



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UMR INRA/UHP 1136 Interactions  
Arbres/Micro-organismes, Centre INRA Nancy  
(France)

Université Henri Poincaré- Nancy I,  
UFR-Sciences et Techniques Biologiques  
École doctorale RP2EVandoeuvre les Nancy

S.C.D. U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique - BP 11  
54601 VILLERS-LES-NANCY Cedex

Dipartimento di Biologia Vegetale,  
Università degli Studi di Torino  
(Italia)

### Thèse en Cotutelle

Présenté pour l'obtention du titre de  
**Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I**  
en Biologie Végétale et Forestière  
et de  
**Docteur de l'Università degli Studi di Torino**  
en Biologie et Biotechnologie des champignons  
Cycle XVII

### Tesi in Cotutela

Presentata per l'ottenimento del titolo di  
**Dottore dell'Università Henri Poincaré, Nancy-I**  
in Biologia Vegetale e Forestale  
e di  
**Dottore dell'Università degli Studi di Torino**  
in Biologia e Biotechnologia dei Funghi  
Ciclo XVII

## Claude Murat-Furminieux

**Etude de la diversité  
génétique de la truffe blanche  
du Piémont (*Tuber magnatum*  
Pico) et de la truffe noire du  
Périgord (*Tuber  
melanosporum* Vittad.)**

**Studio della diversità  
genetica del tartufo bianco  
del Piemonte (*Tuber  
magnatum* Pico) e del tartufo  
nero del Perigord (*Tuber  
melanosporum* Vittad.)**

Soutenance publique le 17 décembre 2004 / Presentazione finale il 17 dicembre 2004

#### Membres du Jury / membri della giuria :

##### Président / Presidente

M. Jean-Claude Debaud

Professeur, Université Claude Bernard, Lyon

##### Rapporteurs / Relatori

M. Jean-Claude Debaud

Mme Alessandra Zambonelli

Professeur, Université Claude Bernard, Lyon

Prof.ssa, Università degli Studi, Bologna

##### Examineurs / Esaminatori

M. Gérard Chevalier

M. Simone Ottonello

M. Francis Martin

Mme Paola Bonfante

Chargé de recherche, INRA, Clermont-Ferrand

Professore, Università degli Studi, Parma

Directeur de Recherche, INRA, Nancy (Directeur de thèse / Tutor)

Prof.ssa Università degli Studi, Torino (Directeur de thèse / Tutor)

BIBLIOTHEQUE SCIENCES NANCY 1



D 095 168299 7

---

**S.C.D. - U.H.P. NANCY 1**  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue de l'Université - BP 11  
54601 VILLERS-LES-NANCY Cedex

Ce travail a pu avoir lieu grâce à une bourse de thèse financée par le programme ISASUT de l'Università degli Studi di Torino.

Questo lavoro è stato realizzato grazie ad una borsa di dottorato finanziata dal programma ISASUT dell'Università degli Studi di Torino.

## Table des Matières

|  |           |
|--|-----------|
| TABLE DES FIGURES DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE .....   | 7         |
| TABLE DES ENCADRÉS DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE.....   | 8         |
| TABLE DES TABLEAUX DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE .....  | 8         |
| REMERCIEMENTS.....   | 9         |
| AVANT-PROPOS .....   | 10        |
| <br>   |           |
| <b>1. INTRODUCTION GENERALE .....</b>  | <b>12</b> |
| <br>   |           |
| <b>1.1 PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES TRUFFES : PLACE TAXONOMIQUE ET HISTORIQUE DES<br/>ÉTUDES RÉALISÉES CHEZ LES TRUFFES .....</b> | <b>16</b> |
| 1.1.1 <i>Mais que sont exactement les truffes ?</i> .....  | 16        |
| 1.1.2 <i>Donc, les truffes sont des champignons, mais quelle est leur place taxonomique ?</i><br>.....                         | 17        |
| 1.1.3 <i>Depuis quand étudie-t-on les Tuber ?</i> .....  | 17        |
| <br>   |           |
| <b>1.2 LES TRUFFES ET L'HOMME : PLACE DE LA TRUFFICULTURE DANS LA SOCIÉTÉ RURALE .....</b>                                     | <b>24</b> |
| 1.2.1 <i>Quelles sont les intérêts des truffes et de la trufficulture?</i> .....   | 24        |
| 1.2.1.1 Intérêt gastronomique et culturel .....  | 24        |
| 1.2.1.2 Intérêt économique .....   | 25        |
| 1.2.1.3 Intérêt humain .....   | 27        |
| 1.2.1.4 Intérêt écologique.....  | 27        |
| 1.2.1.5 Intérêt de développement rural.....  | 27        |
| 1.2.2 <i>L'écologie des truffes : des connaissances indispensables pour les cultiver</i> .....                                 | 28        |
| Caractéristiques écologiques de quelques espèces de <i>Tuber</i> .....   | 29        |
| Interaction entre les <i>Tuber</i> et les champignons présents dans les truffières .....                                       | 30        |
| Les bactéries et les truffes, une interaction semblant importante .....  | 31        |
| Il existe aussi des levures vivant au contact des truffes .....  | 32        |
| 1.2.3 <i>La trufficulture, un problème vieux de plusieurs siècles</i> .....  | 32        |
| 1.2.3.1 <i>Tuber melanosporum</i> , la première truffe cultivée.....   | 32        |
| Les premières expériences ont eu lieu en France .....  | 32        |
| La France n'est pas le seul pays où la trufficulture est importante, c'est aussi le cas<br>en Italie.....                      | 33        |
| Et l'Espagne ? (d'après Reyna dans <i>Le trufficulteur français</i> n°32 p10-14).....  | 33        |
| Introduction de <i>T. melanosporum</i> dans des pays non producteurs naturellement ...   | 34        |
| 1.2.3.2 <i>Qu'en est-il pour les autres espèces ?</i> .....  | 35        |
| Parmi les autres espèces de truffes cultivées, <i>T. uncinatum</i> l'est depuis plusieurs<br>décennies.....                    | 35        |
| La blanquette ( <i>T. borchii</i> ), une autre truffe cultivée. ....   | 35        |
| En revanche, la culture de <i>T. magnatum</i> n'est pas encore bien maîtrisée .....  | 36        |
| <br>   |           |
| <b>1.3. BIOLOGIE DES TRUFFES.....</b>  | <b>38</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.3.1 La phase saprotrophique.....   | 38        |
| 1.3.1.1 Le mycélium colonise-t-il un vaste espace ou est-il confiné aux alentours des racines ? .....                        | 38        |
| 1.3.1.2 Réalisation de la phase saprotrophique <i>in vitro</i> .....   | 40        |
| Quelle est la dynamique de croissance du mycélium de <i>Tuber</i> ? .....  | 40        |
| 1.3.1.3 Quelles sont les voies métaboliques et les gènes exprimés lors de la phase saprotrophique? .....                     | 41        |
| Quelle est l'activité métabolique et transcriptionnelle du mycélium ?.....   | 41        |
| Un autre facteur qui influence la croissance des hyphes lors de la phase saprotrophique est la lumière. ....                 | 42        |
| Quelles sont les sources de carbone que peut utiliser le mycélium de truffe pour croître ? .....                             | 42        |
| Quelles sont les voies métaboliques du carbone actives chez le mycélium de truffes lors de la phase saprotrophique? .....    | 42        |
| Qu'en est-il pour l'assimilation de l'azote?.....  | 44        |
| Quels sont les autres gènes importants exprimés lors de la phase saprotrophique? .....                                       | 46        |
| 1.3.2 La phase symbiotique .....   | 47        |
| 1.3.2.1 Généralités sur les mycorhizes.....  | 47        |
| Que sont les mycorhizes ? .....  | 47        |
| Quel peut-être le rôle des mycorhizes dans les écosystèmes ?.....  | 49        |
| 1.3.2.2 Les truffes, des champignons ectomycorhiziens .....  | 50        |
| 1.3.2.3 Comment le mycélium reconnaît-il la racine et entre en phase symbiotique = phase pré-symbiotique?.....               | 51        |
| Mais quels sont les signaux permettant à la truffe de reconnaître la plante? .....   | 52        |
| Quelles sont les modifications transcriptionnelles intervenant lors de la phase pré-symbiotique ? .....                      | 53        |
| 1.3.2.4 La morphologie des mycorhizes dépend de la souche et de l'hôte.....  | 54        |
| 1.3.2.5 Quels sont les mécanismes moléculaires et biochimiques présents lors de la phase symbiotique des <i>Tuber</i> ?..... | 54        |
| Le métabolisme du carbone chez l'ectomycorhize .....   | 54        |
| Métabolisme azoté de la phase symbiotique. ....  | 55        |
| Expression des enzymes de la voie d'assimilation de l'azote .....  | 55        |
| Sous quelle forme l'azote est-il transféré du champignon à la plante ?.....  | 55        |
| Quelles sont les modifications transcriptionnelles intervenant lors de la phase symbiotique ? .....                          | 55        |
| 1.3.2.6 Les <i>Tuber</i> sont-ils capables de former d'autres types de mycorhizes ? .....                                    | 57        |
| 1.3.3 La phase reproductive .....  | 59        |
| 1.3.3.1 Comment se forme et se développe l'ascocarpe ? .....   | 59        |
| 1.3.3.2 Comment l'ascocarpe trouve ses nutriments ? .....  | 61        |
| 1.3.3.3 Le métabolisme carboné chez l'ascocarpe .....  | 61        |
| 1.3.3.4 Le métabolisme azoté .....   | 61        |
| 1.3.3.5 Quels sont gènes exprimés lors de la différenciation de l'ascocarpe ?.....   | 62        |
| 1.3.4 En fait, il persiste des doutes sur le cycle biologique des truffes.....   | 64        |
| <b>1.4 LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE : DE L'IDENTIFICATION DES ESPÈCES À LA PHYLOGÉOGRAPHIE .....</b>                             | <b>66</b> |
| 1.4.1 Variabilité génétique et génétique des populations.....  | 66        |
| 1.4.1.1 Concepts généraux et définitions .....   | 66        |
| La génétique des populations, une discipline en plein essor.....   | 66        |
| La variabilité génétique ou polymorphisme : l'outil des études de génétique des populations.....                             | 66        |
| Comment révéler la variabilité génétique ? .....   | 3         |
| Quelles sont les origines et les causes de l'évolution de la variabilité génétique .....                                     | 67        |

|   |            |
|---|------------|
| 1.4.1.2 Pourquoi étudier la variabilité génétique ? .....   | 70         |
| La variabilité génétique comme outil d'identification des espèces .....   | 70         |
| La conservation des espèces .....   | 71         |
| Co-évolution entre les espèces .....  | 72         |
| La diversité génétique comme outil d'étude des communautés : exemple des<br>champignons ectomycorhiziens .....  | 72         |
| Subdivision des populations et structure génétique.....   | 74         |
| La diversité génétique peut permettre d'avoir des informations sur l'histoire d'une<br>espèce.....  | 75         |
| Comment peut-on révéler ces facteurs ?.....   | 75         |
| 1.4.2 Les nouveaux outils d'identification des <i>Tuber</i> .....   | 78         |
| 1.4.2.1 Méthodes Biochimiques.....  | 79         |
| Analyse des protéines totales.....  | 79         |
| Analyse des Isoenzymes .....  | 80         |
| 1.4.2.2 Méthodes moléculaires.....  | 82         |
| Méthodes d'amplification aléatoire .....  | 82         |
| Analyse moléculaire par PCR dirigée.....  | 84         |
| Existe-t-il encore des espèces de truffes qui soient difficiles à séparer ?.....  | 85         |
| 1.4.3 Que sait-on sur la diversité intraspécifique et sur la structure génétique des <i>Tuber</i> ?<br>.....  | 87         |
| Existe-t-il une différenciation génétique entre les populations de truffes ? .....  | 88         |
| <b>LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>RÉFÉRENCES DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>  | <b>94</b>  |
| <br>  |            |
| <b>2. RESULTATS.....</b>  | <b>102</b> |
| <br>  |            |
| <b>2.1 ETUDE DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DE LA TRUFFE NOIRE DU PÉRIGORD, <i>TUBER</i><br/><i>MELANOSPORUM VITTAD.</i> .....</b>   | <b>104</b> |
| <br>  |            |
| <b>2.2 ETUDE DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DE LA TRUFFE BLANCHE DU PIÉMONT, <i>TUBER</i><br/><i>MAGNATUM PICO</i> : EXEMPLE DE LA TRUFFIÈRE NATURELLE DE MONTEMAGNO (ASTI, ITALIE).....</b> | <b>116</b> |
| <br>  |            |
| <b>2.3 IDENTIFICATION DES MYCORHIZES DE <i>T. MAGNATUM</i> ET DES CHAMPIGNONS<br/>ECTOMYCORHIZIENS DANS LA TRUFFIÈRE DE MONTEMAGNO (ASTI, ITALIE). .....</b>                              | <b>128</b> |
| <br>  |            |
| <b>3. DISCUSSION GENERALE.....</b>  | <b>140</b> |
| <br>  |            |
| <b>3.1 DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET STRUCTURE GÉNÉTIQUE CHEZ <i>T. MELANOSPORUM</i> ET <i>T.</i><br/><i>MAGNATUM</i>.....</b>   | <b>143</b> |
| <br>  |            |
| 3.1.1 L'ITS, un locus polymorphe chez les truffes.....  | 143        |
| 3.1.2 Mise en évidence d'une structure génétique chez <i>T. melanosporum</i> et <i>T.</i><br><i>magnatum</i> .....  | 145        |
| 3.1.3 Phylogéographie des truffes .....   | 146        |
| Quels sont les principaux refuges et les principales voies de recolonisation post-<br>glaciaire en Europe?.....   | 147        |
| Qu'en est-il pour <i>T. melanosporum</i> ? .....  | 147        |

|  |            |
|--|------------|
| Qu'en n'est-il pour les autres espèces de <i>Tuber</i> ?.....  | 149        |
| <b>3.2 ANALYSE D'UNE TRUFFIÈRE DE <i>T. MAGNATUM</i>.....</b>  | <b>150</b> |
| 3.2.1 <i>La diversité génétique au sein de la truffière</i> .....  | 151        |
| 3.2.2 <i>Que se passe-t-il dans le sous-sol de la truffière ?</i> .....  | 152        |
| Identification de mycorhizes de <i>T. magnatum</i> .....   | 152        |
| Biodiversité ectomycorhizienne au sein de l'écosystème truffier .....  | 152        |
| <b>3.3 LIMITES RENCONTRÉES PAR L'ANALYSE DE <i>T. MELANOSPORUM</i> ET <i>T. MAGNATUM</i> ET<br/>CONSÉQUENCES POUR LA FILIÈRE TRUFFE.....</b> | <b>154</b> |
| <b>RÉFÉRENCES DE LA DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>  | <b>155</b> |

**S.C.D. - U.H.P. NANCY 1**  
 BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
 Rue du Jardin botanique - BP 11  
 54601 VILLERS-LES-NANCY Cedex

## Table des Figures

### Figures de la discussion générale

|     |   |       |
|-----|---|-------|
| 1.  | Schéma présentant les quatre grandes parties de l'introduction.   | p. 14 |
| 2.  | Arbre phylogénétique des Pezizales établi à partir de la séquence nucléotidique de l'ADNr 18S.  | p. 19 |
| 3.  | Ascocarpes (A) et spores (B) de quelques espèces de truffes.  | p. 23 |
| 4.  | Facteurs abiotiques et biotiques pouvant influencer la vie des truffes.   | p. 28 |
| 5.  | Cycle biologique des <i>Tuber</i> .   | p. 39 |
| 6.  | Courbes de croissances de quelques espèces de <i>Tuber</i> .  | p. 41 |
| 7.  | Schéma de la glycolyse.   | p. 43 |
| 8.  | Voies d'assimilation de l'azote inorganique chez les champignons.   | p. 45 |
| 9.  | Anatomie microscopique de quelques types de mycorhizes : (a) ectomycorhize, (b) endomycorhize arbusculaire ; (c) endomycorhize à pelotons ericoïdes.  | p. 48 |
| 10. | Echanges moléculaires intervenant dans la rhizosphère lors de la colonisation d' <i>Eucalyptus globulus</i> par <i>Pisolithus</i> .   | p. 51 |
| 11. | Accumulation de la protéine TbSP1 en condition de carence nutritionnelle dans le mycélium de <i>T. borchii</i> .  | p. 53 |
| 12. | Immunocyto-localisation de la protéine TbSP1 à l'or dans les hyphes du mycélium de <i>T. borchii</i> .  | p. 53 |
| 13. | Stades de développement de l'ectomycorhize et expression des gènes impliqués dans les différentes phases de l'interaction symbiotique des <i>Tuber</i> .  | p. 57 |
| 14. | Ascocarpes de <i>T. maculatum</i> produits en pots avec <i>Pinus strobus</i> .  | p. 60 |
| 15. | Les différentes phases du développement de l'ascocarpe de <i>T. melanosporum</i> .  | p. 60 |
| 16. | Causes de l'évolution : description des différentes forces évolutives.  | p. 69 |
| 17. | Schéma représentant les principales causes de l'extinction des espèces.   | p. 71 |
| 18. | Facteurs à l'origine de la différenciation génétique.   | p. 76 |
| 19. | Dendrogramme UPGMA, généré avec les distances génétiques de Nei, montrant les relations entre les 20 types enzymatiques et permettant de séparer 7 taxons de <i>Tuber</i> .   | p. 81 |
| 20. | Arbre Neighbour-Joining obtenu avec les amorces microsatellites sur 12 ascocarpes de <i>T. uncinatum</i> et <i>T. aestivum</i> .  | p. 83 |
| 21. | Dendrogramme UPGMA réalisé sur 11 taxons de <i>Tuber</i> à l'aide de la RAPD.   | p. 87 |
| 22. | Cladogramme obtenu avec l'algorithme du « plus proche voisin » (Neighbor Joining) construit à partir de la matrice des distances (coefficient de similarité de Nei) établie à partir des profils RAPD de 82 ascocarpes de <i>Tuber melanosporum</i> . | p. 88 |

23. Cladogramme obtenu avec l'algorithme du « plus proche voisin » (Neighbor Joining) avec des amorces microsatellites sur 12 ascocarpes de *T. uncinatum* et *T. aestivum*, les origines géographiques sont indiquées. p. 90

24. Schéma de conclusion de l'introduction générale.

### Figures de la discussion générale

25. Mécanisme pouvant expliquer l'existence de plusieurs haplotypes de l'ITS chez les truffes. P. 148

26. Les trois principaux types de recolonisation post-glaciaire de l'Europe. p. 151

27. Distribution des 10 haplotypes ITS de *T. melanosporum* dans les 17 populations analysées. p. 152

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique - BP 11  
54601 VILLERS-LES-NANCY Cedex

## Table des Encadrés de l'Introduction générale

|     |   |          |
|-----|---|----------|
| 1.  | Extraits des observations sur la végétation des truffes de Claude Joseph Geoffroy en date du 25 février 1711 dans le volume annuel de l'Histoire de l'Académie royale des Sciences.       | p. 20    |
| 2.  | Adolphe Chatin est très connu des trufficulteurs car il a écrit un ouvrage de référence sur la production des truffes, le texte qui suit décrit la vie de ce scientifique.                | p. 21    |
| 3.  | Menu servi lors du dîner truffes à la présidence du Sénat le 13 février 2002 et préparé pour le président Christian Poncelet par l'équipe de cuisiniers dirigée par un lotois, M. Mathou. | p. 25    |
| 4.  | Comment définir le terme de population ?  | p. 67    |
| 5.  | Que sont les espèces ?  | p. 70    |
| 6.  | Extrait du livre de Darwin : « <i>Origin of Species</i> » p95 1 <sup>ère</sup> édition.   | p. 72    |
| 7.  | Niveau de structuration génétique basé sur les valeurs de <i>Fst</i> .  | p. 74    |
| 8.  | Définition de phylogéographie.  | p. 75    |
| 9.  | La théorie de la coalescence : une approche rétrospective.  | p. 76-77 |
| 10. | <i>T. aestivum</i> Vittad. et <i>T. uncinatum</i> Chatin deux taxa très discutés.   | p. 86    |

## Table des Tableaux de l'Introduction générale

|    |   |       |
|----|---|-------|
| 1. | Les espèces de truffes européennes pouvant être commercialisées en France et en Italie.   | p. 16 |
| 2. | Comparaison de la classification des ordres des Tuberales et des Pezizales issus de l'analyse morphologique avec l'ordre des Pezizales issu de l'analyse moléculaire.                           | p. 18 |
| 3. | Bilan des campagnes truffières françaises de 1990 à 2002 (Estimations faites pour <i>T. melanosporum</i> ).   | p. 26 |
| 4. | Quelques caractéristiques écologiques de <i>Tuber uncinatum</i> , <i>T. magnatum</i> et <i>T. melanosporum</i> .  | p. 29 |
| 5. | Caractéristiques physicochimiques des sols de truffières de <i>T. melanosporum</i> et <i>T. uncinatum</i> .   | p. 30 |
| 6. | Caractéristiques sommaires des principaux types de mycorhizes.  | p. 48 |
| 7. | Estimation de la biomasse fongique (dosage de l'ergostérol) et du taux de transcrit fongique (ARNr) dans l'ectomycorhize <i>T. borchii</i> - <i>Tilia platyphyllos</i> obtenu <i>in vitro</i> . | p. 56 |
| 8. | Principales méthodes moléculaires utilisées en écologie.  | p. 68 |
| 9. | Amorces spécifiques de quelques espèces de <i>Tuber</i> , cette liste n'est pas exhaustive.   | p. 85 |

## REMERCIEMENTS

Je commencerai par remercier mes deux directeurs de thèse : Paola Bonfante et Francis Martin pour leur disponibilité et leurs nombreux conseils. Je voudrais aussi leur faire part de ma plus grande gratitude pour m'avoir permis de réaliser cette thèse en cotutelle qui fut une expérience très enrichissante aussi bien professionnellement que personnellement...

Je tiens à remercier tout particulièrement Gérard Chevalier, sans qui ce travail n'aurait pu avoir lieu, Jesus Diez, qui est à l'origine des analyses statistiques, Chantal Dupré, qui a réalisé un bon nombre d'extractions d'ADN et de PCR, Christine Delaruelle, qui a fait beaucoup de séquences, Alessandra Pachi, qui m'a guidé lors de mon inscription à l'université de Turin, Marina pour m'avoir trouvé pas mal d'articles anciens, Nini Foureyson pour les corrections d'orthographe et Antonietta Mello.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont collaboré à ce travail : François Buscot, Virgilio Gavazza et son oncle (sans oublier le Chien Judy), Patricia Luis, Roland Marmeisse, Martina Peter, Elisabetta Peccorella, Matteo Cagnasso, Alfredo Vizzini, Mirco Iotti, Alessandra Zambonelli et tous les trufficulteurs qui ont fourni les échantillons indispensables à cette étude.

Durant ce travail, j'ai croisé la route de nombreuses personnes qui ont toutes été importantes, je m'excuse d'ores et déjà des oublis... Richard Splivallo, Marta Pitet, Stefania Daghino, Gilda Cappellazzo, Luisa Lanfranco, Stefano Ghignone, Cristina Mariani,, Mariangela Girlanda, Raffaella Balestrini, Valeria Bianciotto, Anamaria Cantisani, Daniella Minerdi et Andrea, Andrea Genre, Cinzia Berteza (alias Santa Cinzietta di SSDP), Simona Abbà, Alessandra Salvioli, Silvia Gabella, Antonella Faccio, Erica Lumini, Mara Novaro, Mohammed, Caroline, Sara Torrielli, Silvia Perotto, Pierre-Emmanuelle Courty, Annegret Kohler, Joanne Bertaux, Sébastien Duplessis, Dominique Vairelle, Nicole Thirion, Claude Coppin, Beatrice Palin, Karen Bertaux, Yongjin Wang, Anne Jambois, David Cohn̄n et bien d'autres que je salue !

