



## Complémentation

La complémentation peut être définie comme la résultante phénotypique sauvage de la confrontation de deux mutations récessives. Deux mutations peuvent conduire au même phénotype sans pour autant affecter le même gène. Par exemple, dans une chaîne de biosynthèse métabolique conduisant à la synthèse du produit P à partir d'un substrat S grâce à une succession de trois réactions enzymatiques catalysées par les enzymes X, Y, Z, des mutations inactivant les produits des gènes X, Y ou Z conduiront à l'absence de synthèse du produit P et donc à la nécessité pour la cellule de se le procurer dans le milieu (auxotrophie).

Ces mutations seront phénotypiquement indiscernables. Le problème, pour le généticien, consistera donc à déterminer combien de fonctions différentes, lorsqu'elles sont altérées, peuvent conduire au phénotype mutant. Il faut donc pour cela définir des unités fonctionnelles. Le test de complémentation permet la confrontation de deux allèles sans qu'il y ait échange de matériel génétique. Ce test ne donne aucune information sur la liaison génétique des mutations étudiées et est donc totalement différent du test de recombinaison qui permet d'évaluer la liaison génétique entre deux mutations.

### Bref historique : de la confrontation de deux mutations à la notion de cistron

La confrontation de deux mutations dans un même organisme peut s'effectuer à l'aide des cycles biologiques naturels ou bien, lorsque cela n'est pas possible, grâce à différentes astuces développées par les expérimentateurs. Par exemple, dès 1944, Beadle et Coonradt [1] utilisèrent la possibilité d'obtenir la fusion végétative de deux souches mutantes de *Neurospora crassa*. Le mycélium résultant porte les deux

types de noyaux et, dans un tel mycélium, il y a donc confrontation des deux mutations. Ces auteurs ont ainsi pu montrer que les mutations *nic-1* et *nic-2*, toutes deux liées au sexe, conduisent à un hétérocaryon de type sauvage. La complémentation ainsi observée dans des hétérocaryons, dans lesquels chacune des deux mutations est portée par un noyau différent, exclut toute possibilité de recombinaison mitotique et suggère que les produits des gènes concernés soient diffusibles dans la cellule.

La complémentation peut aussi être étudiée chez des organismes plus complexes grâce à la reproduction sexuée, par exemple chez la drosophile ou chez la souris. Dans ce cas, chaque parent apporte un allèle, et la confrontation phénotypique s'effectue dans la descendance diploïde. L'un des tout premiers tests de complémentation a été effectué en 1949 par Green et Green [2] sur des mutants du locus *lozenge* de drosophile. Ces mutations affectent l'aspect de l'œil de la drosophile et sont donc facilement observables dans la descendance. Ces auteurs ont étudié trois mutations du locus *lozenge*. Ces mutations sont suffisamment distantes entre elles pour que des *crossing-over* soient obtenus avec une faible fréquence. Ces études ont permis de montrer pour la première fois que le phénotype (aspect de l'œil) résultant de la confrontation de ces mutations est différent selon que les deux mutations sont portées, par le même chromosome (configuration *cis*) ou par chacun des homologues (configuration *trans*).

Seymour Benzer en 1955 [3] a, le premier, utilisé le test de complémentation (*figure 1*) pour définir de façon systématique des unités de fonction dans le génome du bactériophage T4. Dans cet organisme, chaque génome mutant est encapsidé indépendamment. Pour qu'il y

ait confrontation des allèles, il faut que ces deux génomes s'expriment à un même moment dans la même cellule hôte. Cela peut être obtenu en mélangeant deux types de particules phagiques au cours de l'infection. Ainsi, Benzer a pu montrer, par des expériences de co-infection d'une souche K-12S d'*Escherichia coli* avec des mutants  $\lambda$ I du phage T4 qui altèrent la production de particules phagiques, que la co-infection avec certaines combinaisons de mutants peut restaurer la production de particules phagiques. Les mutants  $\lambda$ I ont été classés par ce test de co-infection en deux groupes appelés A et B. Ces segments fonctionnellement séparables définissent donc des unités de fonction qui ont été appelées *cistrons*.

