

Détermination du contenu en guanine-cytosine de champignons anaérobies du rumen : *Neocallimastix*, *Piromonas* et *Sphaeromonas*

JB Fiol¹, G Billon-Grand¹, Z Oulhaj²,
A Breton³, P Gouet²

¹ Université Claude-Bernard, laboratoire de microbiologie, section levure, Bat 405,
43 bd du 11 novembre, 69622 Villeurbanne, Cedex;

² INRA Theix, laboratoire de microbiologie, 63122, Ceyrat;

³ Université de Clermont II, laboratoire de biologie comparée des protistes,
UA 138, 63170, Aubière, France

Summary — Guanine-cytosine content determination of some anaerobic rumen fungi : *Neocallimastix*, *Piromonas* and *Sphaeromonas*. Guanine-cytosine content of rumen anaerobic fungi strains (*Neocallimastix*, *Piromonas* and *Sphaeromonas*) obtained by DNA thermodenaturation ranged from 15.5 % to 22 %.

Les méthodes modernes d'identification et de classification des microorganismes évoluent vers des techniques moléculaires, surtout lorsque les caractères phénotypiques sont rares ou peu discriminants. L'un des premiers outils de la chimiotaxonomie est fourni par l'étude de la composition en bases de l'ADN. Nous proposons ici un mode d'extraction et de purification de l'ADN de champignons anaérobies du rumen permettant la détermination, par thermodénaturation, des teneurs en guanine-cytosine de souches appartenant aux genres *Neocallimastix*, *Piromonas* et *Sphaeromonas*.

Matériel et méthodes — Les analyses ont porté sur les souches MCH3, FL et FG10 appartenant respectivement aux genres *Neocallimastix*, *Piromonas* et *Sphaeromonas*, cultivées 72 h, en milieu liquide semi-synthétique de Lowe *et al* (1985), à 39 °C, sous atmosphère de CO₂. Les ADN ont été extraits selon la méthode de Britten *et al* (1970) modifiée par Poncet et Fiol (1972), citée par Billon-Grand (1988) (*Méthode 1*). Pour ces ADN très fragiles, une technique plus douce a été utilisée selon Price *et al* (1978) modifiée par Billon-Grand (non publiée),

ne nécessitant pas une solution d'urée 8M (*Méthode 2*). Les teneurs en GC ont été calculées, après thermodénaturation, par référence avec l'ADN témoin de *Candida parapsilosis* traité dans les mêmes conditions.

Résultats et discussion — Les résultats de cette étude sont donnés dans le tableau I.

Les teneurs en GC trouvées sont les plus basses jamais rencontrées chez les champignons et expliqueraient la grande fragilité de ces ADN. Les

Tableau I. Pourcentages de guanine-cytosine obtenus en fonction de la méthode d'extraction de l'ADN.

	Méthode 1		Méthode 2	
	T _m (°C)	% GC	T _m (°C)	% GC
<i>Neocallimastix frontalis</i>	76,44	17,41	75,96	16,24
<i>Sphaeromonas communis</i>	78,49	22,12	77,47	19,92
<i>Piromonas communis</i>	ND	ND	75,67	15,53

T_m = température de thermodénaturation; ND = non déterminé.

courbes de thermodénaturation de *Neocallimastix frontalis* et de *Piromonas communis* (figs 1 et 2) montrent des inflexions qui soulignent l'hétérogénéité de ces ADN constitués d'au moins 2 fractions, comme l'a montré Brownlee (1989) pour *N frontalis*. Les différences observées entre les T_m obtenues pourraient être liées à la présence d'urée restée accrochée à ces ADN particuliers (avec la méthode 1), alors que l'on n'observe pas ces différences avec l'ADN témoin. La détermination de teneurs en GC inférieures à 20 % est à l'extrême limite de la sensibilité de la technique de thermodénaturation. Il faudra prévoir une méthode par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) pour résoudre le problème.

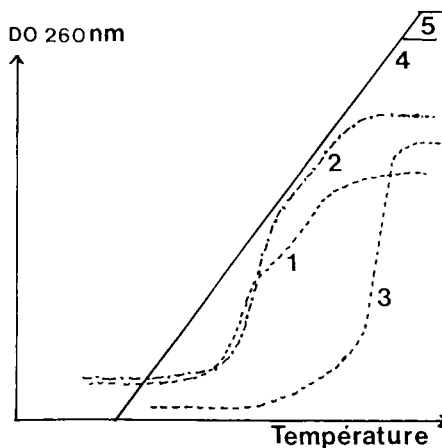


Fig 1. Courbes de thermodénaturation de *Neocallimastix frontalis*, MCH₃; 1) MCH₃, ADN extrait par la méthode 1. $T_m = 76,44$ °C; 2) MCH₃, ADN extrait par la méthode 2 $T_m = 75,96$ °C; 3) ADN témoin de *Candida parapsilosis* $T_m = 85,9$ °C; 4) Variation de la température lors des thermodénaturations 1 et 3; 5) Variation de la température lors de la thermodénaturation 2. (Noter l'inflexion plus prononcée de la courbe de thermodénaturation de l'ADN de MCH₃ extrait par la méthode 1).

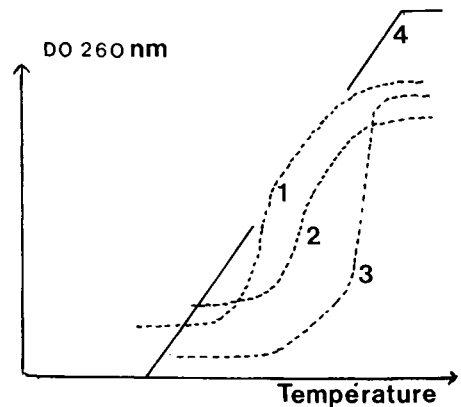


Fig 2. Courbes de thermodénaturation des ADN de *Piromonas communis* FL et de *Sphaeromonas communis* FG10; 1) ADN de *P communis* extrait par la méthode 2; $T_m = 75,67$ °C; 2) ADN de *S communis* extrait par la méthode 1; $T_m = 78,49$ °C; (même type de courbe pour l'ADN extrait par la méthode 2, $T_m = 77,47$ °C). 3) ADN témoin de *Candida parapsilosis* $T_m = 85,9$ °C. 4) Variation de la température lors des thermodénaturations 1 et 3. (Noter l'inflexion de la courbe de thermodénaturation de l'ADN de FL et celle moindre de la courbe de thermodénaturation de FG10).

En conclusion, les champignons du rumen présentent un contenu en GC de leurs ADN nucléaires de l'ordre de 15 % à 22 %. Ce résultat joint à un mode de vie anaérobie strict et à des propriétés physiologiques et enzymatiques identiques (Fonty et al, 1988) est en faveur d'une grande homogénéité de ces microorganismes.

- Lowe SE, Theodorou MK, Trinci APJ, Hespall RB (1985) *J Gen Microbiol* 131, 2225-2229
- Billon-Grand G (1988) Thèse de doctorat, université Lyon I, 145 p
- Price CW, Fuson GB, Phaff HJ (1978) *Microbiol Rev*, 42, 161-193
- Brownlee AG (1989) *Nucleic Acids Res* 4, 1327-1335
- Fonty G, Grenet E, Fèvre M, Breton A, Gouet P (1988) *Reprod Nutr Dév* 26 (suppl), 1-18