Merci à :  
 - Marc Buée pour avoir passé plusieurs jours sur le canapé à cause de moi.  
 - Mirco Iotti et Barbara Montanini de m'avoir logé lors de mes séjours à Modena et Reggio-Emilia.  
 - Patricia Luis et Patrick Frettinger pour cette belle semaine à Jena.  
 - Et bien sûr à Jean-Luc Jany pour ce très beau séjour à Québec... au moment où j'écris ces remerciements le TFC est premier.... Tu dois être content !

Merci aussi à Marc-André Selosse pour ses nombreux conseils.

Grazie à Gladstone Silva et Alessandra Benedetto pour avoir partagé palazzo avec moi, mais aussi et surtout merci à Sandra pour cette nuit passée à l'hôpital...

Merci à Marta Vallino pour m'avoir initié à la cuisine Piémontaise, bagna cauda, et avoir partagé cette grande table en microscopie.... Je pense que ce fut difficile pour toi de reconnaître la supériorité des français... 😊

Un coucou particulier à ma partenaire préférée du café (j'ai déjà vu cette phrase quelque part... 😊), Laura Miozzi, qui a su m'écouter quand j'en avais besoin...

Je tiens à remercier Mr Bruelle (mon professeur de Biologie au collège et au lycée) qui a su m'initier au monde de l'ADN ; et David Larnaud, mon compère du lycée.

Un petit salut à Yohann qui sera toujours mon meilleur collègue... Merci aussi pour ton hospitalité à Paris !

Je ne veux pas oublier mes parents, Josette et Dédé (à ne pas gratter 😊), merci de m'avoir laissé faire ce que j'ai voulu même lorsque ma vie était agitée.

Ah oui! J'allais oublier...merci paciucchina pour.....tout ! Pour plus de clarté Paciuchina : Elena Martino.

## Avant-propos

### Les truffes : depuis toujours un Mythe !

Depuis longtemps la truffe intrigue, sa nature a toujours été mystérieuse. Dans l'Antiquité, les Grecs et les Romains lui prêtaient des vertus thérapeutiques et aphrodisiaques, pouvoirs qu'on lui reconnaissait encore au XIX<sup>e</sup> siècle. Alexandre Dumas disait :

*« Elle peut, en certaines occasions, rendre les femmes plus tendres et les hommes plus aimables ».*

Les superlatifs qui lui sont attribués témoignent de sa valeur presque mythique: "Diamant de la Cuisine" (Brillat-Savarin), "Pomme féérique" (George Sand), "Négresse Reine" (Émile Goudeau), "Gemme des Terres pauvres" (Colette), "Perle noire" (Fulbert Dumontei). En littérature, il en est de même, je citerai l'exemple du roman d'Anne et Serge Golon, Angélique Marquise des Anges :

*« C'est un ragoût de truffes vertes, Madame, venues toutes fraîches du Périgord. Sachez que la truffe est divine et magique. Il n'y a pas de mets plus recherché pour préparer le corps d'une épousée à recevoir les hommages de son mari. La truffe fait l'entraille chaleureuse, le sang vif et rend la peau facilement émue aux caresses. »*

Alors, a-t-elle réellement autant de pouvoirs ?

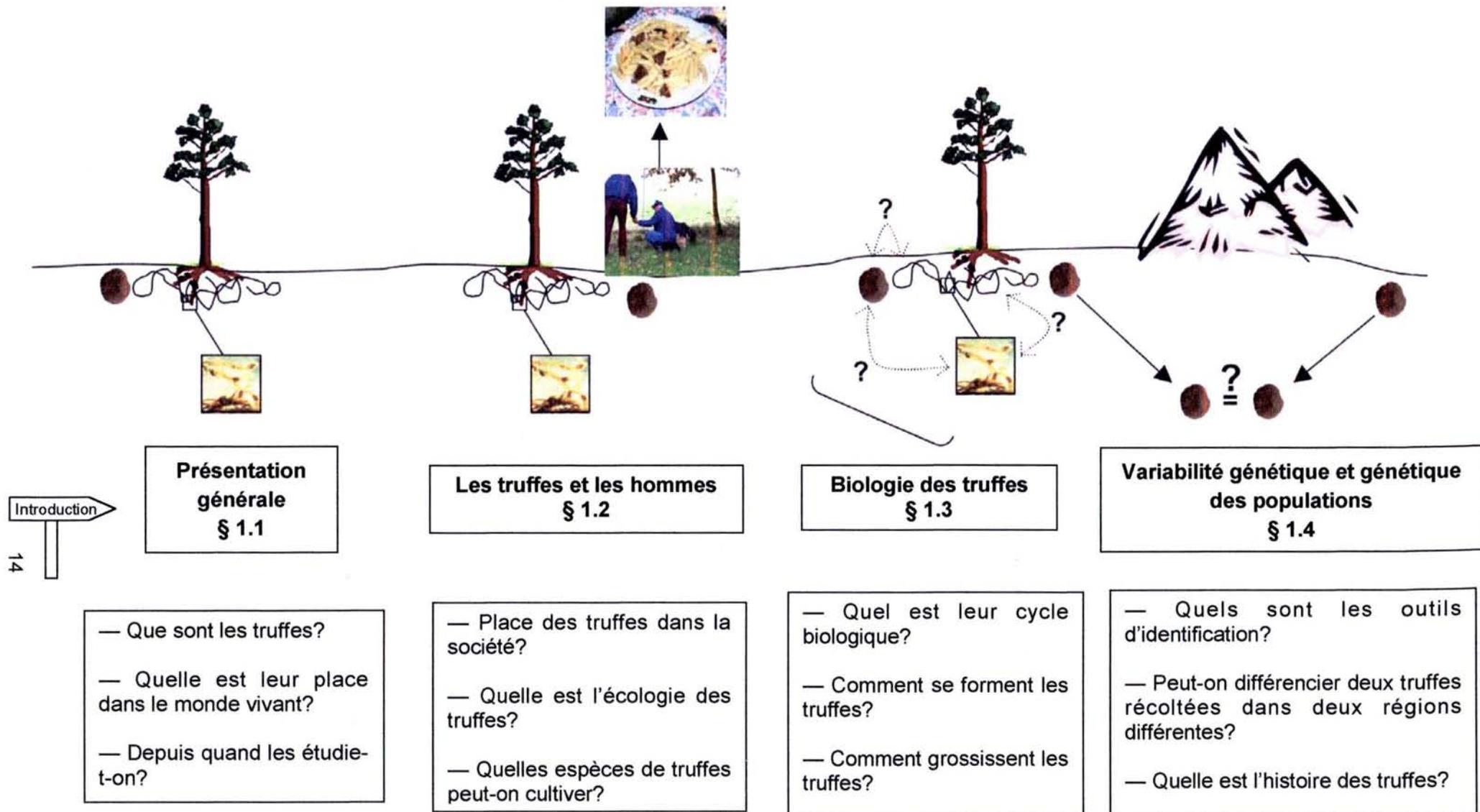
La réponse est loin d'être établie, mais comme l'a écrit Brillat-Savarin, célèbre cuisinier du XVIII<sup>e</sup> :

"Alors continuons d'y croire et surtout d'en manger".

**S.C.D. - U.H.P. NANCY 1**  
**BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES**  
Rue du Jardin Botanique - BP 11  
**54601 VILLERS-LES-NANCY Cedex**

# **1. INTRODUCTION GENERALE**





**Figure 1.** Schéma présentant les quatre grandes parties de l'introduction. Pour chaque partie, j'ai reporté les principales questions que se posent les chercheurs, les trufficulteurs et les consommateurs. Tout au long de notre parcours dans le monde des truffes nous allons essayer de répondre à ces questions et de faire une mise au point des connaissances actuelles sur les truffes. **Comme nous le verrons ultérieurement, mon travail de thèse se focalisera surtout sur la dernière partie de l'introduction relative à la diversité génétique des *Tuber*.**

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique - BP 11  
54601 VILLERS-LES-NANCY Cedex

## 1.1 Présentation générale des truffes : place taxonomique et historique des études réalisées chez les truffes

Comme nous l'avons vu en avant-propos, la truffe semble avoir beaucoup de pouvoirs. Mais que sont exactement les truffes ? Nous commencerons cette introduction par les présenter, nous verrons leur place dans le monde vivant et ferons un bref historique des études portant sur les truffes depuis plusieurs siècles.

### 1.1.1 Mais que sont exactement les truffes ?

Nous savons qu'elles sont connues depuis plusieurs millénaires puisqu'un texte de 1600 avant J.C. les décrit comme étant des produits mystérieux de la terre (Miozzi, 2003). Dans l'Antiquité, Théophraste (III<sup>e</sup> siècle av. J-C) les voyait comme des produits des pluies d'orages, Nicandre (II<sup>e</sup> siècle av. J-C) comme du limon modifié par la chaleur du centre de la terre, Dioscoride (I<sup>er</sup> siècle av. J-C) comme des racines, Pline l'ancien (I<sup>er</sup> siècle ap. J-C) comme des tumeurs ou callosités de la terre et Plutarque (45-125) comme étant dus à l'action de la pluie, du tonnerre et de la chaleur (Callot, 1999 ; Rioussset et al., 2001).

*Depuis Cesalpino (1583), nous savons que les truffes sont des champignons ayant des fructifications hypogées.*

Dans le monde, il existe une soixantaine d'espèces de truffes (Trappe, 1979) dont une vingtaine présentes en Europe (Gandeboeuf, 1997 ; Rioussset et al., 2001). Les qualités organoleptiques de certaines d'entre elles sont très appréciées par les consommateurs, il a donc été nécessaire de réglementer leur commercialisation. En Italie, les espèces pouvant être vendues sont définies par la loi n. 752 du 16 décembre 1985, modifiée le 17 mai 1991 (n. 162) (Tableau 1).

**Tableau 1.** Les espèces de truffes européennes pouvant être commercialisées en France et en Italie (d'après Dupré, 1997).

| Les truffes noires  |                           |
|---|---------------------------|
| Nom scientifique  | Nom vernaculaire          |
| <i>Tuber aestivum</i> Vittad.   | Truffe d'été              |
| <i>Tuber brumale</i> Vittad. ou <i>T. brumale</i> Vittad. var. <i>moschatum</i> Ferry |                           |
| <i>Tuber macrosporum</i> Vittad   |                           |
| <i>Tuber mesentericum</i> Vittad  | Truffe mésentérique       |
| <i>Tuber melanosporum</i> Vittad  | Truffe noire du Périgord  |
| <i>Tuber uncinatum</i> Vittad   | Truffe de Bourgogne       |
| Les truffes blanches  |                           |
| Nom scientifique  | Nom vernaculaire          |
| <i>Tuber magnatum</i> Pico  | Truffe blanche du Piémont |
| <i>Tuber borchii</i> Vittad   | Blanquette                |

Parmi celles-ci se trouvent les champignons les plus chers au monde, entre autres, *T. melanosporum* s'est vendue 480 €/Kg durant la saison 2000-2001 (Le trufficulteur français n°37, p21). Mais l'espèce de truffe la plus chère est *T. magnatum*, puisque ses cours étaient en octobre 2001 de 7000 €/Kg pour les truffes de 20 à 40 g et de 8000 €/Kg pour celles de plus de 40 g (Le trufficulteur français n°36, p22). Nous reviendrons au paragraphe 1.2.1.2 sur l'importance économique des truffes.

### 1.1.2 Donc, les truffes sont des champignons, mais quelle est leur place taxonomique ?

En fait, les truffes sont des Ascomycètes, c'est-à-dire que leurs spores sont produites dans des sortes de sacs : les asques. Elles font partie des Discomycètes au sein des Eufungi (RiOUSSET et al., 2001). Les analyses morphologiques et les similitudes de formes rencontrées pour les ascocarpes hypogés ont conduit à les classer, dans un premier temps, avec d'autres champignons hypogés comme les Terfeziaceae, dans un ordre distinct des Pezizales : l'ordre des Tubérales (Tableau 2).

Mais, Trappe (1979) a considéré cet ordre comme étant « artificiel et anachronique » et a intégré la famille des Tuberaceae dans l'ordre des Pezizales. Des études plus récentes de biologie moléculaire réalisées sur les ordres des Tubérales et des Pezizales et portant sur les régions 18S et 28S de l'ADN ribosomique ont confirmé les conclusions de Trappe (1979) en montrant que l'ordre des Tubérales n'avait pas de raison d'exister (Figure 2 et Tableau 2; O'Donnell et al., 1997 ; Percudani et al., 1999).

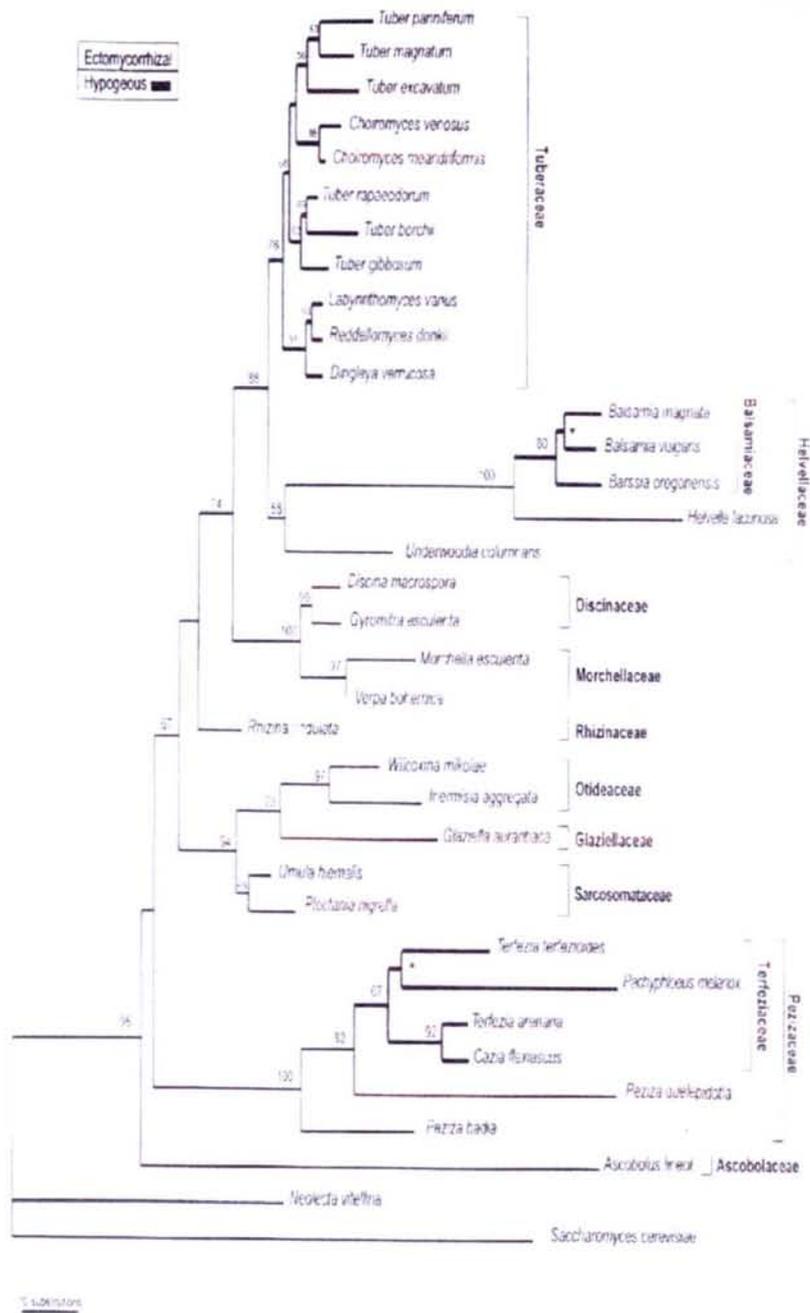
*Donc, le genre Tuber fait maintenant partie de la famille des Tuberaceae classées dans l'ordre des Pezizales.*

### 1.1.3 Depuis quand étudie-t-on les Tuber ?

C'est au XVI<sup>e</sup> siècle que les premiers travaux importants concernant les truffes ont été réalisés. Mattioli (1554) fait allusion pour la première fois à deux espèces de truffes comestibles et, comme nous l'avons déjà dit précédemment, Cesalpino (1583) est le premier à les reconnaître comme des champignons dans son livre « *De plantis XVI* ». Au XVII<sup>e</sup> siècle, l'Anglais John Ray dans deux ouvrages : « *Historia plantarum* » (1686) et « *Synopsis methodica* » (1690) décrit 184 espèces fongiques et identifie de véritables graines dans la truffe. Le XVIII<sup>e</sup> siècle voit les études se multiplier et, en 1711, le français Claude Joseph Geoffroy réalise une description très détaillée des truffes (Encadré 1). Il reconnaît les veines qui parcourent la pulpe et observe les graines de la truffe.

**Tableau 2.** Comparaison de la classification des ordres des Tuberales et des Pezizales issus de l'analyse morphologique (Dennis, 1981) avec l'ordre des Pezizales issu de l'analyse moléculaire (O'Donnell et al., 1997; Percudani et al., 1999). Les genres qui sont soulignés correspondent à des positions systématiques incertaines (d'après Miozzi, 2003).

| Classification suivant Dennis, 1981 |  | Classification suivant O'Donnell et al., 1997 et Percudani et al., 1999 |   |
|-------------------------------------|--|---|---|
| <b>Ordre Pezizales</b>              |  | <b>Ordre Pezizales</b>  |   |
| Famille                             | Genre  | Famille   | Genre   |
| Morchellaceae                       | <b>Morchella</b><br><i>Mitrophora</i><br><i>Varpa</i><br><i>Disciotis</i>  | Morchellaceae   | <b>Morchella</b><br><i>Mitrophora</i><br><i>Verpa</i>   |
| Helvellaceae                        | <i>Gyromitra</i><br><i>Helvella</i><br><i>Leptopodia</i><br><i>Macroscyphus</i><br><i>Cyathipodia</i><br><i>Paxina</i><br><i>Rhizina</i><br><i>Discina</i> | Helvellaceae  | <i>Helvella</i><br><i>Balsamia</i><br><i>Hydnobolites</i>   |
| Pezizaceae                          | <i>Plicaria</i><br><i>Sarcosphaera</i><br><i>Peziza</i><br><i>Pachyella</i>  | Pezizaceae  | <i>Plicaria</i><br><i>Sarcosphaera</i><br><i>Peziza</i><br><i>Pachyella</i><br><i>Terfezia</i><br><i>Pachyphloeus</i> |
| Humariaceae                         |  |   |   |
| <b>Ordre Tuberales</b>              |  |   |   |
| Famille                             | Genre  |   |   |
| Pseudotuberaceae                    | <u>Gyrocratera</u><br><i>Hidnobolites</i>  |   |   |
| Geneaceae                           | <i>Genea</i>   | Geneaceae   | <i>Genea</i>  |
| Eutuberaceae                        | <i>Stephensia</i><br><i>Pachyphloeus</i><br><i>Balsamia</i><br><i>Tuber</i>  | Tuberaceae  | <i>Tuber</i><br><i>Choiromyces</i>  |
| Terfeziaceae                        | <u>Hidnobolites</u><br><i>Choiromyces</i><br><i>Terfezia</i>   |   |   |



**Figure 2.** Arbre phylogénétique des Pezizales établi à partir de la séquence nucléotidique de l'ADNr 18S (Percudani et al., 1999).

**Encadré 1.** Extraits des observations sur la végétation des truffes de Claude Joseph Geoffroy en date du 25 février 1711 dans le volume annuel de l'Histoire de l'Académie royale des Sciences (d'après Le trufficulteur français n°37 p27-28):

« ...Cette forme de plante n'est qu'un tubercule charnu couvert d'une espèce de croûte dure, chagrinée et gercée à sa superficie, avec quelque sorte de régularité, telle à peu près qu'on l'aperçoit dans la noix de cyprès ... »

« ...Ce qui est certain c'est qu'il y en a de fort grosses. Elles naissent en différents pays. Du temps de Pline, les plus estimées étaient apportées d'Afrique. On en trouve à présent en Europe, dans le Brandebourg et en plusieurs autres endroits d'Allemagne [...] Elles sont communes en Italie, en Provence, en Dauphiné, dans le Languedoc, l'Angoumois et le Périgord. Il en croît aussi en Bourgogne et on en trouve aux environs de Paris. On remarque qu'elles viennent plus ordinairement dans des sols incultes, de couleur rougeâtre et sablonneux, quoiqu'un peu gras. On en trouve au pied et à l'ombre des arbres. On les trouve aussi quelquefois entre des racines, des pierres et quelquefois en pleine terre. Leur arbre favori est le chêne, ou le chêne vert, ou le chêne blanc. Comme l'orme est celui de la morille... »

« ...Elles ne paraissent dans leur naissance que comme des petits pois ronds, rouges en dehors et noirs en dedans. Ces pois grossissent peu à peu. C'est depuis ce temps-là qu'on commence à tirer de la terre, celles que l'on nomme truffes blanches [...] C'est l'opinion commune que les truffes qui ont été déplacées ne prennent plus de nourriture, quand même on les remettrait dans la même terre d'où on les a tirées ; mais si on les y laisse jusqu'à un certain point sans les déranger, elles grossissent insensiblement, leur écorce devient noire et chagrinée ou inégale, quoiqu'elles conservent toujours leur blancheur au-dedans : jusqu'à ce point, elles ont très peu d'odeur et de saveur, et ne peuvent encore s'employer qu'en ragoût... »

« ... Je considère la truffe blanche dans son premier état comme une plante qui est tout à la fois racine, tige et fruit dont le parenchyme se gonfle de toute part et dont les parties se développent insensiblement. À mesure que la truffe se gonfle, l'écorce se durcit, se gerce en différents endroits pour donner plus de nourriture à la masse qui est plus grosse, alors la truffe change de couleur et de blanche qu'elle était, on la voit se marbrer de gris et on n'aperçoit plus le blanc que comme un tissu de canaux qui se répandent dans le cœur de la truffe et qui viennent rendre aux gerçures de l'écorce... »

« ...l'odeur de la truffe ne dépend que de la grande quantité de sel volatil huileux qu'elle contient... »

Vingt ans plus tard, Micheli (1729) est le premier à dessiner les graines et il introduit le mot *Tuber* dans son livre « *Nova plantarum genera* ». En 1788, Vittorio Pico, médecin Turinois, fournit les bases de la nomenclature des Tuberales dans un ouvrage intitulé « *Melethemata inauguralia* ». Au XIX<sup>e</sup>, siècle, Vittadini (1831) publie « *Monographia Tuberales* » dans lequel il recadre la systématique des truffes. Il est le premier à différencier deux groupes de *Tuber* en se basant sur les caractères extérieurs : (i) chair relativement tendre, saveur agréable et bonne qualité gustative ; (ii) chair coriace, saveur désagréable et mauvaise qualité gustative. Les frères Tulasne publient en 1862 un livre sur les champignons hypogés, « *Funghi hypogaei* », dans lequel ils présentent la première classification scientifique mais aussi pratique des truffes. Ils utilisent pour la première fois des critères microscopiques. Chatin (1887) subdivise l'espèce *T. aestivum* de Vittadini en deux taxons distincts : *T. uncinatum* Chat. et *T. aestivum* Vitt. ; subdivision encore discutée, nous y reviendrons ultérieurement (Encadré

10). Ce même Chatin (1869, 1892) donne les conditions générales de la production des truffes et de la biologie des Tuberaceae (Encadré 2).