L'étude de la complémentation de mutations conduisant à un même phénotype permettra de savoir si ces mutations appartiennent à une même « unité de complémentation » ou cistron. Cette étude est appelée test de complémentation ou test fonctionnel d'allélisme.

### Le test de complémentation

Le principe de ce test est de confronter en configuration *trans* (parfois aussi en configuration *cis*) dans un même organisme, deux mutations conduisant à un même phénotype. Ces mutations doivent être récessives et leur fréquence de réversion ne doit pas être trop élevée. On dira qu'il y a complémentation si la confrontation conduit au rétablissement du phénotype sauvage et non-complémentation dans le cas contraire.

Les résultats du test sont interprétés de la façon suivante. L'observation d'une non-complémentation en *trans* mais d'une complémentation en *cis* (*figure 1A*) indique que les deux mutations touchent le même cistron et suggère qu'elles affectent le même

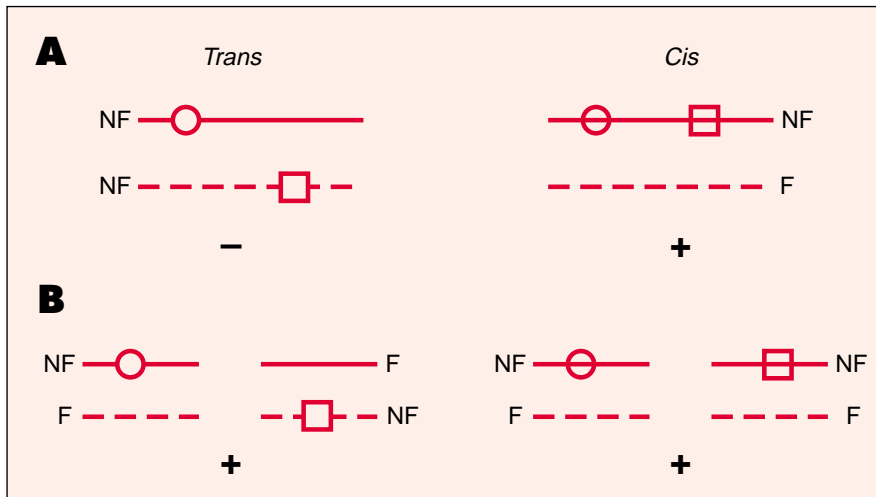


Figure 1. **Représentation de l'interprétation du test de complémentation.** Les mutations confrontées sont symbolisées par un cercle et par un rectangle. Les traits horizontaux figurent les gènes (en plein ou en pointillé selon le parent d'origine). F et NF signifient respectivement fonctionnel et non fonctionnel. Les configurations en cis ou en trans sont présentées respectivement dans les colonnes de droite et de gauche. Les signes - et + se rapportent au résultat du test de complémentation (- signifiant non-complémentation et + complémentation). **A.** Les mutations sont portées par un même gène. **B.** Les mutations sont portées par deux gènes différents.

gène. La complémentation, à la fois en *trans* et en *cis*, indique que les mutations touchent deux cistrons différents et donc vraisemblablement deux gènes différents (figure 1B). La correspondance entre gène et cistron sera discutée plus loin.

Bien que cette interprétation des résultats du test de complémentation s'avère exacte dans la plupart des cas, elle est parfois fautive. Quelques exemples sont décrits ci-dessous.

### La complémentation interallélique (ou complémentation allélique)

Il s'agit d'un phénomène qui a été observé chez de nombreux organismes et qui conduit à la complémentation en *trans* de mutations très liées et affectant la même activité enzymatique.

Un des premiers exemples décrits [4] concerne l'adénylosuccinate lyase, une enzyme de la voie de biosynthèse des purines chez *Neurospora crassa*. Les mutants affectés pour cette activité enzymatique sont incapables de croître en absence d'adénine dans le milieu. La confrontation de certains mutants de *N. crassa* au

locus *ad-4* conduit à une restauration de la prototrophie pour l'adénine. Cependant, cette complémentation interallélique conduit à une activité adénylosuccinate lyase ne dépassant pas 25 % de celle observée dans une souche sauvage, mais cette activité est suffisante pour restaurer la prototrophie pour l'adénine. En conséquence, la complémentation interallélique peut apparaître complète ou incomplète selon le phénotype qui est observé. Par la suite, Woodward [5] a montré que le fait de mélanger *in vitro* des extraits de mycélium de mutants complémentaires de *N. crassa* permettait de restaurer l'activité enzymatique, suggérant que les produits des gènes mutés pouvaient interagir *in vitro* et conduire à une « complémentation enzymatique ».

