome de la souris ont permis d'éclairer la fonction de nombreux gènes, quelques exemples récents nous montrent combien l'interprétation des phénotypes observés doit parfois être prudente. On sait que les souris invalidées pour les deux facteurs myogéniques précoces, *Myf5* et *MyoD*, naissent totalement dépourvues de fibres musculaires squelettiques, tandis que chez les embryons *Myf5*<sup>-/-</sup>, le développement de la première masse musculaire, le myotome, est seulement retardé de deux jours et établi sous le contrôle de *MyoD* ([1] et *m/s* 2000, n° 12, p. 1428). Mais les animaux meurent à la naissance d'incapacité respiratoire due à un défaut de formation des côtes distales. Ce phénotype était totalement inattendu : l'expression de *Myf5* n'a en effet jamais été détectée dans les précurseurs des côtes. Or, le myotome (et plus tardivement les muscles intercostaux) et les précurseurs des côtes se développent dans des compartiments adja-

cents. Il a été initialement proposé que ce soit le délai de formation du myotome chez les mutants *Myf5* qui perturbe le développement des côtes sans qu'il y ait d'atteinte de la production des facteurs de croissance (par exemple les FGF, *fibroblast growth factors*) nécessaires au développement des côtes par les cellules du myotome. Cependant, l'obtention de souris avec de nouvelles mutations dans le locus *Myf5*, notamment celles éliminant la cassette (pgk-néomycine) permettant la sélection des événements de recombinaison homologue dans les cellules ES, montre que les mutants ne présentent plus de malformation des côtes et sont viables et fertiles [2]. Les phénotypes des côtes sont donc indépendants des phénotypes musculaires dus à l'absence seule de *Myf5*. L'hypothèse retenue est la suivante : l'introduction de la cassette de sélection perturberait l'expression d'un gène avoisinant impliqué dans la formation des côtes. Or, le gène *Mrf4* (un facteur myogénique tardif) se situe environ 9 kpb en amont de *Myf5*, et l'on ne

peut pas totalement exclure pour l'instant que l'expression du gène *Mrf4* ne soit pas perturbée par les manipulations du locus *Myf5*. Ces études montrent l'importance des séquences en *cis* qui pourraient potentiellement perturber l'expression des gènes avoisinants. Un autre exemple est fourni par l'inactivation du gène *radical fringe* : le phénotype observé était en fait dû à la cassette de sélection [3], ce qui était d'autant plus étonnant qu'il correspondait au phénotype attendu. Enfin, il apparaît que la cassette en question (pgk-néomycine) puisse perturber l'expression d'un autre gène situé à 100 kpb de la cassette [4].

[1. Tajbakhsh S, et al. *Curr Top Dev Biol* 2000 ; 48 : 225-68.]

[2. Kaul A, et al. *Cell* 2000 ; 102 : 17-19.]

[3. Moran JL, et al. *Nature* 1999 ; 399 : 742-3.]

[4. Pham CT, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 13090-5.]