**Encadré 2.** Adolphe Chatin est très connu des trufficulteurs car il a écrit un ouvrage de référence sur la production des truffes, le texte qui suit décrit la vie de ce scientifique (d'après Le trufficulteur français n°45 p4) :

Chatin est né le 30 novembre 1813, à l'Île-Marianne-de-Saint-Quentin, près de Tullins, en Isère. Fils de cultivateurs, il ne possédait qu'un simple bagage primaire et des éléments de latin, lorsqu'il entra dans l'officine Lombard, à Saint-Marcellin, avant d'être recommandé par le pharmacien à un confrère parisien qui avait noté sa vive intelligence. Grâce à l'appui matériel de ce dernier, Chatin obtenait l'agrégation de pharmacie en 1841 et le poste de suppléant de botanique à l'École de pharmacie.

Il en détenait la chaire en 1848 après avoir obtenu le maintien du ministre de l'instruction publique, Hippolyte Carnot. En 1869, il écrit un premier ouvrage intitulé *La truffe*. Devenu Directeur de l'École de pharmacie, en 1873, il fut l'artisan de son transfert, avenue de l'Observatoire à Paris, en 1881.

Botaniste émérite, il joua un rôle déterminant dans la rénovation de l'enseignement pharmaceutique. Il a pendant 60 ans disséqué les plantes, étudié leur origine, leur structure, leur tissu, leur respiration, leur pigmentation. En 1887, il décrit une nouvelle espèce de truffe : *Tuber uncinatum* et en 1892 il écrit un deuxième livre : *La truffe. Botanique de la truffe et des plantes truffières*. Il est mort en 1901.

Au début du XX<sup>e</sup> siècle, Mattiolo de l'« Orto Botanico » de Turin approfondit le concept de symbiose mycorhizienne et la possibilité de cultiver les truffes, anticipant ainsi les résultats obtenus dans les années 70, nous y reviendrons au paragraphe 1.2.3. Il faut ensuite attendre 1938 pour voir Malençon donner une nouvelle clef analytique consacrée à la systématique des *Tuber*. En 1960, l'« Orto Botanico » de Turin revient au premier plan avec le livre d'Arturo Ceruti: « *Elaphomycetales e Tuberales* ».

D'autres travaux ont ensuite été réalisés sur la classification et la systématique des truffes principalement en Italie (Pacioni, 1988 ; Pacioni et Pomponi, 1989, 1991 ; Pacioni et Fantini, 1997 ; Montecchi et Lazzari, 1993 ; Ceruti et al., 2003) et en France (Chevalier et al. 1985; Rioussset et Rioussset, 1988, 1990, 1993 ; Chevalier et al., 1994 ; Henrion et al., 1994). D'autres pays européens se sont aussi intéressés aux truffes : la Suisse (Schärzel, 1967), l'Allemagne (Gross, 1987), la Hollande (De Vries, 1971, 1977), la Belgique (Thöen, 1988), le Danemark (Lange, 1956), l'Angleterre (Hawker, 1954 ; Pegler et al., 1993), la Hongrie (Szmere, 1965) ; mais cette liste n'est pas exhaustive.

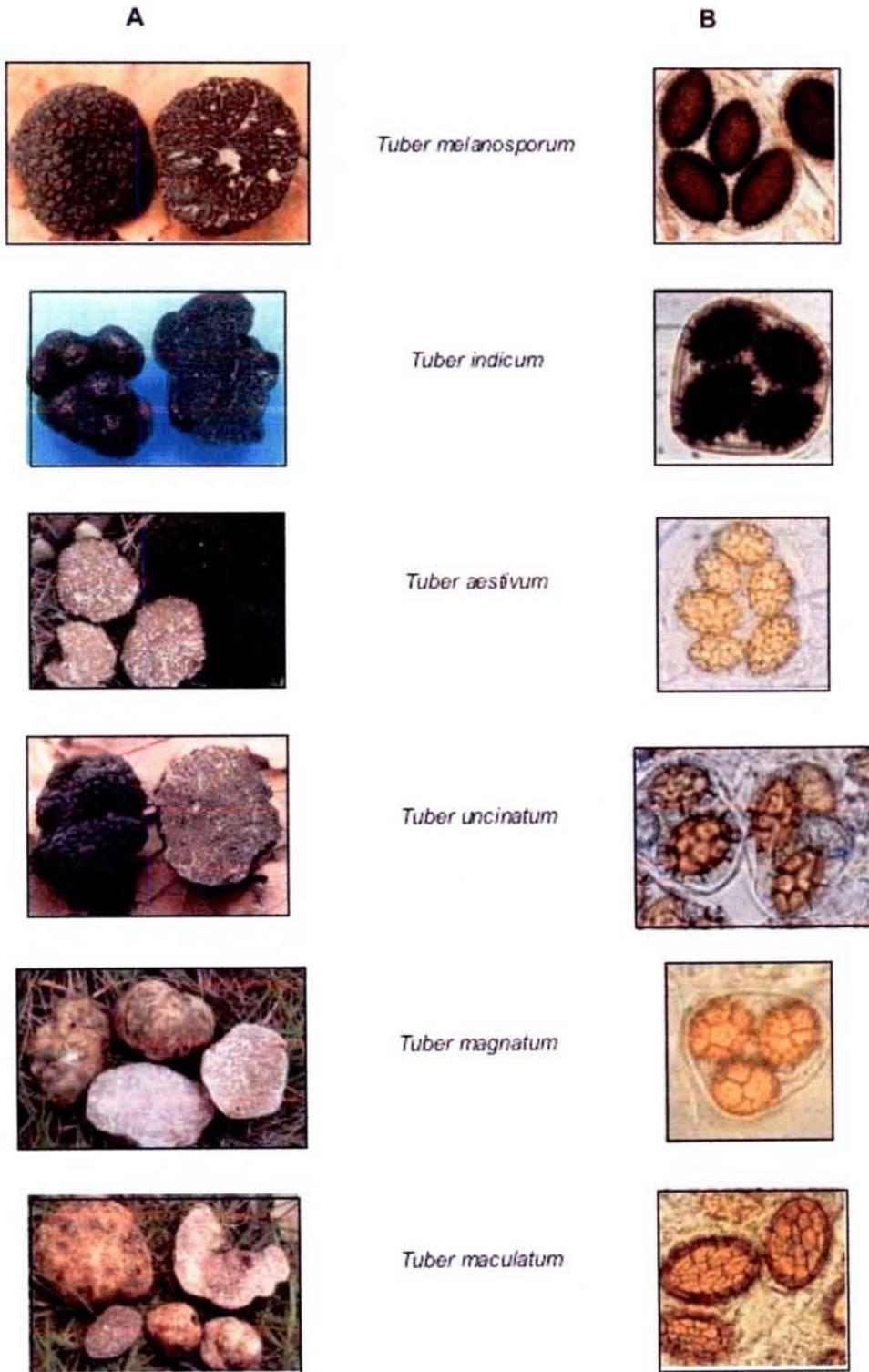
Même si Vittadini et les frères Tulasnes ont découvert la majorité des espèces de *Tuber*, d'autres ont été décrites plus récemment: *T. malençonii* (Donadini et al., 1978) ; *T. regianum* (Montecchi et Lazzari, 1987) ; *T. pseudoexcavatum* en Chine (Wang et al., 1998).

Comme nous venons de le voir, les truffes ont donné lieu à un certain nombre d'études et cela depuis plusieurs siècles. Ces travaux se sont basés, dans un premier temps, sur l'observation des corps fructifères au microscope et à la réalisation de clefs d'identifications établies sur les caractéristiques du péridium (aspect, couleur, dimensions) et sur celles des spores (forme, ornementation) (Figure 3). Toutefois, l'utilisation de ces clefs de détermination est difficile et reste le privilège de spécialistes. De plus, il existe de fortes similitudes morphologiques entre certaines espèces qui rendent l'identification difficile, c'est le cas pour *T. aestivum*-*T. uncinatum*, *T. brumale*-*T. moschatum*, *T. melanosporum*-*T. hiemalbum* (Chevalier et al., 1985).

Ces problèmes d'identification taxonomique sont d'autant plus importants si l'on souhaite caractériser les mycorhizes et non les ascocarpes. C'est pourquoi, depuis le début des années 1980, beaucoup d'études se sont consacrées à la réalisation de nouveaux outils d'identification des espèces de *Tuber*, nous y reviendrons au paragraphe 1.4.2.

**Cette première partie de l'introduction nous a permis d'avoir une idée générale sur les truffes. Il s'agit de champignons ascomycètes ectomycorhiziens du genre *Tuber*. Les études les concernant ont été très nombreuses depuis le XVI<sup>e</sup> siècle et elles ont posé les bases de la taxonomie, de l'écologie, de la biologie et de la génétique des *Tuber*. Dans les paragraphes qui suivent nous entrerons plus en détail sur les études plus récentes concernant ces différents points. Mais, j'ai trouvé nécessaire de parler tout d'abord de la relation Truffe/homme.**

Figure 3. Ascocarpes (A) et spores (B) de quelques espèces de truffes.



## **1.2 Les truffes et l'homme : place de la trufficulture dans la société rurale**

Au-delà de la mythologie, des pouvoirs magiques et aphrodisiaques, les truffes présentent bien d'autres intérêts. Le premier qui vient à l'esprit est l'intérêt gastronomique, mais il existe aussi beaucoup d'autres raisons de s'intéresser à ces champignons. C'est ce que nous allons voir dans ce premier paragraphe.

### **1.2.1 Quelles sont les intérêts des truffes et de la trufficulture?**

#### **1.2.1.1 Intérêt gastronomique et culturel**

D'abord simple tubercule entrant dans la chaîne alimentaire des premiers hommes vivant sur les territoires où elle prospérait, les truffes n'étaient qu'un élément médiocre, parce que récoltées au moment de leur grossissement. La truffe s'offrait alors à leurs yeux et constituait une pitance facile d'accès. Peu à peu on apprendra à attendre sa maturité. Mais ce n'est que lorsque les civilisations méditerranéennes se développeront qu'elle prendra une place de plus en plus importante. Elle pourra dès lors apparaître sur la table des Grands. Elle était rarement cuisinée à son avantage ; accommodée le plus souvent avec force herbes et épices, il lui était impossible de s'exprimer. Après la décadence romaine (450 ap. J.C), elle semble avoir été oubliée pendant près de mille ans, tout au moins dans les hautes sphères. Invasions et famines se suivant, seuls les Seigneurs locaux perpétuèrent sa tradition. Après que les Papes venus en Avignon l'eurent remise à la mode, les cours royales leur emboîtèrent le pas. Son exotisme en faisait un produit de luxe et un signe de richesse. François 1<sup>er</sup> et à sa suite tous les Bourbons cédèrent aux charmes de la truffe et en firent l'ordinaire de leurs fêtes grandioses.

Le parcours gastronomique de la truffe amorça un tournant, lorsque des Chefs célèbres du 18<sup>e</sup> comme Carême ou Brillat-Savarin comprirent qu'il fallait la cuisiner pour elle-même et lui donnèrent ses vraies lettres de noblesse. La truffe est maintenant proposée dans les plus grands restaurants et elle fait partie des mets les plus recherchés comme le montre le menu proposé au Sénat le 23 février 2002 (Encadré 3).

Les truffes font partie du patrimoine gastronomique et culturel de plusieurs régions en Europe, comme le Périgord, le Quercy, le sud-est de la France ; le Piedmont, les Marches en Italie ; la province de Teruel en Espagne.

Dans ces régions, de nombreuses manifestations culturelles, comme des foires, ont lieu autour de la truffe. Mais bien d'autres régions et pays en produisent et donc en consomment (Hongrie, Croatie...). Pour donner un exemple de l'internationalisation des *Tuber*, 300 participants provenant de 18 pays différents se sont retrouvés au 3<sup>e</sup> Congrès International consacré aux Truffes à Aix-en Provence, en 1999.

**Encadré 3** Menu servi lors du dîner truffes à la présidence du Sénat le 13 février 2002 et préparé pour le président Christian Poncelet par l'équipe de cuisiniers dirigée par un lotois, M. Mathou :

Porcelaine Lutée au *Tuber melanosporum*  
Bouillon de Bresse au Céleri

\*\*\*

Petit Homard Breton poêlé au beurre demi-sel  
Cannellonis aux truffes noires et Palourdes

\*\*\*

Granité au Marasquin et Truffes confites  
Gelée de Vieux Porto

\*\*\*

Coulommiers Affiné au Diamant du Quercy  
Salade Amère parfumée aux Cèpes

\*\*\*

Moelleux tiède Grand Caraque  
Crèmeux aux Truffes  
Macération de Mas Amiel

\*\*\*

Café Moka et Mignardises

### 1.2.1.2 Intérêt économique

Les *Tuber* ne sont pas les seuls champignons comestibles ayant un intérêt économique : *Boletus edulis* peut se vendre entre 13 et 19,8 €/Kg, *Cantharellus cibarius* de 8 à 19 € et *Tricholoma matsutake* de 40 à 500 € (Hall et al., 2003). Cependant, certaines espèces de truffes sont devenues des produits de luxe qui sont malheureusement inaccessibles à la majorité des consommateurs. En effet, les cours de *T. melanosporum* sur les marchés de gros français de 1990 à 2001 étaient de 182 à 480 €/Kg (Tableau 3). À la veille de Noël 2003, elle a atteint un prix record de 3 000 €/Kg dans une épicerie parisienne ; les producteurs de Périgueux, quant à eux, la vendait 1 500 €/Kg (Le Trufficulteur français n°45 p3). Pour la saison 2000-2001, le chiffre d'affaires global de *T. melanosporum* en France est estimé à 66,6 millions d'euros.

*Si l'on pense qu'à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, la production de T. melanosporum était de 1588 tonnes (Chatin, 1869), cela représenterait actuellement un marché de plus de 380 millions d'euros !*

**Tableau 3** Bilan des campagnes truffières françaises de 1990 à 2002  
(Estimations faites pour *T. melanosporum*).

| Saison    | France              |                   | Espagne             |                    | Italie              |                 |
|-----------|---------------------|-------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-----------------|
|           | Production globale* | Prix moyen** €/Kg | Production globale* | Prix moyen*** €/Kg | Production globale* | Prix moyen €/Kg |
| 1990-1991 | 17                  | 301               | 30                  |                    | 5                   |                 |
| 1991-1992 | 20                  | 360               | 10                  |                    | 5                   |                 |
| 1992-1993 | 31                  | 208               | 23                  |                    | 3                   |                 |
| 1993-1994 | 22                  | 362               | 9                   |                    | 2                   |                 |
| 1994-1995 | 12                  | 380               | 4                   | 210                | 30                  |                 |
| 1995-1996 | 19                  | 258               | 20                  | 127                | 25                  |                 |
| 1996-1997 | 50                  | 182               | 25                  | 125                | 20                  |                 |
| 1997-1998 | 30                  | 214               | 80                  | 115                | 24                  |                 |
| 1998-1999 | 14                  | 437               | 7                   | 365                | 4                   |                 |
| 1999-2000 | 40                  | 465               | 35                  |                    | 10                  |                 |
| 2000-2001 | 35                  | 480               | 6                   |                    | 4                   |                 |
| 2001-2002 | 15                  |                   | 20                  |                    | 5                   | 572             |

\* Estimations faites en tonnes.

\*\* L'estimation des cours dans cinq gros marchés français : Valréas, Aups, Lalbenque, Carpentras et Richerenque. Les données présentées sont celles du Service des Nouvelles des Marchés du ministère de l'Agriculture.

\*\*\*Données d'après Santiago Reyna dans le Trufficulteur français n°32 p11.

Toujours pour la truffe du Périgord, il a été estimé qu'elle représente de 1,4 à 6,4 % du revenu net d'exploitation moyen annuel (RNE) dans les principaux départements producteurs (Courvoisier, 1992).

Mais, *T. melanosporum* n'est pas la truffe la plus chère au monde, puisque la truffe blanche du Piémont, *T. magnatum*, bat tous les records. En octobre 2001, elle s'est vendue jusqu'à 8000 €/Kg (cf § 1.1.1). Au marché de Murisengo (Piémont, Italie) en Novembre 2000, une truffe de 375g a été commercialisée environ 7800 €/Kg, elle a donc rapporté à son heureux récolteur environ 2900 €! Ces chiffres illustrent bien le considérable intérêt économique de la production de truffes.

*Comment peut-on expliquer la forte valeur économique de certaines espèces de truffes ?*

La principale raison vient de leur intérêt gastronomique, il s'agit de produits très recherchés mais aussi très rares ! Comme nous l'avons dit, *T. melanosporum* a vu sa production diminuer de 1588 tonnes à la fin du XIX<sup>e</sup> à moins de 100 tonnes actuellement. Donc l'offre ne peut satisfaire la demande et dans les années creuses, les prix flambent. Il en est de même

pour *T. magnatum* dont la distribution est limitée à l'Italie et à quelques autres pays comme la Croatie, la Slovénie et la Hongrie. La production italienne de cette truffe est d'environ 50 tonnes ce qui est très peu compte tenu de la demande. D'autre part, la culture de cette truffe n'est pas encore maîtrisée, nous y reviendrons au paragraphe 1.2.3.

#### **1.2.1.3 Intérêt humain**

En fait, les truffes maintiennent une présence humaine dans des régions défavorisées. Elles se développent souvent dans des zones peu propices aux cultures traditionnelles, il s'agit donc, pour l'agriculteur, d'un bon moyen de diversification. Compte tenu de leur prix, elles fournissent un bon revenu complémentaire et peuvent même constituer un substitut appréciable aux productions agricoles dans des régions peu compétitives. La trufficulture lutte donc contre la désertification.

#### **1.2.1.4 Intérêt écologique**

Les truffières nécessitent un entretien régulier, elles maintiennent donc un équilibre dans l'environnement. En fait, des études ont été réalisées sur les techniques sylvicoles permettant de maintenir la production de truffières naturelles de *T. melanosporum* (Reyna et al., 2002). Ces techniques culturales entretiennent donc les forêts et ainsi les préservent des incendies.

#### **1.2.1.5 Intérêt de développement rural**

Depuis quelque temps, un tourisme s'est développé autour de la truffe avec l'ouverture de restaurants, de musées et d'agritourismes. Ces activités peuvent être l'œuvre de producteurs voulant se diversifier ou bien de personnes extérieures à la trufficulture, mais qui l'ont utilisée comme facteur intéressant de développement local (Le Trufficulteur français n°36 p9).

Par exemple, l'écomusée de la truffe à Sorges existe déjà depuis 20 ans et accueille 10 000 visiteurs par an. Depuis quelques années, de nombreux agritourismes se sont ouverts en France, en Espagne et en Italie. Ils constituent une bonne solution pour développer et surtout diversifier certaines régions déjà très touristiques. Je citerai l'exemple d'un agritourisme de la Toscane (Italie), Barbiella Nuova, qui propose comme activité la recherche de truffes blanches (<http://www.barbiellanuova.it>). Toujours en Italie, une association : « Città del tartufo » œuvre pour le développement et la connaissance des truffes, en organisant, par

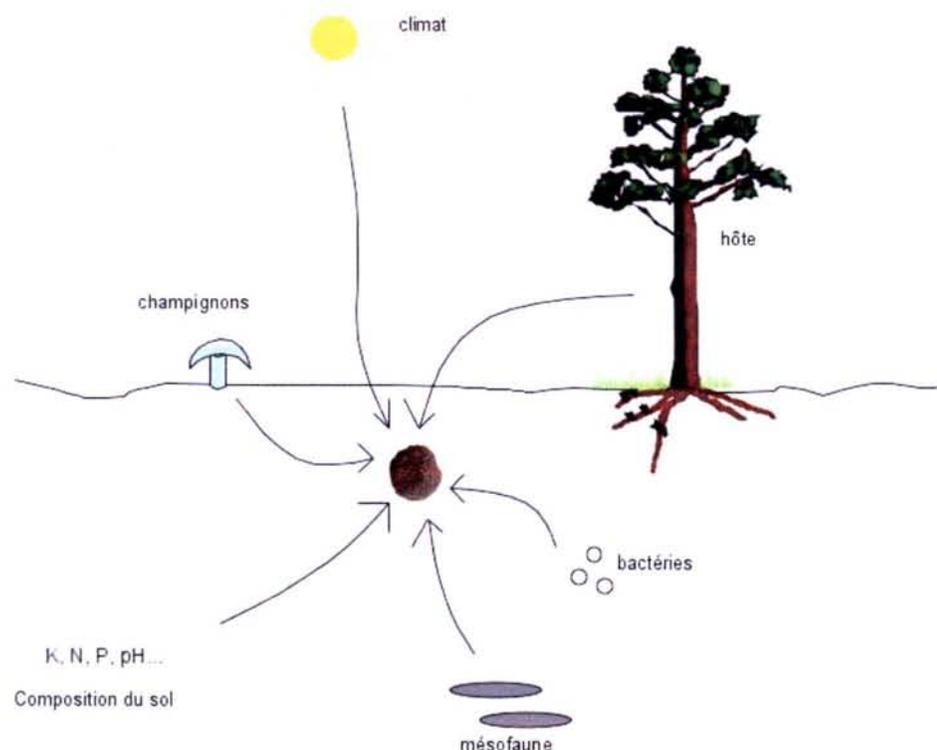
exemple, des concours culinaires à base de ces champignons.

### 1.2.2 L'écologie des truffes : des connaissances indispensables pour les cultiver

Comme nous venons de le voir, la production de truffes présente divers intérêts, c'est pourquoi, leur culture a fait l'objet de nombreux essais plus ou moins fructueux. Toutefois, avant de pouvoir cultiver une espèce, et entre autres les truffes, il faut avoir quelques données sur son écologie et essayer de répondre à diverses questions :

- (i) Sur quels sols les trouve-t-on ?
- (ii) Sous quels climats poussent-elles ?
- (iii) Quels sont leurs hôtes ?
- (iv) Avec quels micro-organismes interagissent-elles ?

En effet, beaucoup de facteurs biotiques (champignons, bactéries et autres microorganismes ; mésofaune comme les lombrics ; l'hôte végétal) et abiotiques (composition physicochimique des sols ; climat comme la pluviométrie et la température) peuvent influencer la vie des truffes et favoriser ou inhiber la production d'ascocarpes (Figure 4).



**Figure 4.** Facteurs abiotiques et biotiques pouvant influencer la vie des truffes.

### Caractéristiques écologiques de quelques espèces de *Tuber*

Même s'il existe des différences écologiques entre les espèces de truffes, quelques caractéristiques générales sont communes : elles poussent dans des sols calcaires avec des pH compris entre 7 et 8 et présentent une large gamme d'hôtes (Tableau 4). En revanche, il existe de grandes différences concernant la distribution géographique des *Tuber*. *T. borchii*, *T. uncinatum* et *T. maculatum* sont les espèces ayant la plus grande répartition géographique puisqu'elles se retrouvent dans presque toute l'Europe, du Sud au Nord et même jusqu'à Moscou pour *T. maculatum* (Riousset et al., 2001). Par contre, *T. melanosporum* et *T. magnatum* ont une distribution géographique beaucoup plus restreinte (Tableau 4). Il existe même une espèce, *T. regianum*, qui est très rare et récoltée uniquement dans la province de Reggio Emilia en Italie (Montecchi et Lazzari, 1987 ; Riousset et al. 2001).