La complémentation interallélique est généralement interprétée comme le résultat d'une interaction entre sous-unités protéiques (le cas le plus simple étant l'homo-multimère). Une théorie de la complémentation interallélique a été proposée par Crick et Orgel [6] soutenant l'hypothèse selon laquelle les mutations affectent la structure du polypeptide empêchant la formation

de multimères. Si les deux mutations affectent des régions différentes du polypeptide, la région non mutée dans une des chaînes corrigerait la région mutée de l'autre et le multimère pourrait se former. Plus récemment, il a été montré que, pour l'alcool déshydrogénase de maïs [7], c'est la stabilité du multimère (plus que son assemblage) qui pourrait être affectée dans chacun des mutants et qui serait rétablie lors de la complémentation interallélique. Ces hypothèses selon lesquelles les mutations « complémentantes » affecteraient l'assemblage ou la stabilité du multimère sont en parfait accord avec les résultats de Hawthorne et Friis [8] montrant que le phénotype de ce type de mutations peut généralement être modulé par une variation de la pression osmotique ou un changement de la température de culture. Une représentation schématique de la complémentation interallélique est présentée dans la figure 2. Les lecteurs qui souhaiteraient approfondir leur réflexion sont invités à lire l'intéressante revue de Fincham [9] sur ce sujet.

Outre ces cas « classiques » de complémentation interallélique, citons le phénomène de transvection qui a été observé principalement chez la drosophile mais pourrait également exister chez les mammifères (pour revue voir [10, 11]). Chez la drosophile, des mutations qui affectent en *cis* l'expression d'un gène peuvent être compensées par l'apport d'une séquence stimulatrice (ou *enhancer*) en *trans* à condition qu'il puisse y avoir appariement des chromosomes homologues. Le modèle moléculaire proposé pour expliquer ce phénomène est que l'activateur de transcription pourrait se fixer sur la copie intacte de la séquence stimulatrice et activer l'unité de transcription non mutée portée par l'homologue apparié (figure 3).

Le test de complémentation étant un test phénotypique, son interprétation correcte dépend du fait que le phénotype observé est étroitement lié à la mutation étudiée. Cette remarque peut paraître triviale mais a été parfaitement illustrée par l'exemple récent d'une maladie humaine d'origine génétique. Cette maladie autosomique récessive, l'ataxie télangiectasie, est héritée de façon monogé-

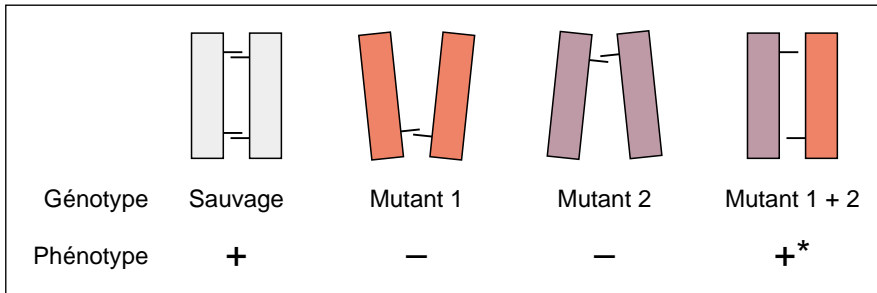


Figure 2. **Visualisation schématique d'un cas de complémentation interallélique dans un gène codant pour une enzyme active sous forme homodimérique.** Dans cette représentation deux régions d'interaction sont nécessaires à l'assemblage de l'enzyme fonctionnelle. Quatre combinaisons génotypiques sont représentées: homozygote sauvage, homozygote mutant 1, homozygote mutant 2 et hétérozygote mutant 1/mutant 2. Le phénotype observé pour chaque génotype est indiqué sous le génotype: «+» signifie un phénotype sauvage, «-» un phénotype mutant et «+\*» indique un phénotype qualitativement sauvage mais quantitativement intermédiaire entre sauvage et mutant.

