La chitine synthase de Neocallimastix frontalis, un marqueur enzymatique de la biomasse fongique

L. Gay, Michel Hébraud, Virginie Grandgirard, M. Fèvre

▶ **To cite this version:**

L. Gay, Michel Hébraud, Virginie Grandgirard, M. Fèvre. La chitine synthase de Neocallimastix frontalis, un marqueur enzymatique de la biomasse fongique. Reproduction Nutrition Développement, 1988, 28 (Suppl1), pp.69-70. hal-00898967

HAL Id: hal-00898967
https://hal.science/hal-00898967

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Reprod. Nutr. Dévelop., 1988, **28** Suppl. n° 1, 69-70

La chitine synthase de *Neocallimastix frontalis*, un marqueur enzymatique de la biomasse fongique

L. GAY, M. HEBRAUD, V. GIRARD, M. FÈVRE

Laboratoire de Différenciation Fongique, C.N.R.S. U.A. 1127, Université Lyon I, 43, boulevard du 11-Novembre-1918, F-69622 Villeurbanne, France.

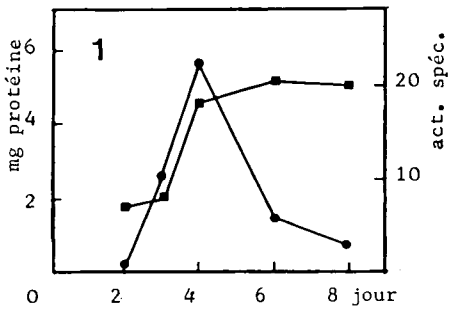
Summary. Chitin synthase responsible for chitin synthesis in the fungal cell wall was detected in the actively growing mycelium of *Neocallimastix frontalis* and was associated with the cell membrane. From a linear relation between enzyme activity and protein content of the cultures, this enzyme proved to be useful to assess the biomass of rumen fungi.

La chitine synthase a été isolée à partir d'un grand nombre de champignons (1) où elle joue un rôle primordial dans la biosynthèse de la paroi cellulaire (2). L'activité de cet enzyme qui est liée au développement des champignons peut donc être un marqueur physiologique utile pour estimer la croissance des champignons du rumen dont la quantification est malaisée (3, 4).

Matériel et méthodes. *Neocallimastix frontalis* (isolé du rumen de mouton) est cultivé à 39 °C sur milieu liquide (5) et le mycélium est récupéré par centrifugation (8 000 × *g*, 10 min). Après homogénéisation avec un broyeur à lames (3 fois 30 s à 20 000 t mn^{-1} ; tampon Tris/HCl 10 mM, pH 7,2 ; Na_2EDTA 2 mM) le broyat (CH) est fractionné en une fraction pariétale (CWF : 1 000 × *g*, 10 min) une fraction membranaire (MMF : 48 000 × *g*, 30 min) et un surnageant (SF). L'activité chitine synthase de ces extraits est mesurée après 40 min d'incubation à 32 °C d'un milieu réactionnel (200 µl) contenant 0,5 mM UDP -GlcNAc (25 nCi), 20 mM GlcNAc, 20 mM Tris/HCl pH 8,5, 10 mM $MgCl_2$, 2,5 µg de trypsine et 50 µl d'enzyme (100 à 150 µg de protéine).

Résultats et discussion. La distribution de l'enzyme entre CWF et MMF peut varier en fonction du broyage et de l'âge de la culture mais en moyenne 65 % de l'activité est associée avec CWF et 35 % avec MMF, alors qu'aucune activité n'est mesurable dans SF. Un broyage plus important diminue le pourcentage d'enzyme membranaire qui reste lié aux parois mais l'activité spécifique de l'enzyme, mesurée en nmol d'UDP-GlcNAc incorporée par minute et par mg de protéine, est alors fortement diminuée. L'enzyme se trouve essentiellement sous forme zymogène (activité × 5 par le traitement à la trypsine) et présente des propriétés comparables à celles observées chez les autres champignons (2). Le pH optimum de la réaction se situe vers pH 8,5 à une température de 32 °C. L'incorporation du substrat (UDP-GlcNAc) reste linéaire pendant plus de 60 min et la cinétique de la réaction donne un K_m apparent de 2 mM. La polyoxine D joue le rôle d'inhibiteur compétitif de la réaction avec un K_i de 4 µM. L'ion bivalent Mg^{2+} est nécessaire à l'action de l'enzyme qui est stimulé par 20 mM GlcNAc.

La figure 1 montre que l'activité spécifique de l'enzyme augmente avec la croissance du mycélium, mais dès que la culture atteint la phase stationnaire (4 jours de culture) l'activité chitine synthase chute rapidement indiquant que cet enzyme est directement lié à la croissance active du mycélium.



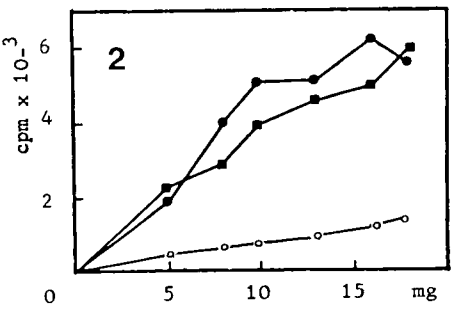


FIG. 1. — *Croissance du champignon* (■) *en mg de protéine pour 50 ml de culture et activité spécifique de l'extrait membranaire* (●) *en nmol UDP-GlcNAc min*$^{-1}$ *mg protéine*$^{-1}$. FIG. 2. — *Relation entre la biomasse fongique* (en mg de protéine) *et l'activité chitine synthase* (cpm) *des fractions CH* (○), *CWF* (■) *et MMF* (●).

Avec des extraits provenant de cultures de même âge mais contenant des quantités différentes de mycélium (fig. 2) il y a une relation linéaire (surtout avec CH) entre l'activité enzymatique de l'extrait et le contenu protéique de la culture. D'après ces courbes, il est donc possible de calculer la quantité de mycélium contenu dans une culture. Ainsi, une expérience test avec une culture âgée de 3 jours donne une valeur mesurée de 10,5 mg de protéine alors que la valeur calculée d'après les courbes est de 11 à 13 mg de protéine.

En utilisant des conditions standard on peut donc, grâce à l'activité chitine synthase d'un extrait, mesurer la quantité de mycélium contenu dans une culture de champignon du rumen avec une marge d'erreur inférieure à 10 %. De plus ce dosage ne prend en compte que le mycélium vivant alors que le dosage de chitine (Akin, 1987) peut concerner du mycélium inactif ou des contaminants. Toutefois, avant de transposer cette technique à la mesure d'une croissance fongique dans le rumen, il faudra connaître l'activité chitine synthase des autres champignons du rumen et déterminer dans quelle mesure un système microbiologique aussi complexe que du rumen peut influer sur le dosage.

(1) Cabib E., 1981. *Encyclopedia of Plant Physiology,* **13 B,** 395-415.
(2) Gooday G. W., Trinci A. P. J., 1980. *The Eucaryotic Microbial Cell,* 207-251, G. W. Gooday, D. Lloyd et A. P. J. Trinci ed., Cambridge Univ. Press.
(3) Akin D. E., 1987. *Appl. env. Microbiol.,* **53,** 1955-1958.
(4) Lowe S. E. *et al.,* 1987. *J. gen. Microbiol.,* **133,** 1815-1827.
(5) Lowe S. E. *et al.,* 1985. *J. gen. Microbiol.,* **131,** 2225-2229.