**Tableau 4.** Quelques caractéristiques écologiques de *Tuber uncinatum*, *T. magnatum* et *T. melanosporum* (d'après Chevalier et Frochot, 1997, Riousset et al., 2001 et Ceruti et al., 2003)

|                                  | <i>Tuber uncinatum</i>   | <i>Tuber magnatum</i>  | <i>Tuber melanosporum</i>   |
|----------------------------------|--|--|---|
| <b>Distribution géographique</b> | Vaste distribution dans toute l'Europe, du Portugal à la Suède et jusqu'en Russie à l'Est  | Le principal pays de production de cette truffe est l'Italie, mais elle se trouve aussi quelquefois dans les pays de l'ex-Yougoslavie : Croatie et Slovénie ; ainsi qu'en Hongrie.   | À l'état naturel, cette truffe est trouvée en France, en Italie et en Espagne. Maintenant on la trouve aussi aux USA, en Israël, en Nouvelle-Zélande et en Australie.   |
| <b>Caractéristiques du sol</b>   | Récoltée dans les terrains calcaires, drainés et caillouteux d'origine géologique variée avec des pH compris entre 7 et 8.<br>On la retrouve dans les bois de feuillus et de conifères mais aussi avec des arbres isolés, à des altitudes variées jusqu'à 1400-1600 m. | Elle se trouve dans des sols marno-calcaires de l'ère tertiaire (surtout Miocène) et quelques fois de l'ère quaternaire (Pléistocène et Olocène), pauvre en P et en N à pH compris entre 7 et 8,5.<br>Elle se récolte à des altitudes de 700 à 800 m, au fond des vallées, le long des fossés, en terrains aérés, un peu humides mais drainés. | Elle a pour habitat naturel les sols calcaires et calcaires argileux dérivés de la décomposition des roches de l'ère secondaire (Crétacé, Jurassique et Trias), mais aussi de l'ère tertiaire. Elle se récolterait aussi dans des sols de l'ère primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire ne dépassant pas 40% d'argile avec un pH entre 7,5 et 8,5.<br>Elle se récolte entre 100 et 1100 m. |
| <b>Hôtes</b>                     | Elle s'associe à de nombreuses essences : chênes (sessiles, rouvres, pubescents, chevelus) et leurs hybrides, hêtres, noisetiers (communs et turcs), charmes (blancs et noirs), bouleaux, tilleuls, pins (sylvestres et noirs d'Autriche), épicéas, cèdres de l'Atlas. | Elle s'associe aux chênes (pédonculés, chevelus, pubescents), peupliers (blancs, noirs), trembles, charmes (blancs, noirs), saules blancs, saules des chèvres, tilleuls, noisetiers.   | Elle s'associe aux chênes (pédonculés, sessiles, pubescents, verts, kermès, chevelus) et leurs hybrides, noisetiers (communs et turcs), charmes (blancs, noirs), tilleuls, bouleaux, châtaigniers, pins, cèdres, cistes.  |

**Tableau 5.** Caractéristiques physicochimiques des sols de truffières de *T. melanosporum* et *T. uncinatum* (Chevalier et al., 2002).

|                              | <i>T. melanosporum</i> | <i>T. uncinatum</i> (France) | <i>T. uncinatum</i> (Italy, Parma) |
|------------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| % fine earth                 |                        |                              |                                    |
| clay                         | 7.2 – 45.8             | 13.6 – 63.6                  | 21 – 36                            |
| fine silt                    | 3.5 – 53.3             | 11.3 – 49.7                  |                                    |
| Rough silt                   | 2.6 – 36.2             | 6.0 – 26.6                   | 38 – 50                            |
| Fine sand                    | 4.3 – 63.2             | 1.7 – 15.1                   |                                    |
| Rough sand                   | 0.5 – 70.0             | 0.6 – 54.0                   | 14 – 41                            |
| pH                           | 7.8 – 8.35             | 7.1 – 8.0                    | 7.11 – 7.87                        |
| % fine earth                 |                        |                              |                                    |
| Organic matter               | 8 – 83                 | 44 – 211                     | 23.1 – 70.6                        |
| C                            | 4.7 – 50               | 28.99 – 155.65               |                                    |
| N                            | 0.46 – 5.22            | 3.44 – 7.63                  | 1.6 – 4.4                          |
| % fine earth                 |                        |                              |                                    |
| Total CaCO <sub>3</sub>      | Traces – 738           | 4 – 710                      | 13 – 295                           |
| Active Ca CO <sub>3</sub>    | 10 – 181               |                              | 10 – 109                           |
| Exchangeable Ca              | 4.75 – 13.5            |                              |                                    |
| Exchangeable Mg              | 0.05 – 0.52            | 0.23 – 2.80                  | 0.06 – 0.14                        |
| Exchangeable K               | 0.04 – 0.50            | 0.16 – 0.90                  | 0.16 – 0.42                        |
| Exchangeable Na              | 0.008 – 0.038          |                              |                                    |
| Extractable P <sub>205</sub> | 0.006 – 0.98           | 0.02 – 0.10                  | 0.07 – 0.14                        |

L'analyse physicochimique fine du sol de truffières de *T. melanosporum* et *T. uncinatum* en France et en Italie montre que cette dernière a une plus grande tolérance (Tableau 5). Les différences de distribution géographique observées chez les truffes sont dues principalement à leur exigence vis-à-vis du sol et du climat. En effet, *T. uncinatum*, qui est plus tolérante, a une plus grande distribution géographique que *T. melanosporum*, qui est plus exigeante.

Comme nous venons de le voir, les caractéristiques du sol des truffières sont relativement bien connues. Cependant, leur fonctionnement et l'interaction entre les truffes et les micro-organismes sont encore pour la plupart inconnus.

### **Interaction entre les Tuber et les champignons présents dans les truffières**

Peu d'études se sont focalisées sur l'analyse de la biodiversité fongique et bactérienne au sein des truffières. Luppi (1973) a identifié des champignons qui semblent communs aux sols des truffières (*Mortierella alpina*, *Penicillium lilacium*, *P. thomii*, *Gliocladium roseum* et *Humicola fusco-atra* var *fusco-atra*). Plus récemment, De Miguel et al. (2002) ont étudié les mycorhizes et les fructifications trouvées dans six truffières espagnoles de *T. melanosporum*. Au niveau des mycorhizes, ils ont caractérisé 20 morphotypes, dont 17 identifiés, parmi lesquels six espèces de *Tuber*. Cependant, ils n'ont pas réalisé d'analyse moléculaire des mycorhizes, ce qui rend les résultats discutables car l'identification des mycorhizes est très difficile, nous y reviendrons ultérieurement (§1.4.2). Ces auteurs ont récolté des fructifications appartenant aux genres *Tuber*,

*Genea*, *Hymenogaster*, *Rhizopogon*, *Pisolithus* et *Scleroderma*. Dans un travail similaire, Rossi et al. (2002) ont analysé une truffière de *T. magnatum* en Italie. Ils ont trouvé des mycorhizes de type *Tuber*, mais ils n'ont pas formellement identifié des mycorhizes de *T. magnatum*.

*Il existe donc peu d'informations sur les champignons qui coexistent avec les truffes.*

### **Les bactéries et les truffes, une interaction semblant importante**

Les bactéries peuvent aussi interagir avec les truffes. J. Chaze, professeur à la faculté de pharmacie de Clermont-Ferrand, a mis en contact différentes cultures *in vitro* de truffes avec des bactéries provenant d'un sol truffier (Le trufficulteur français n°42 p12). Il en a conclu que le mycélium de *T. melanosporum* présente envers les bactéries des sols truffiers des propriétés abiotiques qui ne paraissent pas dépasser la bactério-stase, c'est-à-dire un arrêt provisoire de leur activité mais sans les tuer. De plus, il n'a pas mis en évidence d'effet antibiotique du mycélium de *T. melanosporum* sur les pathogènes de l'humain.

*Mais quelles sont ces bactéries qui vivent en contact avec les truffes ?*

Citterio et al. (1995) ont isolé des *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* et *Staphylococcus* à partir d'ascocarpes de *T. magnatum*, *T. borchii* et *T. maculatum*. Certaines souches de Pseudomonales, isolées de l'ascocarpe de *T. borchii*, ont la capacité de restreindre la croissance de champignons phytopathogènes et elles possèdent des capacités cellulolytique, chitinolytique et protéolytique *in vitro*, relâchant ainsi des métabolites utilisables par le mycélium de *T. borchii* (Sbrana et al., 2000 ; Citterio et al., 2001). De même, des bactéries cultivables vivant strictement associées aux mycorhizes de *T. borchii* ont été isolées (Sbrana et al., 2002). L'espèce la plus représentée est *Pseudomonas fluorescens*, mais il existe aussi *P. corrugata* et au moins trois groupes d'Actinomycètes. Plusieurs de ces bactéries favorisent la croissance du mycélium de *T. borchii*. Enfin, Barbieri et al. (2000) ont identifié des bactéries non cultivables associées au mycélium de *T. borchii*. Elles appartiennent au sous-groupe des *Sphingobacterium* des *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* et il semble qu'elles peuvent être intra-ou extracellulaire (Barbieri et al., 2000 et 2002a). Leur nombre a été estimé à approximativement  $10^6$  cellules pour un mycélium de 30 jours (Barbieri et al., 2002b), toutefois leur rôle n'est pas encore connu.

*Il existe donc des bactéries vivant étroitement liées aux truffes, elles semblent avoir un effet bénéfique en aidant leur nutrition et en éliminant les champignons compétiteurs, mais leur rôle exact est encore inconnu.*

## **Il existe aussi des levures vivant au contact des truffes**

Dans une analyse de trois truffières italiennes de *T. aestivum*, Zacchi et al. (2003) ont isolé plusieurs espèces de levures : *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus humicolus*, *Rhodotorula mucilaginosa* [*R. rubra*], *Debaryomyces hansenii* et *Saccharomyces paradoxus*. Parmi celles-ci, les *Cryptococcus* semblent spécifiques de l'écosystème truffier, puisque *Cryptococcus albidus* est retrouvé dans la majorité des prélèvements. Elles pourraient avoir un rôle dans la nutrition de l'ascocarpe (cf. § 1.3.3.2).

*Certaines caractéristiques écologiques des truffes sont connues comme : leur distribution géographique, les caractéristiques physico-chimiques des sols truffiers, leurs hôtes. Mais il reste de nombreuses inconnues concernant le fonctionnement des truffières et les interactions des truffes avec les autres micro-organismes : bactéries, champignons et levures. Il reste donc beaucoup de travail à faire pour comprendre le fonctionnement des truffières.*

### **1.2.3 La trufficulture, un problème vieux de plusieurs siècles**

#### **1.2.3.1 Tuber melanosporum, la première truffe cultivée**

##### **Les premières expériences ont eu lieu en France**

Au XVI<sup>e</sup> siècle, Bruyerin, médecin de François I<sup>er</sup>, rapporte que la culture de la truffe (*T. melanosporum*) est possible (Callot, 1999). Mais la trufficulture a pris son véritable essor au XVIII<sup>e</sup> siècle grâce à la découverte de Talon qui planta des glands de Chêne et récolta des truffes à proximité des jeunes arbres plusieurs années après (Hall et al., 2003). Auparavant, elles n'étaient qu'un produit de cueillette, au même titre que les autres champignons.

À partir de cette époque, de nombreuses plantations de Chênes truffiers sont installées sous forme de boisements épars et de vergers cultivés. Mais c'est surtout à partir de 1880, après la crise phylloxérique, que de nombreux vignobles ont été transformés en truffières expérimentales (Dupré, 1997). Ainsi, la fin du XIX<sup>e</sup> siècle est une période faste pour la trufficulture, avec une production de 1588 tonnes (Chatin, 1869). Depuis, elle a continuellement diminué, pour être inférieure à 100 tonnes de nos jours (Tableau 3). Les raisons de cette chute de production sont nombreuses et difficiles à analyser puisque les chiffres sont parfois critiquables. Toutefois, la première guerre mondiale et l'exode rural qui ont fait disparaître la main d'œuvre qualifiée, ainsi que le vieillissement des

truffières, peuvent en partie expliquer ce déclin (Dupré, 1997).

Depuis le début de la trufficulture, les techniques culturales ont profondément évolué. Nous sommes passés d'un modèle forestier, avec le semis de glands, à un modèle scientifique (Callot, 1999). En effet, les prototypes des premiers plants mycorhizés par la Truffe noire du Périgord, en France, ont été réalisés en 1970, à l'INRA de Clermont-Ferrand (Chevalier et Grente, 1979). Les premiers plants produits à grande échelle ont été commercialisés sous licence INRA dès 1972, par la société civile AGRI-TRUFFE (Dupré, 1997). Cette nouvelle technique permet un début de production plus rapide : 5 à 10 ans après plantation (Le Tacon et al., 1988). Cependant, il existe des problèmes dus à l'adaptation de ce matériel végétal à l'hétérogénéité des milieux et des pédo-climats, mais aussi à la pérennité du champignon. En effet, dans de nombreuses plantations, *T. melanosporum* est remplacé par *T. brumale*. Toutefois, les relations existant entre ces deux champignons sont complexes puisqu'il semblerait que *T. brumale* stimule le développement de *T. melanosporum* dans certaines conditions (Mamoun et Olivier, 1993).

*Malgré les problèmes dus aux contaminations et à la survie de l'inoculum, actuellement, plus de 80% de la production française de T. melanosporum provient de truffières artificielles (Le Trufficulteur français n°45, p6).*

**La France n'est pas le seul pays où la trufficulture est importante, c'est aussi le cas en Italie**

Comme la France, l'Italie a une longue tradition de la truffe. C'est pourquoi, de nombreux italiens ont contribué à la connaissance de ces champignons (cf. § 1.1.3). En fait, les problèmes rencontrés par la trufficulture italienne sont très proches de ceux des français. Par exemple, de nombreuses truffières de plants mycorhizés avec *T. melanosporum* sont contaminées par *T. brumale*. D'autre part, peut-être plus que dans les autres pays, la production de truffes est en baisse en Italie comme l'indique le Tableau 3.

*T. melanosporum* se retrouve dans de nombreuses régions italiennes: Ligurie, Vénétie, Emilie, Romagne, Toscane, Ombrie, Trentin Marches, Abruzzes, Latium, Campanie et Piémont. Il y a quelques années les plantations artificielles de cette truffe étaient moins nombreuses qu'en France, mais vu la baisse de production elles se sont multipliées. Toutefois, pour les italiens, le principal problème est la baisse de production de *T. magnatum*, et là les techniques culturales ne sont pas encore bien au point comme nous le verrons dans le paragraphe 1.2.3.2.

*Pour conclure, en Italie, peut-être plus qu'en France, il semble que le rôle touristique et gastronomique prédomine par rapport à la productivité dans la trufficulture.*

***Et l'Espagne ? (d'après Reyna dans Le trufficulteur français n°32 p10-14)***

Bien que les truffes soient connues en Espagne depuis les Romains, il faut attendre la moitié du XIX<sup>e</sup> siècle pour que la récolte de *T. melanosporum* commence. Chatin (1892) rapporte l'exportation de 877 Kg de truffes de l'Espagne vers la France. Contrairement à la France et à l'Italie il n'existe pas d'usage traditionnel de la truffe en gastronomie, elle est utilisée par les restaurateurs depuis seulement une cinquantaine d'années.

Les régions productives espagnoles sont l'*Andalucia* (10 hectares), l'*Aragon* (900 hectares), la *Castilla-la Mancha* (80 hectares), la *Castilla-Leon* (750 hectares), la *Cataluna* (30 hectares), la *Comunidad Valenciana* (150 hectares), la *Navarra* (100 hectares) et *Pais Vasco* (70 hectares). À l'exception de la *Castilla-Leon* qui ne produisait que *T. aestivum* toutes ces régions produisent *T. melanosporum* de façon naturelle.

La plus ancienne plantation connue et documentée date de 1968 à Castellon, elle a été réalisée avec des semis de chênes truffiers sans aucune inoculation. Dans les années 1970-1980 a été créée à Arotz-Catesa la plus grande exploitation truffière au monde, elle fait 600 hectares. Actuellement, la trufficulture en Espagne est bien implantée et la production de *T. melanosporum* est importante comme lors de l'année 1997-1998 où elle a atteint 80 tonnes (Tableau 3).

*Pour conclure, l'Espagne a un grand potentiel de production truffière car la superficie potentiellement utilisable en trufficulture est d'environ 10 millions d'hectares.*

***Introduction de T. melanosporum dans des pays non producteurs naturellement***

La possibilité d'utiliser des plants inoculés par *T. melanosporum* a permis l'introduction de ce champignon dans des pays non producteurs naturellement, c'est le cas en Israël (Kagan-Zur et al., 2001), aux USA (Ceruti et al., 2003), en Nouvelle-Zélande (Hall, 2004) et en Australie (Malajczuk, communication personnelle).

Je citerais l'exemple de la Nouvelle-Zélande, qui est un pays de l'hémisphère sud. Très peu de champignons consommés en Europe

poussent naturellement dans l'Hémisphère Sud à l'exception du Cèpe de Bordeaux (*Boletus edulis*), du Lactaire délicieux (*Lactarius deliciosus*) et de la blanquette (*Tuber borchii*). Ces champignons ont vraisemblablement été amenés en Nouvelle-Zélande de manière fortuite par les premiers colons. À la fin des années 1970, Ian Hall, a convaincu les autorités locales du marché potentiel des champignons comestibles dans ce pays étant donné que les mois hivernaux (mai à août) sont en dehors de la période de production de l'Hémisphère Nord (Hall, 2004). Étant donné que la plupart des sols de la Nouvelle-Zélande sont acides, il a fallu apporter 50 tonnes à l'hectare de calcaire pour réaliser les truffières afin de changer la nature du terrain. Vers 1990, les premiers plants truffiers sortaient des laboratoires et 11 truffières furent mises en place. Les premières truffes noires (*T. melanosporum*) ont été récoltées en 1993. Actuellement 6 des 11 truffières produisent. Entre autres, une truffière de 600 m<sup>2</sup> a produit, en 2002, 12 kg de truffes (Hall, 2004).

### 1.2.3.2 Qu'en est-il pour les autres espèces ?

**Parmi les autres espèces de truffes cultivées, *T. uncinatum* l'est depuis plusieurs décennies**

La truffe de Bourgogne (*T. uncinatum*) est une des espèces ayant la distribution géographique la plus grande : on la retrouve du sud de l'Europe (Italie, Espagne, Portugal...) jusqu'au nord (Angleterre, Suède...), mais aussi à l'Est (République Tchèque, Pologne...) (Tableau 4). Elle a même été retrouvée dans des paquets de truffes provenant de la Chine (Chevalier et al., 2002). Même si elle est moins recherchée par les consommateurs que *T. melanosporum* ou *T. magnatum*, elle a aussi d'excellentes qualités organoleptiques qui ont conduit les chercheurs à développer sa culture depuis 30 ans (Chevalier et Frochot, 1989, 1990). En fait, les modèles de culture de *T. melanosporum* peuvent être utilisés pour *T. uncinatum* (Sourzat, 1994) mais du fait de sa plus grande distribution, *T. uncinatum* peut être planté dans des sols plus variés que *T. melanosporum*.

Dans la province de Parme (Italie), des plants inoculés par *T. uncinatum* ont été plantés en 1988 et les premiers brûlés sont apparus en 1992. Les premiers ascocarpes ont été récoltés en 1995 et en 1996 un kilo de truffe a été récolté sur 800 m<sup>2</sup> soit 12,5 Kg/Hectare (Belloli et al., 1999).

**La blanquette (*T. borchii*), une autre truffe cultivée.**

*T. borchii* se trouve dans presque toute l'Europe : du Nord (Angleterre, Danemark) au Sud (Italie), mais aussi à l'Est (Pologne, Hongrie). La

blanquette, tout comme *T. magnatum*, est une truffe blanche, mais elle est moins connue. Toutefois, en Italie, entre Ferrara et Ravenna elle a une bonne renommée et elle est au menu de plusieurs restaurants, il existe même un festival qui lui est consacré. Cette truffe a plusieurs avantages : bonne compétitivité, large gamme d'hôtes, elle augmente la croissance de l'hôte plus que les autres espèces de truffes et de champignons ectomycorhiziens (Zambonelli et al., 2002) et elle présente une haute adaptabilité écologique. Donc, non seulement elle peut être cultivée pour la production de truffes, mais aussi pour sa capacité d'améliorer la croissance de l'hôte dans les programmes de re-forestation (Garbaye, 1991).

*T. borchii* est en fait l'espèce modèle pour les *Tuber* ceci est dû à sa croissance en culture pure relativement aisée, ce qui a permis l'obtention de mycorhizes *in vitro*, nous y reviendrons plus en détail dans le paragraphe 1.3.

Comme nous l'avons dit, il s'agit d'une truffe très compétitive. Des essais en pépinière ont montré que le seul champignon capable de rivaliser avec elle était *Hebeloma sinapizans* (Zambonelli et Branzanti, 1990). Cependant il semble que dans la nature, *H. sinapizans* soit moins compétitif envers *T. borchii* (Zambonelli et al., 2002). Dans une truffière expérimentale italienne plantée en 1985, les premiers ascocarpes sont apparus après cinq ans et après seulement quatre ans dans une autre plantée en 1990 à Marina di Ravenna (Italie).

**En revanche, la culture de *T. magnatum* n'est pas encore bien maîtrisée**

*T. magnatum* étant la truffe qui présente la plus forte valeur économique, il est donc facile de comprendre pourquoi sa culture est une des priorités actuelles du monde de la trufficulture. Contrairement à *T. borchii*, il est beaucoup plus difficile de travailler avec *T. magnatum*, car les cultures pures de ce champignon sont encore impossibles. De plus, durant longtemps, les mycorhizes de *T. magnatum* ont été confondues avec celles de *T. borchii* et de *T. maculatum* (Mello et al., 2001; Rubini et al., 2001). Ceci a entraîné la plantation d'arbres mycorhizés avec la mauvaise espèce. C'est pourquoi, la plupart des truffières expérimentales produisent *T. borchii* ou *T. maculatum* et non *T. magnatum*. Ceci est d'autant plus vrai qu'il n'existe pas de législation italienne sur la vente des plants mycorhizés. Une autre explication de ces problèmes de contaminations par d'autres espèces, pourrait être une plus faible compétitivité de *T. magnatum* par rapport aux autres espèces de *Tuber* (Mello et al., 2001; Rubini et al., 2001).

Toutefois, quelques truffières « idéales » ont vu la production de *T. magnatum*, mais il s'agit de cas isolés. Je citerai l'exemple d'un trufficulteur qui a récolté en 2002, 7 Kg de *T. magnatum* dans une truffière artificielle près d'Asti (Le trufficulteur français n°46, p16). Malgré ces quelques succès, il est nécessaire de mieux connaître l'écologie de cette truffe et d'améliorer les techniques culturales. Par exemple, à ma connaissance, seulement une publication a rapporté l'identification de mycorhizes de *T. magnatum* dans une truffière naturelle (Urbanelli et al., 1998b).