nique. Les patients atteints d'ataxie, qui présentent une hypersensibilité aux radiations ionisantes, avaient été placés dans quatre groupes de complémentation sur la base d'un test dans lequel les cellules des patients étaient fusionnées entre elles. Les hybrides ainsi obtenus étaient testés pour leur sensibilité aux radiations ionisantes. La complémentation était considérée comme réalisée pour les hybrides ayant recouvré une sensibilité normale aux radiations. Le clonage du gène *ATM* [13] a révélé que les patients des quatre groupes de complémentation portaient des mutations dans ce gène. La principale surprise est venue du fait que, dans certains cas au moins, il ne pouvait pas s'agir de complémentation intragénique puisque des patients affectés à

différents groupes de complémentation portaient exactement la même mutation. Dans ce cas, l'interprétation est la suivante: le phénotype utilisé pour l'établissement des groupes de complémentation n'est pas une conséquence directe de la mutation et l'expression de ce phénotype dépend du contexte génétique de chaque patient [13, 14]. Ce type de «fausse complémentation» ne devrait donc pas être observable dans un contexte isogénique.

**Non complémentation entre mutations non liées (ou non complémentation non allélique)**

On dit qu'il y a non-complémentation entre mutations non liées

lorsque deux mutations non liées génétiquement (et donc vraisemblablement dans des gènes différents) ne complètent pas.

Le phénomène de non-complémentation non allélique est généralement interprété comme l'indication d'une interaction physique entre les produits des gènes mutés. Un des cas les mieux documentés concerne les gènes de tubuline chez la levure, les gènes *TUB1* et *TUB3* codent pour l' $\alpha$ -tubuline, tandis que le gène *TUB2* code pour la  $\beta$ -tubuline. Stearns et Botstein [15] ont mis en évidence des cas de non-complémentation entre certains allèles de *TUB1* et *TUB2* et ont proposé deux modèles pour rendre compte de la non-complémentation (figure 4). On sait que des hétérodimères d' $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline servent à la formation des microtubules. Si chacune des mutations conduit à un hétérodimère non fonctionnel, dans chacun des simples hétérozygotes il y aura 50% d'hétérodimères fonctionnels tandis que dans le double hétérozygote il n'y en aura statistiquement que 25% (figure 4A). Dans ce modèle, c'est la quantité d'hétérodimère qui deviendrait limitante. Un autre cas de figure (parfois appelé complexe poison) consiste à penser que la combinaison des deux mutations conduirait à un hétérodimère qui en plus d'être non fonctionnel serait délétère pour la cellule, par exemple dans le cas de la tubuline en bloquant l'assemblage des microtubules (figure 4B). Dans ce cas, il serait intéressant de connaître le résultat du test de complémentation en *cis* (qui n'est généralement pas effectué). En effet, contrairement au résultat «classique» du test de complémentation et quel que soit le modèle envisagé, on s'attendrait à retrouver le phénotype mutant si les deux mutations sont apportées dans une configuration en *cis*.

Dans la première hypothèse la non-complémentation pourrait être non spécifique de l'allèle, tandis que le deuxième modèle prédirait une spécificité d'allèle. Qu'en est-il? En fait, les deux cas modèles sont observés. Par exemple, les cas de non complémentation entre *TUB1* et *TUB2* évoqués ci-dessus sont spécifiques

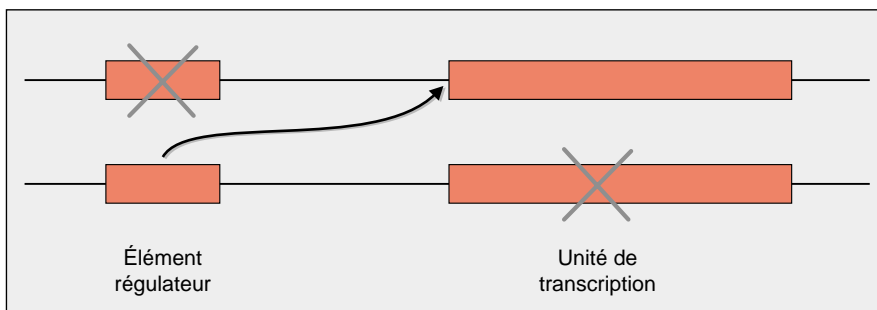


Figure 3. **Modèle moléculaire de transvection.** Les deux allèles capables de complémentation sont représentés par des croix, l'un est dans l'élément régulateur et l'autre dans l'unité de transcription. (Adapté de [12].)

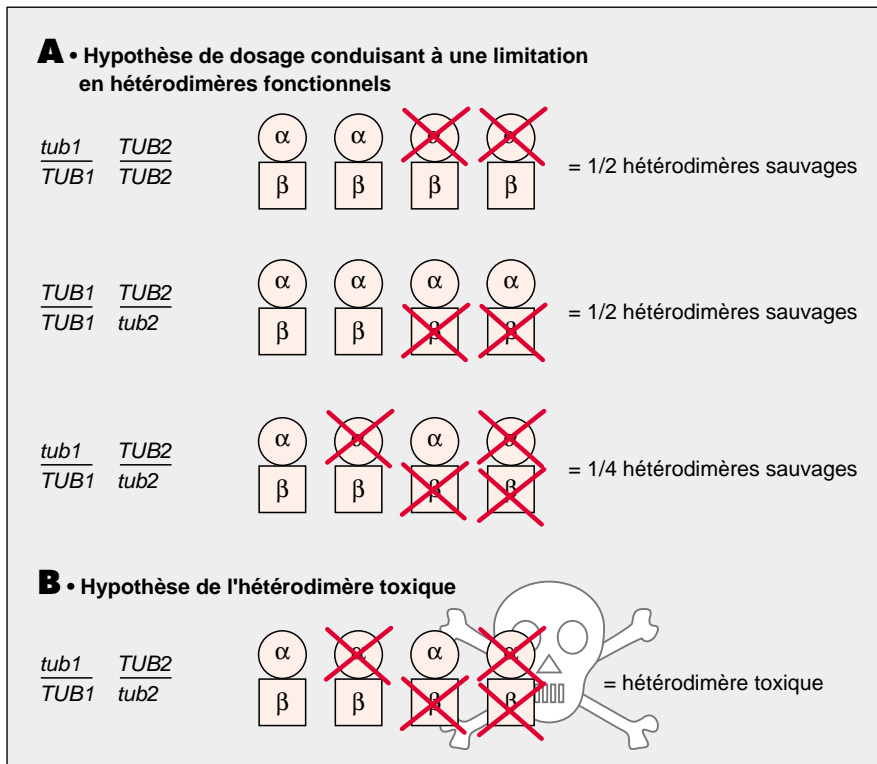


Figure 4. **Modèles susceptibles de rendre compte du phénomène de non complémentation entre mutations non liées.** (Adapté de Stearns et Botstein.)

d'allèles [15]. Le fait que la non-complémentation puisse être observée avec certains mutants mais pas avec d'autres (au moins aussi sévèrement affectés phénotypiquement) suggère que la non-complémentation ne résulte pas uniquement de l'additivité phénotypique des deux mutations et que ce phénomène ne se réduit pas à l'équation « malade + malade = mort ».

Par ailleurs, Stearns et Botstein [15] ont montré qu'il pouvait exister des cas de non-complémentation non spécifique d'allèle entre *TUB1* et *TUB3*. Plus récemment, un autre cas de non-complémentation non spécifique d'allèle a été décrit dans l'assemblage de la protéine majeure du spermatozoïde de *Caenorhabditis elegans* [16].

Le phénomène de non-complémentation entre mutations non liées a également été observé *in vitro* dans le cas du complexe de réparation par excision de nucléotides chez le hamster [17]. Ces résultats de non-

complémentation sont en désaccord avec la complémentation obtenue lors d'une fusion de cellules. Ces auteurs interprètent ces résultats en suggérant que les complexes « simple mutant » seraient instables et rapidement dégradés, ou bien qu'ils ne pourraient pas se dissocier pour reformer *in vitro* le complexe sauvage.