**Dans ce paragraphe, nous avons vu comment les truffes et la trufficulture sont étroitement liées à l'homme et à la société humaine, principalement en France, en Italie et en Espagne. Parmi les principaux intérêts de la production de truffes, nous avons identifié des intérêts gastronomique et culturel, économique, humain, écologique et de développement rural. L'écologie de ces champignons est de mieux en mieux connue, ce qui a conduit, avec plus ou moins de succès, à la culture de certaines truffes (*T. melanosporum*, *T. uncinatum* et *T. borchii*). Mais pour le moment la culture de *T. magnatum* est encore mal maîtrisée. Malgré ces succès, la réalisation de truffières expérimentales est encore aléatoire car il existe de nombreux problèmes : compétition entre la truffe et les autres champignons ectomycorhiziens, qualités des plants inoculés, bonnes techniques culturales pour les truffières, fraude...**

**Il reste à mieux connaître l'interaction entre les truffes et les micro-organismes présents dans le sol des truffières (bactéries, champignons et levures) afin d'augmenter le rendement des plantations, mais aussi de cultiver avec succès les espèces pour lesquelles nous rencontrons des problèmes.**

**Dans la troisième partie de l'introduction, nous allons voir plus en détail la biologie des truffes, nous ferons une mise au point des connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires qui régulent les différentes phases du cycle biologique des *Tuber*.**

## 1.3. Biologie des truffes

Le cycle biologique des *Tuber* n'est pas bien connu. Cependant, en se basant sur les données disponibles chez les autres Ascomycètes comme *Pyronema confluens* (Glass et Staben, 1990), *Neurospora crassa* (Glass et Kuldau, 1992) et *Podospora ssp* (Robert, 1995) ; Lanfranco et al. (1995) ont proposé un cycle vital probable pour les truffes (Figure 5). Ce cycle comporte trois phases : une phase saprotrophique, une phase symbiotique et une phase reproductive. Toutefois, il reste de nombreuses questions sur la biologie des truffes :

- (i) *Comment se forme et se développe l'ascocarpe ?*
- (ii) *Lors de la phase saprotrophique, quelle est la distribution du mycélium dans le sol des truffières ?*
- (iii) *Quelles sont les voies métaboliques et les gènes exprimés lors de chaque phase ?*
- (iv) *Quels sont les facteurs qui déclenchent les changements de phases ?*

Dans ce paragraphe, nous allons essayer de répondre à ces interrogations. Je donnerai une vue d'ensemble, mais sûrement non exhaustive, des études morphologiques, biochimiques et moléculaires, réalisées chez les *Tuber* concernant les différentes phases du cycle biologique. Nous commencerons par la phase saprotrophique, puis nous verrons successivement la phase symbiotique et la phase reproductive.

### 1.3.1 La phase saprotrophique

Cette phase commence par la germination des spores dans le sol. Ensuite, les hyphes se développent jusqu'au contact des racines pour, ainsi, entrer en phase symbiotique. Pour le moment nous ne savons pas comment se nourrit le mycélium dans le sol, en revanche nous savons qu'il a des capacités saprotrophiques *in vitro*.

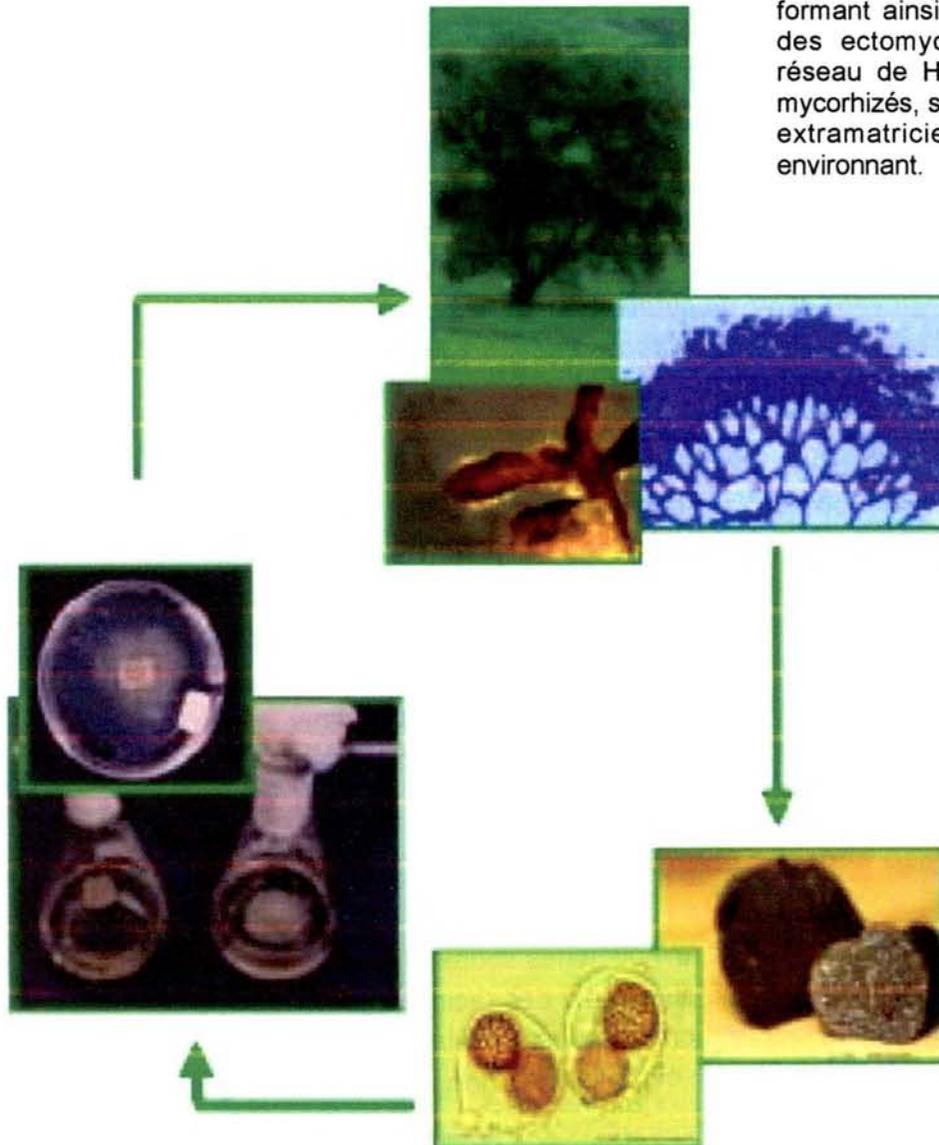
*Mais que se passe-t-il lors de la phase saprotrophique?*

#### **1.3.1.1 Le mycélium colonise-t-il un vaste espace ou est-il confiné aux alentours des racines ?**

En fait, la propagation du mycélium peut être limitée par différents facteurs comme : (i) la compétition entre espèces (Wu et al., 1999), (ii) les phénomènes d'incompatibilité somatique entre individus de la même espèce (Prospero et al., 2003), (iii) les changements de conditions physico-chimiques du milieu environnant (Buscot et al., 2000), (iv) mais aussi et

surtout, en tant qu'hétérotrophe, par la présence ou l'absence de substrats (Dickie et al., 2002 ; Landeweert et al., 2003).

Lors de la *phase symbiotique*, le mycélium prend contact avec les racines de la plante et les colonise, formant ainsi les structures typiques des ectomycorhizes : manteau et réseau de Hartig. Autour des apex mycorhizés, se développe le mycélium extramatriciel qui explore le sol environnant.



La *phase saprotrophique* est caractérisée par la germination des spores dans le sol et le développement du mycélium. Celui-ci pourrait former soit le primordium fructifère, soit les mycorhizes.

La *phase reproductive* commence par l'agrégation de deux hyphes pour donner l'ascocarpe. Mais ces deux mycéliums sont-ils identiques (autogamie) ou bien différents ? Pour le moment, nous ne savons pas si les truffes sont hétérothalliques ou homothalliques. Durant cette phase se produit la caryogamie et la formation des ascospores.

**Figure 5.** Cycle biologique des *Tuber* (d'après Lanfranco et al., 1995 ; Miozzi, 2003).

Pour connaître la distribution du mycélium dans le sol, il existe diverses techniques. La plus simple consiste à prélever directement le mycélium. Mais ceci n'est possible que pour les espèces formant des rhizomorphes ou des cordons, ce qui n'est pas le cas des truffes. L'isolement de mycélium en utilisant des milieux de cultures artificiels est une autre possibilité (Thorn et al., 1996 ; Prospero et al., 2003). Malheureusement, les truffes sont difficiles à cultiver *in vitro* et il est même impossible de cultiver certaines espèces comme *T. magnatum* (cf. § 1.3.1.2). Donc, la seule solution est de réaliser des extractions d'ADN directement à partir du sol. Cette technique a permis l'identification et la quantification du mycélium d'un champignon ectomycorhizien : *Hebeloma cylindrosporum* (Guidot et al., 2002 et 2004 ; cf. §1.4.1.2). A ma connaissance, de telles analyses n'ont pas encore été réalisées chez les truffes.

*Donc, pour le moment, la répartition du mycélium des truffes dans les truffières est encore inconnue.*

### **1.3.1.2 Réalisation de la phase saprotrophique *in vitro***

Les *Tuber* ne sont pas des symbiontes obligatoires, car il est possible de les isoler et de les faire pousser en boîtes de Petri *in vitro*. Actuellement, le mycélium *in vitro* de plusieurs espèces est disponible: *T. borchii*, *T. maculatum*, *T. melanosporum*, *T. aestivum*, *T. macrosporum*, *T. rufum* et *T. brumale* (Saltarelli et al., 1998 ; Iotti et al., 2002). En revanche, la culture d'autres espèces, comme *T. magnatum*, reste encore impossible.

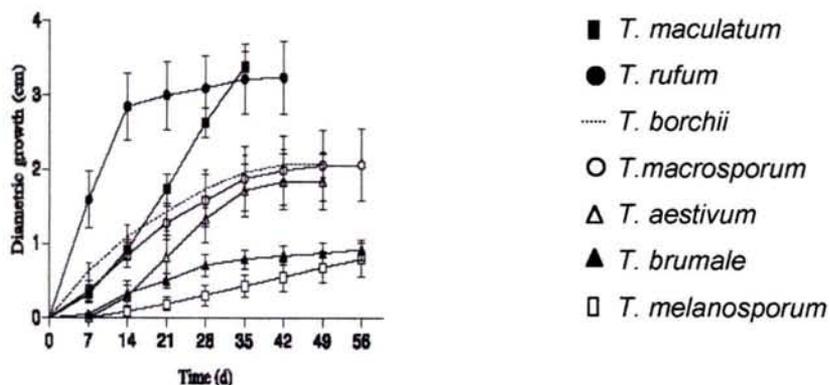
### **Quelle est la dynamique de croissance du mycélium de *Tuber* ?**

Pour *T. borchii*, le profil de croissance est composé d'une phase de latence (*lag phase*), d'environ 15 jours, suivie d'une phase exponentielle de croissance jusqu'à environ 60 jours. Ensuite, elle rejoint un plateau (Figure 6; Saltarelli et al., 1998 et 1999 ; Iotti et al., 2002). En fait, toutes les espèces de truffes présentent le même type de croissance, avec une phase de latence allant de 3 jours (*T. rufum*) à 10 jours (*T. melanosporum*) (Figure 6; Iotti et al., 2002).

Durant la phase exponentielle de croissance, *T. rufum* est l'espèce qui croît la plus vite (14 mm/semaines) alors que *T. maculatum* (7 mm/semaines), *T. macrosporum* (4 mm/semaines), *T. borchii* (4 mm/semaines), *T. aestivum* (4 mm/semaines), *T. brumale* (1,9 mm/semaines), et *T. melanosporum* (1,1 mm/semaines) sont plus lentes (Iotti et al., 2002). Donc, pour la majorité des espèces, la croissance des mycéliums *in vitro* est lente. En fait, Saltarelli et al. (1999) ont montré que la vitesse de croissance dépend de la souche isolée. En effet, l'analyse de 4 souches différentes de *T. borchii* montre que toutes présentent une

phase de latence de 15 jours, mais après cette phase, la souche 1BO a une croissance exponentielle alors que les trois autres souches ont une croissance linéaire.

Ceci indique que des facteurs génétiques influencent la croissance des *Tuber in vitro*.



**Figure 6.** Courbes de croissances de quelques espèces de *Tuber* (d'après Iotti et al., 2002)

### 1.3.1.3 Quelles sont les voies métaboliques et les gènes exprimés lors de la phase saprotrophique ?

La réalisation de cultures mycéliennes *in vitro* a été le point de départ de nombreuses études ayant pour but de décrypter les voies métaboliques mises en œuvre par le mycélium lors de sa croissance, ainsi que l'expression génique en réponse à divers facteurs.

#### Quelle est l'activité métabolique et transcriptionnelle du mycélium ?

Zeppa et al. (2001) ont analysé l'activité métabolique et transcriptionnelle du mycélium de *T. borchii* pour évaluer les différences physiologiques intervenant lors de la phase saprotrophique. La mesure de la quantité totale d'ARN, par poids sec de mycélium, indique un maximum d'activité aux alentours de 30 jours ( $2,24 \pm 0,32 \mu\text{g mg}^{-1}$ ), ce qui est confirmé par le contenu en ergostérol, qui est un bon indicateur de l'activité métabolique. Après 70 jours, le taux d'ARN ( $0,90 \pm 0,2 \mu\text{g mg}^{-1}$ ) et d'ergostérol diminue fortement. Ces mêmes auteurs montrent que si le taux d'ARN change, la composition en ARN ne semble pas changer. Il n'y aurait donc pas de modifications transcriptionnelles lors de la croissance de *T. borchii in vitro*.

De même, l'analyse d'un gène probablement impliqué dans la division des mitochondries (*Tbfs1*), indique que son expression est plus importante

dans du mycélium de 30 jours que dans du mycélium âgé (Guidi et al., 2003). Ceci est corrélé avec un plus grand nombre de mitochondries suggérant une plus grande activité.

*Le thalle de T. borchii atteint donc un pic d'activité aux alentours de 30 jours, ensuite son métabolisme diminue.*

***Un autre facteur qui influence la croissance des hyphes lors de la phase saprotrophique est la lumière.***

En effet, le mycélium de *T. borchii* a une croissance apicale limitée lorsqu'il est exposé à la lumière bleue (Ambra et al., 2004). Une réponse similaire, dépendante d'un récepteur (WC-1), est connue chez *Neurospora crassa* (He et al., 2002). Un homologue à WC1, comprenant un domaine photorecepteur (LOV), a été cloné chez *T. borchii* (*Tbbwc-1*). L'ARNm de ce gène augmente lors d'une exposition à la lumière (Ambra et al., 2004).

*Mais comment expliquer la présence d'un photorécepteur chez un organisme hypogé ?*

Ambra et al. (2004) suggèrent que ce photorécepteur pourrait prévenir la croissance du mycélium vers l'extérieur et donc l'obliger à rester dans le sol, pour ainsi faciliter sa rencontre avec les racines. Ceci explique que les cultures de *Tuber in vitro* se fassent à l'obscurité (Iotti et al., 2002).

***Quelles sont les sources de carbone que peut utiliser le mycélium de truffe pour croître ?***

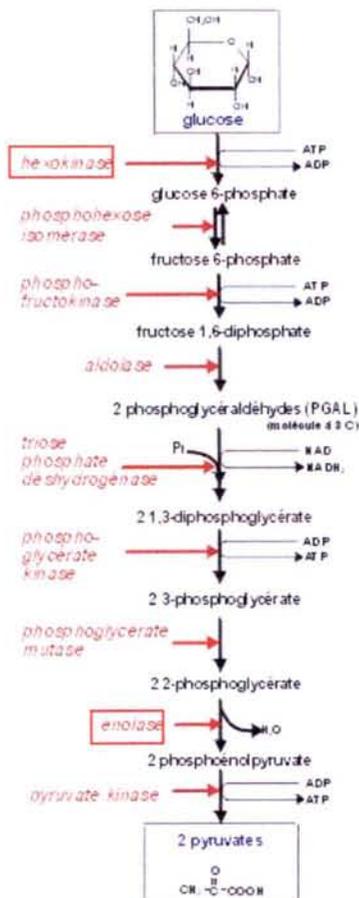
Le mycélium de *T. borchii* peut utiliser le glucose et le fructose (Saltarelli et al., 1998), contrairement à plusieurs autres champignons qui préfèrent le glucose au fructose (Lewis, 1986). Mais *T. borchii* utilise aussi le mannitol et le mannose, ce dernier étant la source carbonée avec laquelle le mycélium a une plus forte croissance (Ceccaroli et al., 2001). *T. melanosporum* peut, quant à lui, utiliser le mannose et le saccharose (Mamoun et Olivier, 1991), ce dernier n'étant pas utilisé par *T. borchii* (Saltarelli et al., 1998). En ce qui concerne les autres espèces : *T. maculatum*, *T. aestivum*, *T. macrosporum*, *T. rufum* et *T. brumale* ; elles ont été isolées sur des milieux de culture riches en saccharose (Iotti et al., 2002).

***Quelles sont les voies métaboliques du carbone actives chez le mycélium de truffes lors de la phase saprotrophique ?***

Plusieurs études se sont focalisées sur le métabolisme du carbone chez *T. borchii*. Saltarelli et al. (1998) ont quantifié diverses enzymes de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates. Ces auteurs montrent que le mycélium atteint un pic d'activité aux alentours de 30 jours, comme nous l'avons déjà dit précédemment. Après 70 jours, les enzymes de la glycolyse diminuent, ce qui n'est pas le cas de celles de la voie des pentoses phosphates.

Plusieurs enzymes du métabolisme primaire carboné sont actuellement isolées et caractérisées. Ceccaroli et al. (1999) ont identifié trois formes distinctes d'hexokinase ( $HK_{M1}$ ,  $HK_{M2}$  et  $HK_{M3}$ ), qui est la première enzyme de la glycolyse (Figure 8).  $HK_{M1}$  et  $HK_{M2}$  sont présentes pendant la phase de croissance du mycélium, entre 15 et 50 jours, alors qu' $HK_{M3}$  n'est exprimée que dans le mycélium plus âgé. Plus récemment, Agostini et al. (2001) ont isolé et caractérisé le gène *hvk-1* codant pour un polypeptide de 497 acides aminés et correspondant à l'isoforme  $HK_{M1}$ . En fait, l'expression des hexokinases est très régulée et elles contrôlent l'expression génique, en réponse aux modifications de la concentration en sucres, chez beaucoup d'organismes et, entre autres, chez les truffes (Agostini et al., 2001).

Un autre gène, *eno-1*, codant pour une énoïase (Figure 7), a aussi été caractérisé (Polidori et al., 2004). L'activité maximale de cette enzyme est observée pour des mycéliums âgés de 18 jusqu'à 30-40 jours, ce qui correspond aux résultats trouvés pour les hexokinases.



Chez le mycélium de *T. borchii in vitro*, la glycolyse et la voie des pentoses phosphates sont donc actives. Alors que cette dernière est toujours active dans le mycélium âgé, la glycolyse l'est surtout lors de la phase exponentielle de croissance.

**Figure 7.** Schéma de la glycolyse. En rouge sont indiquées les enzymes intervenant dans cette voie métabolique et celles qui ont été isolées chez *Tuber* sont encadrées.

Afin de caractériser l'assimilation du glucose et la biosynthèse des acides aminés, Ceccaroli et al. (2003) ont utilisé la résonance magnétique nucléaire et du [ $^{13}\text{C}$ ]-glucose. Ces auteurs montrent que l'assimilation de [ $^{13}\text{C}$ ]-glucose par du mycélium *in vitro* conduit à la production de mannitol. Ce dernier jouerait un rôle de réserve, mais serait aussi utilisé comme source de carbone alimentant le cycle de Krebs et la biosynthèse d'acides aminés.

### **Qu'en est-t-il pour l'assimilation de l'azote?**

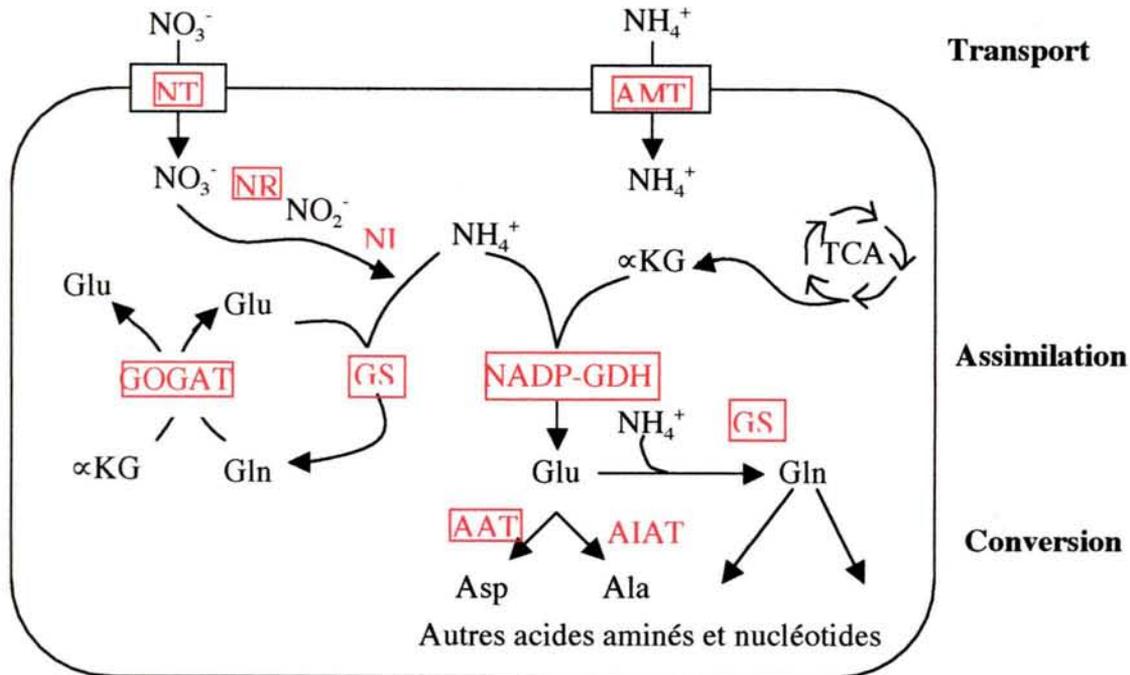
Le métabolisme azoté est aussi très important pour la biochimie des micro-organismes, puisqu'il est indispensable, entre autres, à la biosynthèse d'acides aminés, de purines, de pyrimidines et de protéines (Figure 8 ; Javelle et al., 2003). Pour les champignons ectomycorrhiziens, des transporteurs de l'ammonium ont été identifiés chez *Hebeloma cylindrosporum* (Javelle et al., 2001 et 2003) et chez *T. borchii* (*TbAMT1*) (Figure 8 ; Montanini et al., 2002). Ce dernier code pour un polypeptide de 52 KDa et permet la complémentation d'une souche de levure déficiente pour l'assimilation de l'ammonium, prouvant ainsi sa fonctionnalité.

Les produits primaires de l'assimilation de l'azote par les champignons ectomycorrhiziens sont le glutamate (Glu) et la glutamine (Gln) (Botton et Chalot, 1999). Ces acides aminés sont synthétisés par plusieurs enzymes : glutamine synthétase (GS), glutamate synthase (GOGAT) et glutamate déshydrogénase (GDH) (Figure 9). Chez le mycélium de *T. borchii*, des activités GS et NADPH-GDH ont été détectées (Pierleoni et al., 2001). Afin de mieux comprendre le métabolisme azoté, Vallorani et al. (2002) ont caractérisé un gène, *gdh*, codant pour une NADP-GDH. Ce gène a une régulation transcriptionnelle, puisqu'il est moins exprimé (10 à 12 fois) lorsque la source d'azote est l'ammonium plutôt que le glutamate, l'urée, le nitrate ou l'alanine. Guescini et al. (2003) ont, quant à eux, caractérisé un gène codant pour une nitrate réductase (*tbnr1*). Ces auteurs montrent que le mycélium, mis en culture avec du nitrate comme seule source d'azote, a un niveau d'expression de *tbnr1* 10 à 12 fois supérieur à du mycélium en culture avec du phosphate d'ammonium, du nitrate d'ammonium, de l'urée ou de la glutamine.

*Ces études indiquent que le type de source d'azote est important car il régule l'expression des gènes du métabolisme azoté.*

De même, une carence azotée, de deux à trois semaines, induit aussi une régulation des gènes du métabolisme de l'azote, mais, dans ce cas, il existe trois types de réponses (Montanini et al., 2002, 2003 ; Montanini, 2003):

- 1- Les gènes *Tbam1*, *Tbnt* et *Tbgs* sont induits par la carence azotée.
- 2- Les niveaux d'ARNm de *Tbgdh* et *Tbaat* diminuent.



**Figure 8.** Voies d'assimilation de l'azote inorganique chez les champignons (d'après Montanini, 2003).

Sur le schéma sont indiqués les transporteurs (AMT : transporteur de l'ammonium ; NT : transporteur du nitrate), les enzymes du catabolisme du nitrate (NR : nitrate réductase ; NI : nitrite réductase), les enzymes d'incorporation de l'ammonium (GOGAT : glutamate synthase ; GS : glutamine synthétase ; GDH : glutamate déshydrogénase) et de conversion en autres acides aminés (AAT : aspartate aminotransférase ; AIAT : alanine aminotransférase).  $\text{NH}_4^+$  : ammonium ;  $\text{NO}_3^-$  : nitrate ; TCA : cycle de l'acide tricarboxylique ; Gln : glutamine ; Asp : aspartate ; Ala : alanine ;  $\alpha\text{KG}$  :  $\alpha$ -cétoglutarate. Les enzymes caractérisées chez *Tuber* sont encadrées.

### 3- L'expression de *Tbgogat* ne change pas.

Il est intéressant de noter que la GS, enzyme fortement régulée par la carence azotée, est aussi très exprimée dans l'ascocarpe (cf. §1.3.3.4 ; Lacourt et al., 2002).

L'étude du transcriptome à l'aide de réseaux d'ADNc, comportant plus de 1200 gènes de *T. borchii* (Lacourt et al., 2002), à partir de sondes provenant de mycélium soumis à une carence azotée de courte durée (2 à 120 heures), montre que seul *Tbnt* est significativement modifié dans ces conditions (Montanini, 2003). En fait, les réponses à ce type de carence concernent principalement des protéines de surface et sécrétées, conduisant à la modification de la paroi cellulaire. Parmi ces protéines se trouve *Tbsp1*, nous en reparlerons un peu plus tard (Soragni et al., 2001 ; Lacourt et al., 2002 ; Montanini, 2003).

*Donc, la disponibilité en azote régule aussi l'expression de plusieurs gènes du métabolisme azoté.*

### **Quels sont les autres gènes importants exprimés lors de la phase saprotrophique?**

Balestrini et al. (2000) ont montré que les chitines synthases (*Chs*) de classe II, III et IV sont exprimées dans le mycélium de *T. borchii*. Cette expression est indépendante de l'âge des hyphes. Étant donné que ces enzymes sont à l'origine de la formation de la chitine, elles devraient avoir un rôle dans la structure de la paroi cellulaire. Comme nous le verrons dans le paragraphe 1.3.3, les gènes de la *Chs* de *T. borchii* et de *T. magnatum* sont aussi exprimés dans l'ascocarpe (Balestrini et al., 2000 ; Garnerio et al., 2000).

Pour avoir des informations sur le protéome de *T. borchii*, Vallorani et al. (2000) ont réalisé une analyse en électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE) des protéines sur du mycélium de 30 jours. Sur les 23 spots analysés, un seul, correspondant à une ubiquitine, a été identifié. En fait, Zeppa et al. (2001) ont cloné un gène (*Ubi1*) correspondant à une polyubiquitine. Ce gène est exprimé chez le mycélium de *T. borchii*, alors qu'il l'est moins dans l'ascocarpe et l'ectomycorhize. Ces auteurs suggèrent que l'ARN d'*Ubi1* s'accumule préférentiellement dans les cellules qui se répliquent. En fait, les ubiquitines sont importantes car elles jouent un rôle dans la dégradation des protéines, la réponse au choc thermique, le cycle cellulaire, la mort cellulaire programmée et la différenciation (Bond et Schlesinger, 1985).

Enfin, une étude portant sur l'analyse d'une banque d'ADNc, chez le mycélium de *T. borchii*, mais aussi chez l'ascocarpe, montre que 22% des gènes exprimés dans le mycélium codent pour des enzymes du métabolisme primaire et secondaire (par exemple : phosphofructochinase, aldolase, citrate synthase, GS, Isocitrate lyase) (Lacourt et al., 2002). Les transcrits impliqués dans la réponse aux stress (10%), dans la signalisation cellulaire (7%) et dans la structure cellulaire représentent une plus petite partie des ADNc séquencés. Ces auteurs ont trouvé 16 gènes semblant spécifiques de la phase saprotrophique, malheureusement ils correspondent principalement à des protéines inconnues, leur fonction n'a donc pas encore été identifiée.

**En conclusion de cette partie sur la phase saprotrophique du cycle biologique des *Tuber*, nous pouvons dire que cette phase est encore presque totalement inconnue *in situ*, par contre, elle est de plus en plus étudiée *in vitro*. Les voies métaboliques du carbone et de l'azote sont en partie décryptées et plusieurs gènes, codant pour des enzymes de ces voies métaboliques, sont caractérisés. Toutefois, ces données ne sont accessibles que pour *T. borchii*, et nous pouvons nous demander si les mêmes mécanismes se retrouvent chez les autres espèces de *Tuber*.**

### 1.3.2 La phase symbiotique

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, les hyphes se développent dans le sol jusqu'au contact des racines pour ainsi entrer en phase symbiotique. En fait, les symbioses entre les champignons et les plantes s'appellent des mycorhizes (Tableau 6 ; Figure 9).

#### 1.3.2.1 Généralités sur les mycorhizes

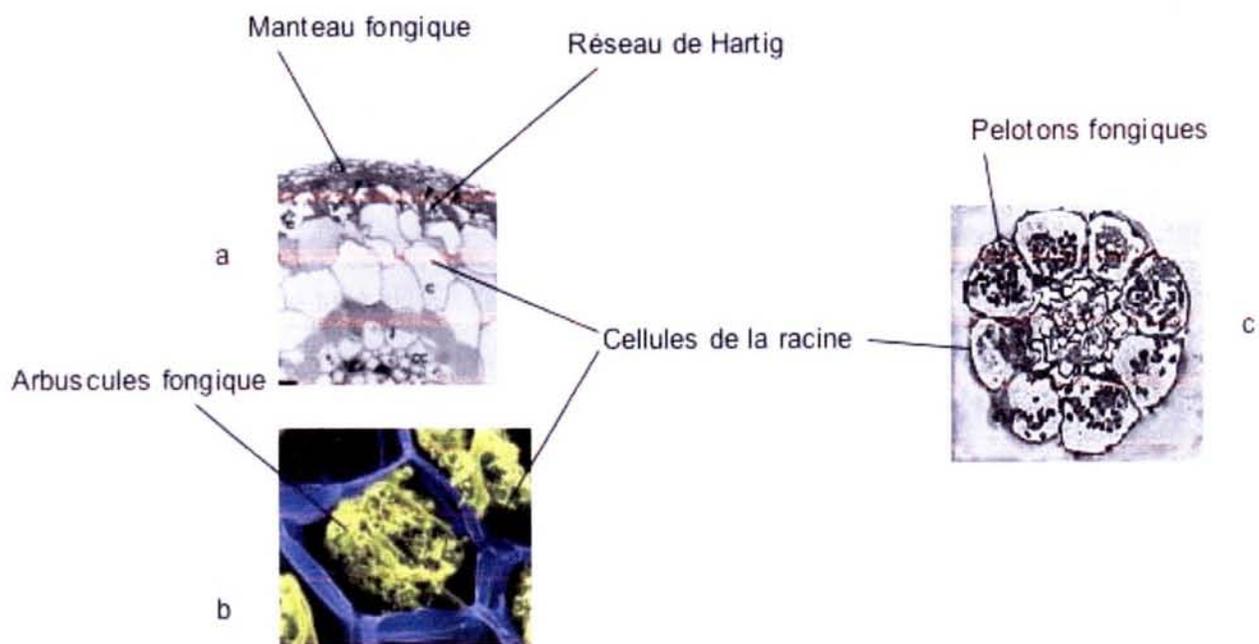
##### **Que sont les mycorhizes ?**

Les champignons sont des organismes hétérotrophes, ils ont donc dû, au cours de l'évolution, développer différentes stratégies pour se procurer du carbone. Ils peuvent être saprotrophytes, endophytes, parasites ou symbiotiques. Parmi les symbioses mutualistes, un grand nombre ont lieu entre les champignons et les plantes, formant des organes appelés mycorhizes (Gr. *Mykes*=champignon ; *Rhyza*=racine). Les mycorhizes ont été décrites pour la première fois en 1885 par Frank, qui avait observé au niveau des racines des arbres une structure anatomique et morphologique dans laquelle étaient impliqués des *mycelia* fongiques. Ce n'est qu'en 1950 que les observations de Frank ont été confirmées par Melin et Nilsson. Les mycorhizes constituent une association symbiotique bénéfique aux deux partenaires. Le végétal profite des capacités exploratrices du champignon qui, quant à lui, profite de la phototrophie de la plante. Au total, 95 % des végétaux forment des symbioses mycorhiziennes (Malloch et al., 1980).

Il existe plusieurs types de mycorhizes. Les plus anciennes, les endomycorhizes arbusculaires (Figure 9 et Tableau 6), sont apparues avec les premières plantes terrestres il y a environ 300 millions d'années (Le Tacon & Selosse, 1994). Elles sont parfaitement adaptées aux climats chauds et aux écosystèmes terrestres à minéralisation rapide existant jusqu'à la fin de l'ère Secondaire. Ce type d'association, qui concerne 200 à 500 espèces, reste le plus répandu. Les changements de climats, dont une baisse de température, ont provoqué la formation, dès le Tertiaire, d'un deuxième type de mycorhizes, l'ectomycorhize (Figure 9 et Tableau 6 ; LePage et al., 1997), impliquant plus de 5000 espèces fongiques Basidiomycètes ou Ascomycètes (Molina et al., 1992). Cette association est dominante dans les écosystèmes forestiers tempérés sous latitude et longitude intermédiaires. Les autres types de mycorhizes décrits sont les endomycorhizes à pelotons éricoïdes et orchidées, et les ectendomycorhizes (Figure 9 et Tableau 6). Ces types ne concernent que peu d'espèces de champignons et ils sont encore mal connus.

**Tableau 6.** Caractéristiques sommaires des principaux types de mycorhizes (d'après Selosse, 1998).

| Type morphologique                      | Endomycorhize "-arbusculaire"   | Ectomycorhizes   | Ectendomycorhizes  | Endomycorhizes "à pelotons"  |  |
|---|---|--|--|--|--|
|   |   |  |  | Ericacées  | Orchidées                              |
| Photobionte                             | Plus de 80 % des spermatophytes et la plupart des Ptéridophytes                               | Spermatophytes ligneuses et de très rares Ptéridophytes  | Spermatophytes (certains ligneux, certaines Ericales)  | Spermatophytes et certaines Ptéridophytes  |  |
| Mycobionte                              | Non Septés  |  | Septés   |  |  |
|   | Glomales (Zygomycètes) 200 à 500 espèces  | Ascomycètes et Basidiomycètes, 5000 espèces au moins   | Quelques espèces d'Ascomycètes et Basidiomycètes   | Ascomycètes  | Moins de 100 espèces de basidiomycètes |
| Structure fongique                      | Vésicules seulement ou vésicules et arbuscules (suçoirs ramifiés intracellulaire)             | Manteau fongique autour de la racine et réseau de Hartig cortical, strictement extracellulaire | Manteau plus ou moins épais, réseau de Hartig et suçoir (Monotropoïdes) ou peloton (Arbutoïdes) intracellulaires (variable)    | Hyphes et pelotons intracellulaire   |  |
| Spécificité d'hôte                      | aucune  | Nulle à forte selon le couple  | ?  |  |  |
| Ancienneté                              | Ordovicien  |  | Crétacé (ou plus tardif?)  |  |  |
| Ressources exploitées par le mycobionte | Phosphore inorganique: soluble ou adsorbé; oligoéléments                                      | Phosphore et azote organiques ou minéraux: solubles, adsorbés ou insolubles; oligoéléments     | Mal connues et variables selon le type; le mycobionte peut être parasite ou mutualiste d'en autre végétal ( <i>Monotropa</i> ) | Phosphore et azote organique, parfois glucides insolubles (cellulose,...)  |  |
| Localisation majeure                    | Tous les sols, sauf sols hydromorphes: sols tropicaux et tempérés; peu fréquent en sol boréal | Divers sols, dont ceux moyennement minéralisés: sols tempérés et boréaux, parfois tropicaux    |  | Sols à matière organique non minéralisée: sols boréaux et d'altitude surtout, les orchidées sont plus ubiquistes |  |



**Figure 9.** Anatomie microscopique de quelques types de mycorhizes : (a) ectomycorhize, (b) endomycorhize arbusculaire ; (c) endomycorhize à pelotons ericoïde.

### **Quel peut-être le rôle des mycorhizes dans les écosystèmes ?**

Dans les forêts, il existe des interactions plante-plante influençant les processus basiques comme la croissance, mais aussi la reproduction. D'autre part, ces mêmes plantes sont associées à des champignons. Donc, étudier l'effet des champignons mycorhiziens sur les populations de plantes présente des intérêts considérables pour les écologistes, les évolutionnistes et les agronomes. En fait, il est bien connu que les champignons mycorhiziens favorisent la croissance (Smith et Read, 1997) et la reproduction des plantes (Koide, 2000).

Il ne faut pas imaginer qu'un individu fongique ne soit associé qu'à un arbre, la situation est beaucoup plus complexe. En effet, les arbres sont reliés grâce au mycélium fongique, constituant ainsi un réseau : « *wood-wide web* » (Helgason et al., 1998). Ces réseaux mycéliens (*Common mycorrhizal networks* – CMNs), liant les racines compatibles des plantes de la même espèce ou d'espèces différentes, ont été identifiés comme médiateur potentiel de la compétition pour la lumière et pour les nutriments (Read, 1997).

En 1987, Grime et al. suggèrent que les plantes herbacées reliées par les CMNs formés par des champignons endomycorhiziens arbusculaires (AMF) permettent le transfert de carbone (C) de plantes « donneuses » vers des plantes « receveuses » en laboratoire. Simard et al. (1997) ont été les premiers à suggérer que ces transferts sont aussi vrais pour les champignons ectomycorhiziens (ECM). En fait, les CMNs sont courants entre les arbres de la canopée et les plantes du sous-bois qui n'ont pas accès à la lumière (Horton et Bruns, 1998 ; Kennedy et al., 2003). Les CMNs redistribueraient donc les ressources dans les communautés végétales et compenseraient les compétitions interspécifiques, en permettant des flux de C et de nutriments à travers un gradient, des plantes riches en ressources vers les plantes plus pauvres (Booth, 2004). Toutefois, un tel phénomène devrait entraîner une homogénéisation des arbres dans les forêts, mais il ne semble pas que ce soit le cas (Koide et Dickie, 2002). En fait, les flux de C entre plantes via les CMNs sont encore très discutés (Robinson et Fitter, 1999).

Nous avons vu que les CMNs joueraient un rôle important dans la coexistence des espèces végétales par les flux de nutriments qui peuvent exister entre plantes. Mais, ils contribuent aussi au maintien de la communauté végétale, ainsi qu'à sa structure après une perturbation, mais aussi dans les forêts plus âgées (Kennedy et al., 2003). En plus d'avoir un rôle dans l'alimentation minérale du végétal, les mycorhizes, et entre autres les ECM, protègent également la racine hôte contre diverses agressions (Selosse, 1998). Le manteau a un rôle d'écran contre les micro-organismes du sol, mais aussi des interactions plus complexes dans la rhizosphère amènent une modification locale de la microflore (Frey et al., 1997). D'autre

part, la plante hôte accumule des composés antibiotiques en réponse à la mycorhization (Weiss et al., 1997). Enfin, les mycorhizes protègent l'hôte contre les agressions physico-chimiques : tolérance au calcaire (Chevalier et Frochot, 1997), tolérance aux métaux lourds (Leyval et al., 1997), tolérance au stress hydrique (Guelh et al., 1992).

*Pour conclure, les populations possèdent des propriétés différentes de celles des individus isolées. Donc, pour connaître l'effet des champignons mycorhiziens dans les forêts, il ne suffit pas d'additionner les effets qu'ils ont sur les individus pris individuellement. Etudier ces champignons dans des populations végétales très complexes est donc fondamental pour les écologistes, qui cherchent à comprendre leur rôle dans les écosystèmes, mais aussi pour les agronomes, qui veulent appliquer ces données à l'agriculture.*

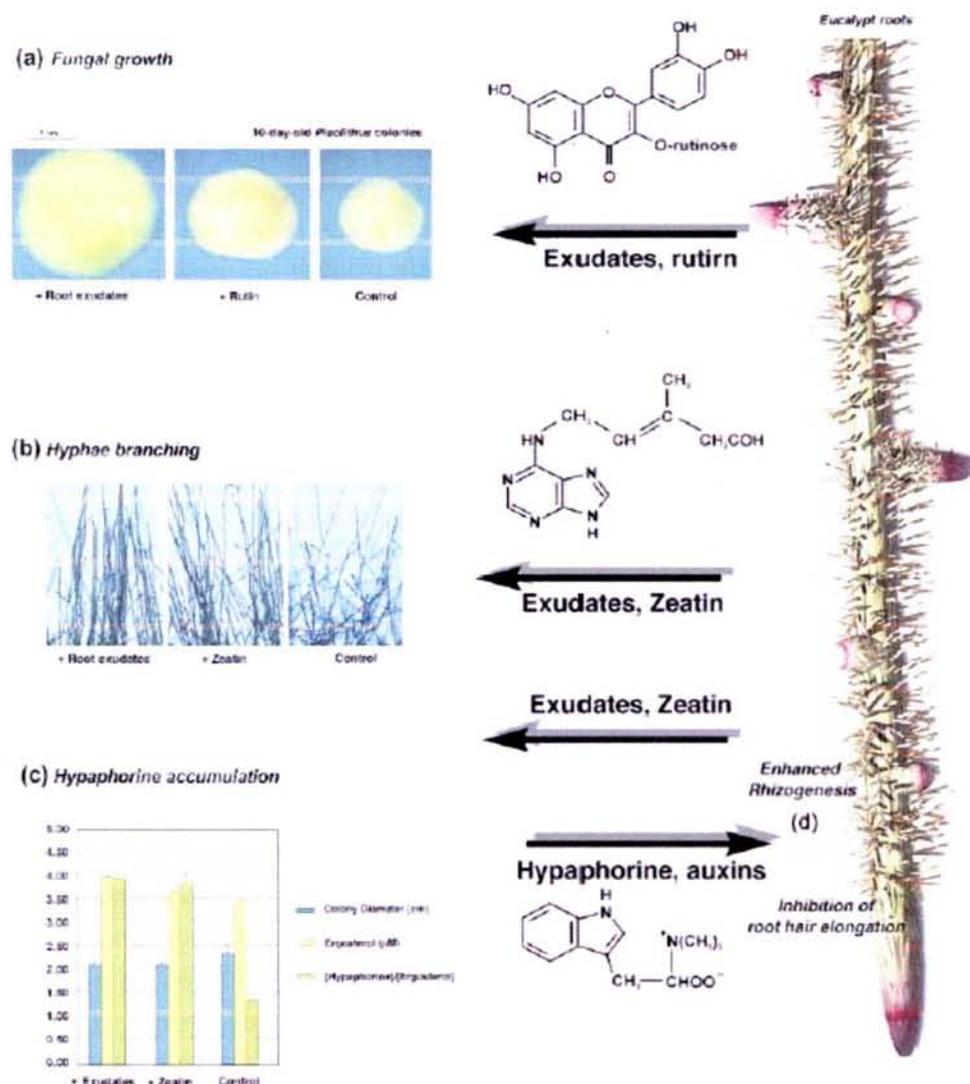
### **1.3.2.2 Les truffes, des champignons ectomycorhiziens**

Parmi les premières mycorhizes décrites par Frank (1885), certaines appartenaient à la truffe de Bourgogne (*Tuber uncinatum*). En fait, Frank, physiologiste végétal et forestier, a entrepris ses recherches à la demande du Service Forestier de la Prusse, afin de trouver un moyen d'augmenter la production de truffes dans le royaume. Il a observé que les vraies truffes (*Tuber uncinatum*) et les fausses (*Elaphomyces* sp.) ne se développaient qu'en étroite relation avec certains arbres (hêtres, charmes, chênes). Il en a conclu que « certaines essences forestières, en particuliers les Cupulifères, ne se nourrissaient pas dans le sol de manière indépendante, mais établissaient une symbiose avec un mycélium fongique qui affectait l'intégrité du système racinaire ; ce mycélium avait une fonction nourricière et assurait l'alimentation de l'arbre, à partir du sol » (Frank, 1885).

Dès le début du XX<sup>e</sup> siècle, Mattiolo étudie les mycorhizes de truffes, mais il faudra ensuite attendre 1962 pour que des chercheurs italiens de l'Institut de recherches sur les plantes ligneuses de Turin (Fassi et De Vecchi) décrivent pour la première fois avec exactitude les mycorhizes d'un *Tuber* : *T. maculatum*. Quelques années plus tard, Palenzona (1969) décrit les mycorhizes de trois truffes comestibles : *T. melanosporum*, *T. brumale* et *T. aestivum*. Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2.3.1, c'est dans les années 70 que les premiers plants mycorhizés en pépinière avec *T. melanosporum* ont été obtenus (Chevalier et Grente, 1979). A partir des années 70, les premières synthèses de mycorhizes en conditions contrôlées ont été obtenues (Palenzona et al., 1972 ; Chevalier, 1973). Des travaux plus récents ont permis la réalisation de mycorhizes *in vitro* de *T. borchii* avec *Tilia platyphyllos*, *Cistus incanus*, *Alnus cordata*, *Castanea sativa*, *Populus alba* et *Corylus sativa* (Sisti et al., 1998 ; Zambonelli et Branzanti, 1989, 1990 ; Miozzi, 2003).

### 1.3.2.3 Comment le mycélium reconnaît-il la racine et entre en phase symbiotique = phase pré-symbiotique?

La transition entre la phase saprotrophique et la phase symbiotique est en grande partie inconnue. Toutefois, nous savons qu'il existe des signaux environnementaux, mais aussi des signaux de la plante, qui sont perçus par le mycélium et qui induisent une cascade d'événements moléculaires (Figure 10 ; Martin et al., 2001). La phase de pré-contact provoque donc une série de changements physiologiques conduisant (i) à la reconnaissance des deux partenaires, (ii) à la colonisation de la racine et (iii) à la mise en place par le champignon de mécanismes de détoxification des substances sécrétées par la plante (Martin et al., 2001). Tous ces changements sont accompagnés par des modifications métaboliques très régulées, qui restent encore pour la plupart inconnues.