### Complémentation et notion de gène

Historiquement, les expériences de complémentation ont considérablement modifié notre approche de la notion de gène, remettant en cause le gène en tant qu'unité de mutation et la relation « un gène/une enzyme » proposée par Beadle et Tatum. Les résultats du test de complémentation devraient en théorie permettre de déterminer si deux mutations sont dans un même gène ou non. La situation est beaucoup plus complexe et la définition du gène est toujours un sujet de contro-

verse (voir lexique : « Le gène, un concept flou », à paraître dans un prochain numéro). On peut donc discuter de la validité du test de complémentation pour définir l'unité génique (unité d'information) selon que l'on se place d'un point de vue structural ou fonctionnel.

Nous avons vu que l'interprétation des résultats du test de complémentation souffre de multiples exceptions qui ont permis de montrer que la notion « un gène/une enzyme » n'est pas suffisante pour définir le gène. Le test de complémentation définit des cistrons qui sont des unités fonctionnelles et qui souvent révèlent le caractère modulaire des protéines : un polypeptide pouvant porter plusieurs domaines fonctionnels et une fonction pouvant requérir plusieurs polypeptides. Par exemple, la complémentation inter-allélique révèle des peptides à plusieurs domaines, voire portant plus d'une activité enzymatique (c'est le cas par exemple du gène *ADE5,7* chez *Saccharomyces cerevisiae* qui code pour un polypeptide portant deux activités enzymatiques nécessaires à la biosynthèse des purines). Dans ce cas, le test de complémentation révèle la complémentation des mutations affectant une activité par les mutations affectant l'autre. Le phénomène de non-complémentation entre mutations non liées révèle que plusieurs gènes sont parfois nécessaires à une activité enzymatique, soit, comme c'est le cas pour *TUB1* et *TUB2*, parce que les produits de ces gènes interviennent dans la formation d'hétérodimères, soit, comme c'est le cas pour *TUB1* et *TUB3*, parce que les deux gènes spécifient le même produit. Les cas de transvection remettent en question la notion de *cis* et *trans* dans la mesure où deux allèles portés par des homologues différents peuvent être à certains stades de la vie cellulaire capables d'interagir physiquement. Ce phénomène souligne combien il est important de considérer les séquences régulatrices en *cis* dans la définition de l'unité génique et nous rappelle que les gènes, si on veut les définir de façon stricte, ne sont pas dissociables des unités structurales qui les portent : les chromosomes.

## Extension de la notion de complémentation et abus de langage

Le terme complémentation est fréquemment employé dans une acception plus large. On entend souvent parler de complémentation pour parler de la restauration d'un phénotype sauvage dans une souche mutante par introduction d'une copie de l'allèle sauvage porté par un vecteur. Si le gène est exprimé sous contrôle de son propre promoteur et est présent à une seule copie par cellule, il y a effectivement complémentation fonctionnelle dans le sens où l'on confronte un génome muté et un génome partiel (qui en fait ne contient que le gène porté par l'épissome). Il y a alors confrontation entre un génome muté dans un gène et un génome auquel il manque tous les gènes sauf un (porté par l'épissome). On ne peut cependant pas parler de test de complémentation dans la mesure où ces deux génomes mutés ne conduisent pas à un même phénotype. Si le gène « candidat complémant » est exprimé sous contrôle d'un promoteur fort ou est porté par un vecteur présent en plusieurs copies dans la cellule, la quantité de produit apportée ne correspond plus à celle spécifiée normalement par le génome. La suppression du phénotype n'est alors pas nécessairement due à une complémentation fonctionnelle [18]. En conséquence, il faut d'abord s'assurer que le gène « candidat complémant » correspond bien à la fonction mutée avant de parler de complémentation.

La notion de complémentation fonctionnelle est même souvent étendue à la suppression phénotypique d'une mutation par un gène provenant d'un autre organisme et spécifiant un produit qui peut fonctionnellement remplacer la produit muté. La « complémentation » par un gène hétérologue ne permet pas de conclure de façon sûre que, dans sa cellule d'origine, le gène « complémant » joue exactement le même rôle que celui joué par le gène muté qu'il supprime phénotypiquement. De plus, le produit du gène hétérologue est généralement surexprimé

dans la cellule hôte et cette surexpression peut affecter sa localisation intracellulaire ou compenser une faible affinité pour le substrat. La limite entre complémentation fonctionnelle et suppression phénotypique par surexpression est donc ténue. En résumé, si l'on considère la fonction du produit d'un gène comme sa « fonction biochimique » (kinase, activateur de transcription...), on peut parler de complémentation fonctionnelle. En revanche, le terme de suppression phénotypique est préférable si l'on considère la fonction du produit du gène plus largement comme sa « fonction biologique ». Celle-ci peut en effet être très différente d'une cellule à l'autre même si la fonction biochimique est interchangeable.