**Figure 10.** Echanges moléculaires intervenant dans la rhizosphère lors de la colonisation d'*Eucalyptus globulus* par *Pisolithus* (Martin et al., 2001). Les exsudats racinaires altèrent la morphologie du mycélium de *Pisolithus*. Ces changements morphologiques sont induits par le flavonol et la rutine qui stimulent la croissance fongique exprimée par le diamètre des colonies (a). Une faible concentration de Zéatine modifie l'angle d'insertion des hyphes (b) et l'accumulation de tryptophane, bétaïne et hypophorine (c). D'autre part, l'hypophorine et l'auxine sécrétées par *Pisolithus* induisent des changements morphologiques du système racinaire (par exemple l'arrêt de croissance des poils racinaires et stimulent la formation de racines courtes).

### **Mais quels sont les signaux permettant à la truffe de reconnaître la plante?**

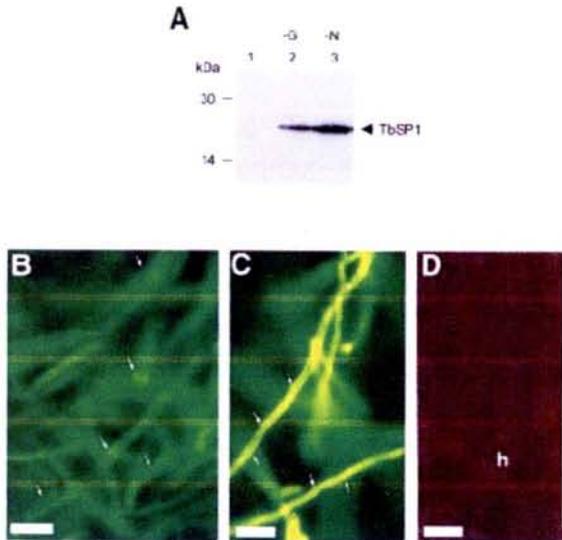
Lors de l'étude de la phase pré-symbiotique entre *T. borchii* et *Tilia platyphyllos*, Menotta et al. (2004b) ont identifié des composés volatiles spécifiques de cette phase, parmi lesquels des aldéhydes, des cétones, des alcools et des terpènes. De telles molécules, émises par les plantes, ont déjà été décrites comme favorisant la croissance d'*Aspergillus flavus* (Zéringue et McCormick, 1989). De même, Fries et al. (1987) ont rapporté l'effet chemotropique, des hyphes vers les racines de *Pinus sylvestris*, d'un terpène.

*Il est donc possible que ces composés volatils spécifiques aient un rôle similaire en dirigeant les hyphes des truffes vers les racines.*

Les sucres sont importants comme source d'énergie, mais aussi comme molécules de signalisation, cela a été montré chez les plantes supérieures (Jang et Sheen, 1997). En fait, une carence nutritionnelle pourrait signaler au mycélium de *Tuber* la présence de la plante, et fonctionner ainsi comme stimulus de la transition de la phase saprotrophique à la phase symbiotique (Soragni et al., 2001).

Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.3.1.3, les hexokinases sont régulées par la concentration en sucre. Etant donné qu'elles contrôlent l'expression génique, ces enzymes pourraient jouer un rôle important dans la reconnaissance de la racine et l'instauration de la symbiose. De même, l'analyse de l'expression génique d'un clone (VA51) ayant une forte homologie avec une  $\beta$ -glucosidase montre que son expression est régulée par la présence de glucose, mais aussi par la présence de la plante (Miozzi, 2003). Un rôle dans la perception de la plante hôte est suggéré pour cette enzyme.

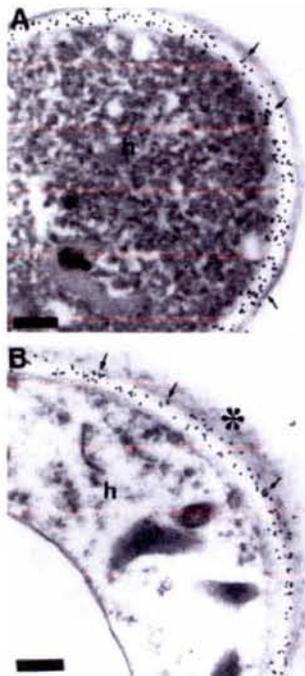
Enfin, Soragni et al. (2001) ont étudié l'expression et la localisation d'une phospholipase A2 (TbSP1). Cette enzyme s'est révélée être fortement surexprimée dans du mycélium de *T. borchii* en carence de carbone (80 fois) et d'azote (120 fois) (Figure 11). En revanche, ces auteurs n'ont pas mis en évidence d'effet sur cette protéine de la carence de phosphate. Etant donné que TbSP1 est accumulée au niveau de la paroi cellulaire (Figure 12), elle pourrait avoir un rôle dans les modifications pariétales intervenant lors de la formation de la symbiose (Bonfante et al., 1998). Ce rôle pourrait être direct, en hydrolysant les phospholipides, ou bien indirect, en inhibant certaines enzymes comme la (1-3)- $\beta$ -glucane synthase (Soragni et al., 2001). Il pourrait aussi s'agir d'une molécule de signalisation durant les premiers stades de colonisation de la plante (Soragni et al., 2001).



**Figure 11.** Accumulation de la protéine TbSP1 en condition de carence nutritionnelle dans le mycélium de *T. borchii* (Soragni et al., 2001).

(A) Analyse immunoblot du niveau de TbSP1 dans le mycélium en croissance pendant 31 jours en milieu non carencé (contrôle : ligne 1), en carence de glucose (-G : ligne 2) ou d'ammonium (-N : ligne 3). Les mycéliums des échantillons du contrôle (B) et du carencé -N (C) soumis à une analyse immunofluorescente utilisant un marquage secondaire FITC des anticorps (bars = 18 μm) ; (D) correspond à une section d'hyphes (h) contrôle sans anticorps.

Pour plus de détails voir Soragni et al. (2001).



**Figure 12.** Immunocytolocalisation de la protéine TbSP1 à l'or dans les hyphes du mycélium de *T. borchii* (Soragni et al., 2001).

Immunogold-TEM localisation après 30 jours de croissance dans une section transversale d'hyphe (h) proche de la zone apicale (A) et dans des zones différenciées (B).

Pour plus de détails voir Soragni et al. (2001).

### **Quelles sont les modifications transcriptionnelles intervenant lors de la phase pré-symbiotique ?**

Dans une analyse d'expression différentielle de transcrits durant la phase pré-symbiotique, Menotta et al. (2004a) ont identifié 58 gènes régulés lors de l'interaction entre *T. borchii* et *Tilia americana*. Parmi ceux-ci, ces auteurs identifient les transcrits codant la protéine ribosomale 60 S et une cytochrome P450, protéines étant impliquées directement ou indirectement dans la signalisation plante-champignons pour les endomycorhizes

arbusculaires (Gianinnazzi-Pearson et al., 2002). Il semble donc y avoir des mécanismes communs lors de la phase pré-symbiotique, pour les symbioses ecto- et endomycorhiziennes. De même, Menotta et al. (2004a) identifient une GAS-2-like, protéine nécessaire à la virulence de *Candida glabrata* (Weig et al., 2001), étant régulé lors de la phase pré-symbiotique.

#### **1.3.2.4 La morphologie des mycorhizes dépend de la souche et de l'hôte.**

La réalisation de mycorhizes de *Tuber in vitro* permet d'analyser la structure morphologique des mycorhizes en fonction des souches fongiques et de l'hôte. Une étude portant sur deux souches de *T. borchii* (1BO et 43BO), formant des mycorhizes avec *Tilia platyphyllos*, montre qu'il existe des caractéristiques morphologiques différentes, mais aussi un effet différent sur la croissance de l'hôte de ces deux souches (Sisti et al., 2003). De même, des mycorhizes de *T. brumale* avec *Tilia americana* et *Quercus pubescens* ont des différences morphologiques, comme la longueur et le nombre de cystides (Giomaro et al., 2002).

*Des facteurs génétiques influencent donc la formation, la morphologie et l'effet physiologique sur l'hôte des mycorhizes. Mais, il existe aussi un effet de l'hôte sur la morphologie de cet organe.*

Ces résultats confirment que l'identification des *Tuber* dans leur phase symbiotique est difficile car la structure des mycorhizes peut varier en fonction du génotype du champignon, de l'espèce hôte, mais aussi de l'environnement. Il a donc fallu mettre au point des outils permettant l'identification des truffes lors de cette phase du cycle biologique, nous y reviendrons au paragraphe 1.4.2.

#### **1.3.2.5 Quels sont les mécanismes moléculaires et biochimiques présents lors de la phase symbiotique des Tuber ?**

##### ***Le métabolisme du carbone chez l'ectomycorhize***

Comme nous l'avons déjà dit, les sucres utilisés par le champignon proviennent de la plante. Contrairement au mycélium et à l'ascocarpe (Saltarelli et al., 1998), à ma connaissance, les enzymes de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates n'ont pas été quantifiées chez l'ectomycorhize de truffe. Toutefois, dans l'ectomycorhize, l'ARNm correspondant à l'énolase de *T. borchii* est détecté (Polidori et al., 2002, 2004). La glycolyse est donc vraisemblablement active dans l'ectomycorhize.

### **Métabolisme azoté de la phase symbiotique.**

#### *Expression des enzymes de la voie d'assimilation de l'azote*

Le métabolisme azoté est profondément influencé par les deux partenaires de la symbiose. En effet, Pierleoni et al (2001) ont mesuré, dans les mycorhizes de *T. borchii* avec *Tilia platyphyllos*, la capacité enzymatique de plusieurs enzymes du métabolisme azoté : GS, GOGAT et GDH (Figure 8). Les niveaux de GS et de GDH sont supérieurs dans l'ectomycorhize par rapport au mycélium, ce qui suggère que l'assimilation d'ammonium est plus importante dans cet organe (Pierleoni et al, 2001). De même, Vallorani et al. (2002) ont montré que le gène *gdh* fongique est exprimé dans l'ectomycorhize de *T. borchii* avec *Tilia platyphyllos*. Alors que les GDHs des deux partenaires sont présentes dans l'ectomycorhize, l'activité de la GDH à NADP fongique semble supérieure à celle de la plante (Vallorani et al., 2002). La nitrate réductase de *T. borchii* est une autre enzyme qui est surexprimée dans l'ectomycorhize par rapport au mycélium contrairement à la nitrate réductase de *Tilia platyphyllos* qui est moins exprimée dans l'ectomycorhize que dans la racine seule (Guescini et al., 2003). Enfin, Montanini et al. (2003) ont trouvé des niveaux de GS dans l'ectomycorhize comparables à ceux du mycélium en carence azotée (cf § 1.3.1.2). Ces auteurs localisent cette enzyme au niveau des hyphes pénétrant dans la racine. Dans cet organe, la GS aurait un rôle de protection contre les herbicides tel que la phosphinothricine (glufonisate). Les mycorhizes des *Tuber* pourraient ainsi protéger les plantes contre ces substances (Montanini et al., 2003).

*Ces résultats montrent que le champignon joue un rôle important dans l'assimilation de l'azote après l'établissement de la symbiose (Vallorani et al., 2002 ; Guescini et al., 2003).*

#### *Sous quelle forme l'azote est-il transféré du champignon à la plante ?*

La détermination des acides aminés libres dans des racines contrôles et des ectomycorhizes en croissance sur du nitrate révèle de fortes concentrations de glutamate, glutamine et asparagine dans les tissus symbiotiques (Guescini et al., 2003). Ceci a conduit ces auteurs à suggérer que dans la symbiose *T. borchii* - *Tilia platyphyllos*, ces acides aminés représentent les composés azotés servant à transférer l'azote du champignon vers la plante.

#### **Quelles sont les modifications transcriptionnelles intervenant lors de la phase symbiotique ?**

De nombreux gènes sont impliqués lors du développement de

l'ectomycorhize. Actuellement, de nombreuses recherches se focalisent sur le développement et le fonctionnement de cet organe. Elles ont pour objectif de comprendre les interactions symbiotiques plantes-champignons (Figure 10 ; Martin et al., 2001). Toutefois, de telles études sont encore rares chez les truffes, et la plupart des gènes impliqués dans leur phase symbiotique sont inconnus.

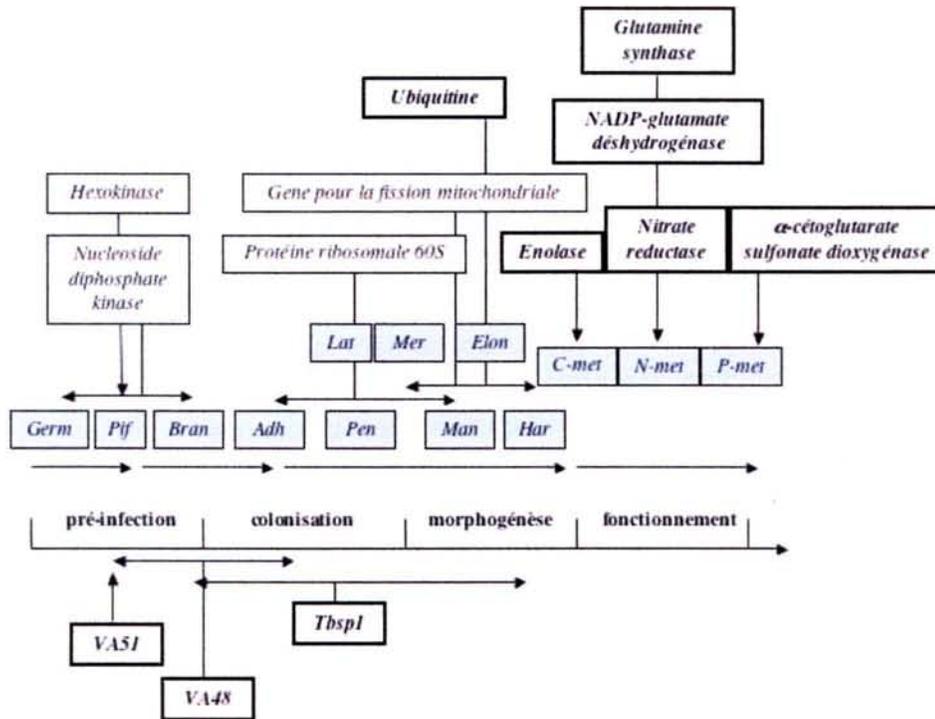
Afin de mieux comprendre les mécanismes intervenant lors de la phase symbiotique des *Tuber*, Zeppa et al. (2000) ont estimé la biomasse fongique et le niveau de transcrite dans le système *in vitro* *T. borchii-Tilia platyphyllos*. Ces auteurs montrent par dosage de l'ergostérol, que la biomasse fongique et l'activité métabolique diminuent avec l'âge de l'ectomycorhize (Tableau 7). Ceci est confirmé par l'estimation du taux de transcrite par estimation de l'ARN ribosomal, qui n'est pas régulé lors de la symbiose, et par l'analyse des protéines totales par électrophorèse bi-dimensionnelle (2D PAGE). En revanche, le taux de transcrite augmente chez la plante (Zeppa et al., 2000). Concernant les protéines, ces auteurs notent une diminution des protéines fongiques, ainsi que l'apparition de plusieurs protéines nouvelles, malheureusement inconnues.

**Tableau 7.** Estimation de la biomasse fongique (dosage de l'ergostérol) et du taux de transcrite fongique (ARNr) dans l'ectomycorhize *T. borchii-Tilia platyphyllos* obtenue *in vitro* (d'après Zeppa et al., 2000).

|                     | Biomasse fongique % | Transcrits fongiques % |
|---------------------|---------------------|------------------------|
| Mycélium            | 100                 | 100                    |
| Racine non infectée | 0                   | 0                      |
| Ectomycorhize jeune | 51,45 ± 1,51        | 42 ± 2,9               |
| Ectomycorhize âgée  | 35,12 ± 2,21        | 34 ± 1,7               |

Dans un travail plus ciblé sur l'analyse transcriptionnelle, Polidori et al. (2002) ont testé, par expression différentielle, 36 ADNc caractérisés à partir de l'ectomycorhize *T. borchii-Tilia platyphyllos*. La comparaison de l'expression de ces clones dans le mycélium, la plante et l'ectomycorhize indique que la majorité d'entre eux présentent une surexpression dans l'ectomycorhize. Parmi ces clones surexprimés, 60 % ne présentent aucune similarité avec des protéines connues. Toutefois, ces auteurs identifient la protéine ribosomale 60 S, une  $\alpha$ -cétoglutarate sulfonate dioxygénase, une tyrosine kinase, une nucléoside diphosphate kinase, une sorbitol déshydrogénase, une émolase et une glutaredoxine comme étant fortement régulées lors de la phase symbiotique. Malheureusement, l'origine, champignon ou plante, de ces clones est incertaine. Toutefois, Polidori et al. (2002) suggèrent que la majorité des clones régulés proviennent de la plante, ce qui est en accord avec les résultats de Zeppa et al. (2000).

Pour conclure cette partie sur les mécanismes impliqués dans la phase symbiotique, nous pouvons dire que la multiplication des études et la comparaison des résultats obtenus pour les *Tuber* et les autres espèces ectomycorhiziennes permettent d'identifier plusieurs gènes importants lors de cette phase du cycle biologique (Figure 13). Toutefois, un schéma général de l'expression génique du mycélium à la phase symbiotique n'est pas encore disponible.



**Figure 13.** Stades de développement de l'ectomycorhize et expression des gènes impliqués dans les différents stades de l'interaction symbiotique des *Tuber* (d'après Miozzi, 2003).

Sur la partie supérieure du schéma sont reportés les gènes isolés chez les truffes (Guescini et al., 2003; Guidi et al., 2003; Montanini et al., 2003; Vallorani et al., 2002; Agostini et al., 2001; Lacourt et al., 2002; Pierleoni et al., 2001; Polidori et al., 2002; Zeppa et al. 2001). Sur la partie inférieure sont reportés les trois gènes étudiés par Miozzi (2003) : Phospholipase A2 (*Tbsp1*), une protéine riche en cystéine (*VA48*) et une putative β-glucosidase (*VA51*). Les différentes phases du processus de développement de l'ectomycorhize *Pisolithus* et *Eucalyptus* sont indiquées (d'après Martin et Tagu, 1999) : *Germ* : germination des spores et des propagules ; *Pif* : pré-infection, croissance des hyphes ; *Bran* : ramification des hyphes ; *Adh* : adhésion des hyphes à la surface de la racine ; *Pen* : pénétration entre les cellules épidermiques ; *Man* : aggrégation des hyphes pour la formation du manteau fongique ; *Har* : différenciation du réseau Hartig ; *Lat* : stimulation de la formation de nouvelles racines latérales ; *Mer* : changement dans les activités méristématiques ; *Elon* : allongement radial des cellules du rhizoderme ; *C-met*, *N-met*, *P-met* : modification du métabolisme du carbone, de l'azote et du phosphate, incluant les transferts entre les symbiotes.

### 1.3.2.6 Les *Tuber* sont-ils capables de former d'autres types de mycorhizes ?

Dans une étude récente, Selosse et al. (2004) démontrent, pour la première fois, que des Ascomycètes, et entre autres des *Tuber*, forment des endomycorhizes typiques, du point de vue morphologique, avec les orchidées. En effet, 78 % des racines analysées sont colonisées par des

*Tuber* : *Tuber excavatum* et *T. uncinatum*. Il s'agit du premier rapport d'une plante mycohétérotrophe, *Epipactis microphylla* albinos, ayant comme partenaires des Ascomycètes.

*Ceci montre que les truffes sont capables de former d'autres types de mycorhizes.*

Il existe d'autres exemples d'espèces fongiques capables de former plusieurs types de mycorhizes. Entre autres, *Amanita gemmata* forme des ectendomycorhizes avec les *Arctostaphylos* spp et des ectomycorhizes avec *Pinus contorta* dans deux populations différentes (Largent et al., 1980a). Largent et al. (1980b) ont, quant à eux, trouvé que les Ericales peuvent former des mycorhizes ecto-, endo- et éricoïdes avec la même espèce de plante (*Arbutus menziesii*). De même, les *Oïodendron*, espèces fongiques éricoïdes, se retrouvent souvent associées avec les racines d'espèces ectomycorhiziennes (Bergero et al., 2000). Récemment, Villarreal-Ruiz et al. (2004) démontrent, pour la première fois, qu'un même mycélium de *Cadophora finlandia* peut développer simultanément des mycorhizes éricoïdes et des ectomycorhizes. Comme suggéré par Vrasltad (2004), il est possible que les arbres des forêts et les plantes éricoïdes soient reliés physiquement par un *Commun Network Mycélium*, d'où un possible transfert de carbone entre ces plantes (cf. § 1.3.2.1).

Dans une étude récente, Gutiérrez et al (2003) montrent que le type de mycorhize qui se forme *in vitro* dépend des conditions culturelles. Des échantillons de racines d'*Helianthemum almeriense*, pris dans la nature, forment des endomycorhizes avec deux Ascomycètes hypogés : *Terfezia claveryi* et *Picoa lefevrei*. Lorsque ces auteurs réalisent des tests de mycorhization en pots, ils observent des ectendomycorhizes, alors que des inoculations *in vitro* donnent des ectomycorhizes. Lors de sa thèse de doctorat, Laura Miozzi a trouvé des résultats similaires avec *T. borchii* et *Gistus incanus* (Miozzi, 2003). Ces travaux montrent, tout d'abord, qu'une espèce fongique est capable de former plusieurs types de mycorhizes. D'autre part, ils indiquent que la situation observée *in vitro* ne correspond pas toujours à ce qui existe dans la nature.