Lorsque le gène surexprimé spécifie un produit de « fonction biochimique » différente de celle du gène muté, il est abusif de parler de complémentation fonctionnelle puisque la surexpression permet juste de restaurer un phénotype sauvage en contournant l'effet de la mutation d'origine, il s'agit là de suppression phénotypique [18] ■

### Bertrand Daignan-Fornier

Responsable du Laboratoire de génétique des réseaux métaboliques, Cnrs UPR 9026, IBCG, 1, rue Camille-Saint-Saëns, 33077 Bordeaux Cedex, France.

### Remerciements

L'auteur remercie vivement les Prs J.L. Rossignol, F. Lacroute et M. Fellous de lui avoir fait partager leurs réflexions sur la notion de complémentation et d'avoir, par leurs suggestions enrichissantes, activement contribué à l'élaboration du manuscrit.

### \* GLOSSAIRE \*

**Prototrophie** : capacité d'un organisme à survivre en l'absence d'une substance (acide aminé, nucléotide...) en la synthétisant grâce à son propre métabolisme. S'oppose à auxotrophie, incapacité de survivre sans l'addition dans le milieu nutritif de certaines substances.

**Transvection** : complémentation allélique dépendante de l'appariement des chromosomes.

## RÉFÉRENCES

1. Beadle GW, Coonradt VL. Heterocaryosis in *Neurospora crassa*. *Genetics* 1944; 29: 291-308.
2. Green MM, Green KC. Crossing-over between alleles at the lozenge locus in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1949; 35: 586-91.
3. Benzer S. Fine structure of a genetic region in bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1955; 41: 344-54.
4. Giles NH, Partridge CWH, Nelson NJ. The genetic control of adenylosuccinase in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1957; 43: 305-17.
5. Woodward DO. Enzyme complementation *in vitro* between adenylosuccinaseless mutants of *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1959; 45: 846-50.
6. Crick FHC, Orgel LE. The theory of inter-allelic complementation. *J Mol Biol* 1964; 8: 161-5.
7. Schwartz D. The molecular basis for allelic complementation of alcohol dehydrogenase mutants of maize. *Genetics* 1975; 79: 207-12.
8. Hawthorne DC, Friis J. Osmotic-remedial mutants. A new classification for nutritional mutants in yeast. *Genetics* 1964; 50: 829-39.
9. Fincham JRS. Allelic complementation reconsidered. *Carlsberg Res Commun* 1977; 42: 421-30.
10. Tartof KD, Henikoff S. Trans-sensing effects from drosophila to humans. *Cell* 1991; 65: 201-3.
11. Wu CT. Transvection, nuclear structure, and chromatin proteins. *J Cell Biol* 1993; 120: 587-90.
12. Pirrotta V. Transvection and long-distance gene regulation. *BioEssays* 1990; 12: 409-14.
13. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, et al. A single telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995; 268: 1749-53.
14. Buchwald M. Complementation groups: one or more per gene? *Nat Genet* 1995; 11: 228-30.
15. Stearns T, Botstein D. Unlinked non-complementation: isolation of new conditional-lethal mutations in each of the tubulin genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1988; 119: 249-60.
16. Varkey JP, Jansma PL, Minniti AN, Ward S. The *Caenorhabditis elegans spe-6* gene is required for major sperm protein assembly and shows second site non-complementation with an unlinked deficiency. *Genetics* 1993; 133: 79-86.
17. Van Vuuren AJ, Appeldoorn E, Odijk H, Yasui A, Jaspers NGJ, Bootsma D, Hoeyjmakers JHJ. Evidence for a repair enzyme complex involving ERCC1 and complementing activities of ERCC4, ERCC11 and xeroderma pigmentosum group F. *EMBO J* 1993; 12: 3693-701.
18. Thuriaux P. Suppression. *Med Sci* 1998; 14: 780-6.

## TIRÉS À PART

B. Daignan-Fornier.