**Des études récentes commencent à identifier les mécanismes intervenant lors de la rencontre entre le champignon et la plante. Toutefois, elles sont réalisées sur des systèmes expérimentaux *in vitro* et nous ne savons pas si les mêmes mécanismes sont impliqués dans la nature. De plus, il n'existe pas encore de données physiologiques et fonctionnelles sur les mycorhizes de *Tuber* en conditions naturelles.**

### 1.3.3 La phase reproductive

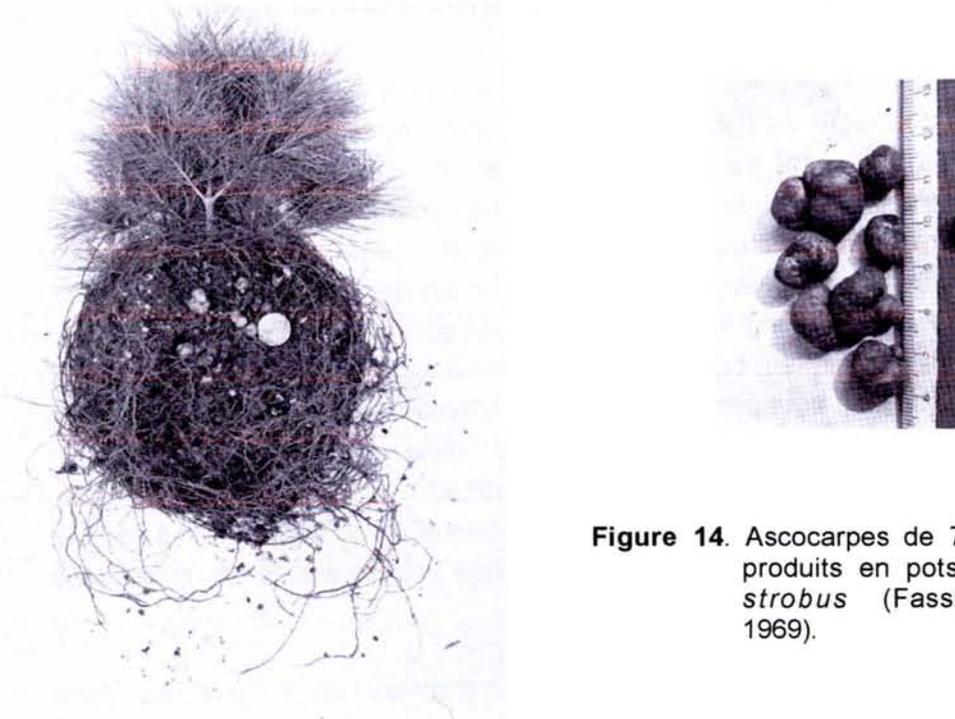
Nous venons de voir dans les paragraphes 1.3.1 et 1.3.2 les phases saprotrophique et symbiotique du cycle biologique des *Tuber*. Dans ce troisième paragraphe, nous parlerons de la phase reproductive (Figure 5). Cette phase est très importante car elle correspond à la formation du corps fructifère, qui présente souvent un fort intérêt gastronomique et économique (cf. § 1.2.1). Il existe, en fait, beaucoup d'interrogations sur cette phase du cycle biologique :

- (i) Comment se forme et se développe l'ascocarpe ?
- (ii) Comment se nourrit l'ascocarpe ?
- (iii) Quels sont les gènes conduisant à la différenciation de l'ascocarpe ?

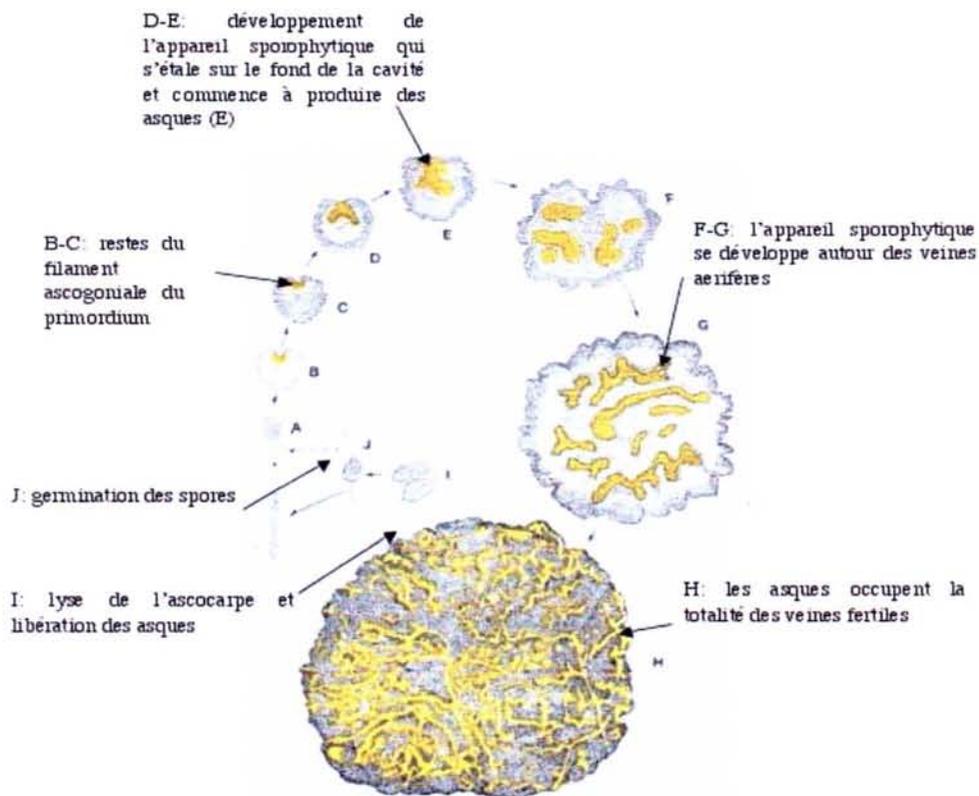
#### 1.3.3.1 Comment se forme et se développe l'ascocarpe ?

Une des principales questions qui intéressent le monde de la truffe est de savoir comment naissent les ascocarpes. Malheureusement nous n'avons pas de réponse simple à cette question. Chez les Ascomycètes, il existe trois stratégies de reproduction : l'hétérothallisme, l'homothallisme et le pseudo-homothallisme (Nelsson, 1996 ; Pöggeler, 2001). Pour le moment nous ne savons pas laquelle est utilisée par les truffes. Cependant, les études de diversité génétique réalisées avec des marqueurs codominants n'ont jamais mis en évidence d'hétérozygotes (Bertault et al., 2001 ; Frizzi et al., 2001 ; Murat, 2001 ; Mello et al., 2002 ; Rubini et al., 2004 ; Paolocci et al., 2004). Cela suggère que les truffes seraient des champignons homothalliques. Dans le cas de l'homothallisme ou autogamie, le mycélium du même individu peut former l'ascocarpe (Pöeggeler, 2001). Donc, les fructifications se formeraient après rencontre du mycélium d'un même individu, malheureusement nous ne disposons pas encore d'un modèle d'étude pour vérifier cette hypothèse. En effet, si en 1969 Fassi et Fontana ont obtenu la formation d'ascocarpes de *T. maculatum* en pots, cette expérience n'a jamais été reproduite (Figure 14). C'est pourquoi, seules les observations *in situ* permettent d'avoir des informations sur les différentes étapes de la formation des fructifications.

Dans ce but, Callot (1999) a étudié une truffière de *T. melanosporum*. Il suggère que l'ascocarpe se formerait au contact des racines longues et, dès les premiers stades de son développement, il n'aurait plus de relations avec le mycélium fructifère. Il évoluerait donc de manière autonome. Cet auteur a proposé un schéma possible pour la formation de l'ascocarpe de *T. melanosporum* (Figure 15).



**Figure 14.** Ascocarpes de *T. maculatum* produits en pots avec *Pinus strobus* (Fassi et Fontana, 1969).



**Figure 15.** Les différentes phases du développement de l'ascocarpe de *T. melanosporum* (d'après Callot *et al.*, 1999).

A: primordium ; B à F: ébauche apothéciôïde en croissance ; G: jeune ascocarpe ; H: ascocarpe mature ; I: asques contenant des ascospores ; J: ascospores en germination.

### 1.3.3.2 Comment l'ascocarpe trouve-t-il ses nutriments ?

Comme nous l'avons dit précédemment, les ascocarpes se développeraient indépendamment du mycélium et des mycorhizes. Pour cela, ils disposent de houppes mycéliennes qui sont, en général, peu abondantes. Mais chez *T. panniferum*, ces hyphes sont très importantes et recouvrent tout l'ascocarpe (Riousset et al., 2001). Elles sont connues depuis très longtemps puisque Pennier de Longchamps (1766) cite : « *M. de Tournefort prétend que les truffes ont de petits filaments qui leur servent de racines* ». En fait, une analyse réalisée avec des marqueurs radioactifs montre que les houppes mycéliennes des ascocarpes de *T. melanosporum* et *T. aestivum* sont perméables à l'eau, mais elles absorbent aussi un sucre (le mannose) et un anion (le phosphate) (Barry et al., 1994). Donc, ces hyphes seraient responsables de l'absorption de nutriments, il semble aussi qu'elles les redirigent vers des zones préférentielles de l'ascocarpe (Barry et al., 1994).

D'autre part, les truffes interagissent avec d'autres micro-organismes dans le sol, comme des bactéries, des champignons et des levures (cf. § 1.2.2). En fait, les levures trouvées au niveau des ascocarpes les aideraient à se nourrir (Zacchi et al., 2003). En effet, *Cryptococcus humicolus*, qui est fréquemment retrouvé à la surface des fructifications, a des capacités cellulolytique, chitinolytique et proteolytique extracellulaire pouvant aider à la nutrition de l'ascocarpe.

### 1.3.3.3 Le métabolisme carboné chez l'ascocarpe

Pour avoir des informations sur les voies métaboliques du carbone mises en oeuvre dans l'ascocarpe, Saltarelli et al. (1998) ont comparé l'activité des enzymes de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates dans le mycélium et l'ascocarpe. Cette analyse indique que toutes ces enzymes sont moins actives dans la fructification. Ces résultats suggèrent que la disponibilité en hexose et en oxygène est limitée dans cet organe hypogé. En fait, des observations de terrain montrent que la mésofaune et les crevasses trouvées dans le sol favorisent la fructification, ceci s'expliquerait par une meilleure aération des sols (Callot, 1999).

### 1.3.3.4 Le métabolisme azoté

En ce qui concerne le métabolisme azoté, la GS et la GOGAT sont détectées dans l'ascocarpe, en revanche la GDH est indétectable (Lacourt et al., 2002 ; Montanini et al., 2003). En fait, la GS semble une enzyme importante car elle est aussi retrouvée lors du développement de la fructification de *Coprinus cinereus* (Ewaze et al., 1978). Cette enzyme est associée à une accumulation d'urée et d'arginine, qui contribuent à l'expansion cellulaire, mais elle conduit aussi à baisser le niveau de  $\text{NH}_4^+$

qui est un inhibiteur de la méiose (Moore, 1998 ; Ewaze et al., 1978).

### 1.3.3.5 Quels sont gènes exprimés lors de la différenciation de l'ascocarpe ?

Les différents tissus et types cellulaires de l'ascocarpe sont le résultat d'un processus de différenciation conduisant à la formation d'asques et de spores. Afin d'avoir des informations sur les gènes impliqués dans ce développement, Lacourt et al. (2002) ont réalisé une analyse différentielle d'expression dans le mycélium et l'ascocarpe à deux stades de maturation (15 et 70%). Ces auteurs identifient 57 gènes régulés dans l'ascocarpe par rapport au mycélium : 41 sont surexprimés et 16 réprimés. Parmi ceux-ci, la GS, la 5-aminolevulinate synthétase, l'isocitrate lyase, la thiorédoxine, la 1,3-β-glucosidase et l'UDP-glucose sont fortement surexprimés. Ces résultats suggèrent que la biosynthèse d'acides aminés, le cycle du glyoxylate et la synthèse de la membrane cellulaire sont fortement altérés durant la morphogenèse de l'ascocarpe. Ce travail a été poursuivi par Silvia Gabella et Simona Abbà qui ont analysé 1858 clones. Parmi les gènes régulés lors de la maturation de l'ascocarpe, elles identifient principalement des enzymes de la biosynthèse des lipides et des « *heat shock* » protéines (Données non publiées).

De même, Zeppa et al. (2002) ont trouvé, par analyse différentielle d'ARNm, 7 clones présentant une expression différente entre le mycélium, l'ascocarpe immature et mature. Parmi ceux-ci, VC12 n'est exprimé que chez l'ascocarpe immature. Ce clone présente une faible homologie ( $E = 0,059$  ; Tableau 1 in Zeppa et al., 2002) avec un gène du *mating-type* (*MAT1*) d'*Alternaria brassicicola*. Il pourrait donc être impliqué dans les processus de fertilisation de l'ascocarpe. Le clone VT19, qui présente une forte homologie avec une 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzymeA réductase de *Gibberella fujikuroi* ( $E = 1e^{-25}$ ), est quant à lui fortement surexprimé chez l'ascocarpe mature. Il pourrait être à l'origine de l'augmentation de la synthèse de l'ergostérol qui est impliqué dans la biosynthèse de nouvelles membranes dans l'ascocarpe. D'autre part, cette enzyme pourrait expliquer l'augmentation de synthèse de composés terpéniques contribuant ainsi à l'arôme des truffes (Zeppa et al., 2002).

Dans une étude plus récente, Zeppa et al. (2004) analysent les composés volatils de l'ascocarpe de *T. borchii* à différents stades de maturation. Ces auteurs montrent que des composés volatiles sont produits à tous les stades de maturation. Chez l'ascocarpe mature, les composés du métabolisme des acides gras comme des alkènes, cétones et alcools sont plus produits que lors des autres stades de maturation. Entre autres, l'1-octen-3-ol est produit à ce stade. Cet alcool serait impliqué dans l'arôme des truffes, mais il jouerait aussi un rôle dans la maturation de l'ascocarpe (Zeppa et al., 2004). L'Aromadendrène est détecté dans l'ascocarpe immature et dans le mycélium de *T. borchii* en contact avec *Tilia*

*platyphyllos*. En revanche il ne l'est pas dans le mycélium en culture pure. Ceci pourrait indiquer que l'ascocarpe immature échange encore des informations avec la plante (Zeppa et al., 2004).

L'analyse électrophorèse bidimensionnelle des protéines totales (2D-PAGE) a aussi montré des différences au niveau de l'expression des protéines entre l'ascocarpe immature et mature de *T. borchii* (Pierleoni et al., 2004). Cette étude suggère que les stades initiaux de différenciation sont associés à une plus grande activité métabolique que les stades avancés de maturation. De plus, la maturation semble caractérisée par l'apparition et la disparition d'un certain nombre de protéines, malheureusement ces protéines spécifiques de certains stades de maturation n'ont pas été identifiées.

Divers gènes impliqués dans la structure de la paroi cellulaire ont été identifiés dans l'ascocarpe. *Tbf1* code pour une protéine localisée dans la paroi des hyphes de l'ascocarpe de *T. borchii* (De Bellis et al., 1998). Elle est exprimée spécifiquement dans cet organe, indépendamment de son état de maturation. En revanche, elle n'est pas détectée dans le mycélium, ni dans l'ectomycorhize. Etant donné qu'elle est co-localisée avec la chitine et les glucannes, De Bellis et al. (1998) suggèrent que cette protéine pariétale pourrait avoir un rôle structural dans les hyphes de l'ascocarpe.

Chez l'ascocarpe de *T. borchii*, les transcrits des chitine synthase *Chs3* et *Chs4* sont exprimés, en revanche la *Chs2* ne l'est pas (Balestrini et al., 2000). La *Chs3* est principalement localisée dans les asques. Cette enzyme serait donc impliquée dans leur maturation en produisant la chitine servant à leur paroi cellulaire. Au contraire, la *Chs4* se retrouve principalement au niveau de quelques hyphes végétatives, elle aurait donc un rôle dans la formation de la paroi cellulaire de ces hyphes. De plus, cette localisation limitée à certains endroits de l'ascocarpe suggère que la croissance du corps fructifère ne soit en fait qu'un agrandissement de sa forme initiale (Balestrini et al., 2000). Une Chitine synthase de classe IV a été identifiée chez *T. magnatum* (TMchs4) (Garnero et al., 2000). Tout comme la *Chs4* de *T. borchii*, TMchs4 est exprimé dans l'ascocarpe de *T. magnatum*. Il s'agit du premier gène ayant une fonction connue ayant été identifié chez cette espèce.

Pour conclure cette partie sur la phase reproductive des truffes, nous pouvons dire que malgré la multiplication des études, notre méconnaissance des processus induisant et régissant la fructification est totale. L'étude de cette phase de développement est d'autant plus difficile qu'elle n'est pas encore réalisable *in vitro*, il faut donc travailler avec des échantillons pris dans la nature, ce qui n'est pas aisé et ceci pour plusieurs raisons :

1-L'ascocarpe est l'organe des truffes qui coûte cher, surtout si l'on

souhaite étudier *T. melanosporum* ou *T. magnatum*.

2-Pour réaliser des études d'ARN, il faut du matériel frais, c'est-à-dire récolté depuis peu et surtout congelé immédiatement.

3-Les ascocarpes sont colonisés par de nombreux micro-organismes (champignons, levures et bactéries), il faut donc faire attention aux contaminations.

**Malgré ceci, nous commençons à mieux connaître la phase reproductive des *Tuber*, qui seraient des champignons homothalliques. Comme nous l'avons vu, plusieurs gènes impliqués dans la différenciation de l'ascocarpe sont connus: la glutamine synthétase, la 5-aminolevulinique acide synthétase, l'isocitrate lyase, la thiorédoxine, glucanne, la 1,3-β-glucosidase, l'UDP-glucose, Tbf1, Ćhs3 et Ćhs4. La synthèse des lipides semble être un processus fondamental lors de la maturation de l'ascocarpe, elle pourrait être impliquée dans les réserves du corps fructifère.**

#### **1.3.4 En fait, il persiste des doutes sur le cycle biologique des truffes**

En effet, il existe des différences entre les observations réalisées chez les truffes et ce qui est connu pour les Ascomycètes. Par exemple, le nombre de spores par asque est variable et peut même se réduire à 1 pour *T. melanosporum* (Callot, 1999 ; Poma et al., 2002), pour *Neurospora crassa* il est toujours de 8. Chez les Ascomycètes, il existe une reproduction asexuée caractérisée par la formation de conidies encore inconnue chez les *Tuber* jusqu'à cette année (Riousset et al., 2001). En effet, Urban et al. (2004) rapportent l'identification de la phase asexuée de *T. borchii* et de *T. oligospermum*. Etant donné que ces auteurs ne sont pas parvenus à faire germer les conidies, l'appartenance de ces anamorphes à *T. borchii* et à *T. oligospermum* n'a pas été démontrée par culture mycélienne. Toutefois, une éventuelle contamination est réfutée car cinq échantillons indépendants ont été analysés (Urban et al., 2004).

**Nous avons tenté, dans ce chapitre 1.3, une synthèse des connaissances sur la biologie des truffes. Ces organismes présentent plusieurs phases dans leur cycle biologique : phase saprotrophique, phase symbiotique et phase reproductive. Les mécanismes impliqués dans chacune de ces phases sont de mieux en mieux connus. Malgré tout, il persiste encore de nombreuses interrogations comme:**

**(i) Quels sont les facteurs déclenchant les changements de phases ?**

**(ii) Pourquoi ne réussit-on pas à reproduire la totalité du cycle vital des *Tuber in vitro* avec production des fructifications ?**

**(iii) La situation *in vitro* correspond-elle à la réalité ?**

**(iv) Peut on généraliser des résultats obtenus principalement avec *T. borchii* ?**

**Nous allons dans la quatrième partie de cette analyse bibliographique parler des études de diversité génétique inter- et intraspécifique, nous verrons pourquoi elles sont réalisées et quels en sont les principaux résultats.**

## 1.4 La variabilité génétique : de l'identification des espèces à la phylogéographie

Malgré la multiplication des études morphologiques ayant pour but la séparation des espèces de *Tuber*, il est encore difficile de les identifier sans erreur (cf. § 1.1.3). De plus, le développement de plants mycorhizés, avec diverses espèces de truffes, nécessite la mise au point d'outils d'identification des apex racinaires. Nous verrons dans ce paragraphe les progrès réalisés dans l'identification biochimique et moléculaire des truffes. Nous essayerons de comprendre l'intérêt de ces études de diversité génétique inter- et intraspécifique. Mais nous allons commencer par donner quelques informations générales sur la variabilité génétique, ainsi que sur la génétique des populations.

### 1.4.1 Variabilité génétique et génétique des populations

#### 1.4.1.1 Concepts généraux et définitions

##### ***La génétique des populations, une discipline en plein essor***

En 1905, Bateson définissait la génétique comme étant « *la science qui étudie l'hérédité et la variation en cherchant de découvrir les lois qui gouvernent les ressemblances et les différences au sein des individus qui sont en rapports de descendance* » (Piazza, 2003). En fait, la génétique des populations est une branche de la génétique qui mêle observations et théories, dans le but d'expliquer les modifications génétiques survenant au sein des populations et entre les populations (Encadré 4). Elle étudie les mécanismes évolutifs qui régulent l'évolution des populations (Hartl, 1994; Hoekstra, 1996 ; Piazza, 2003).

##### ***La variabilité génétique ou polymorphisme : l'outil des études de génétique des populations.***

En génétique des populations, ce qui nous intéresse est la part due aux variations entre génotypes (Hartl, 1994). Cette variabilité génétique, au niveau de certaines régions génomiques (loci ou gènes), s'appelle polymorphisme (<http://gen-net-pop.univ-lyon1.fr/cours/chap2/index.htm>). Toutes les formes différentes, c'est-à-dire la séquence de l'ADN d'un locus, sont appelées allèles ou haplotypes (Pons & Petit, 1996 ; Carbone & Kohn, 2001).

**Encadré 4** Comment définir le terme de population ?

Le terme de « population » a beaucoup été utilisé dans un sens imprécis, intuitif, pour désigner un groupe d'organismes appartenant à la même espèce. En fait, ce terme désigne plutôt un groupe d'individus de la même espèce vivant dans une zone géographique suffisamment restreinte pour que tous les membres de la population puissent se croiser avec tous les autres (Hartl, 1994). La définition précise d'une telle communauté est difficile et varie d'une espèce à l'autre, puisque les membres d'une espèce sont rarement répartis d'une façon homogène. La subdivision de la population est souvent provoquée par la structuration du milieu ; des zones favorables se mêlent à des zones défavorables. Dans le cas de l'espèce humaine, les chercheurs tiennent compte des villages, villes, régions, états et continents mais ils utilisent aussi beaucoup le paramètre linguistique (Piazza, 2003). Ce morcellement est évident, par exemple, dans le cas d'organismes terrestres sur les îles archipels (Hartl, 1994). En fait la taille des populations est fondamentale, idéalement elle doit être de plus de 100 individus et les populations ayant moins de 50 individus ne devraient pas être prises en compte (Piazza, 2003). Cet échantillonnage est relativement simple quand on travaille sur des organismes faciles d'accès, c'est le cas de l'humain, mais en ce qui concerne les truffes, avoir des populations aussi grandes est difficile.

Chez les champignons, la composition des populations est beaucoup plus difficile à définir. En effet, le concept d'espèce fongique n'est pas encore très clair (cf § 1.4.2). Donc les limites prises pour les populations fongiques sont souvent arbitraires et liées à l'étude menée : parcelle, forêt, département administratif... (Selosse, 1998).

Enfin, les populations naturelles sont rarement simples, donc il est difficile de rechercher et de développer des théories qui correspondent à la réalité (Hey et Machado, 2003). En fait, elles évoluent dans différentes dimensions : elles changent de taille, de densité et de lieu dans le temps, et à travers l'espace, elles peuvent se fragmenter en plusieurs populations et fusionner avec d'autres (= Effet Walhurg) (Hey et Machado, 2003).

**Comment révéler la variabilité génétique ?**

La variation génétique immédiatement perceptible est relativement rare, par contre, la variabilité génétique cachée est particulièrement répandue. Il a donc fallu mettre au point des outils pour identifier ce polymorphisme : ces outils sont les marqueurs moléculaires (Tableau 8).

**Quelles sont les origines et les causes de l'évolution de la variabilité génétique**

La variabilité génétique est le résultat de mutations faisant apparaître de nouveaux allèles, auxquelles il faut ajouter les phénomènes de recombinaison (<http://gen-net-pop.univ-lyon1.fr/cours/chap2/index.htm>). La variabilité génétique au sein des populations peut évoluer sous l'effet de forces évolutives comme les migrations, les mutations, la dérive génétique et la sélection naturelle (Figure 16). Elles entraînent une évolution directrice et non aléatoire des fréquences alléliques. Etudier ces forces évolutives permet de comprendre l'origine et le maintien de la variabilité génétique.

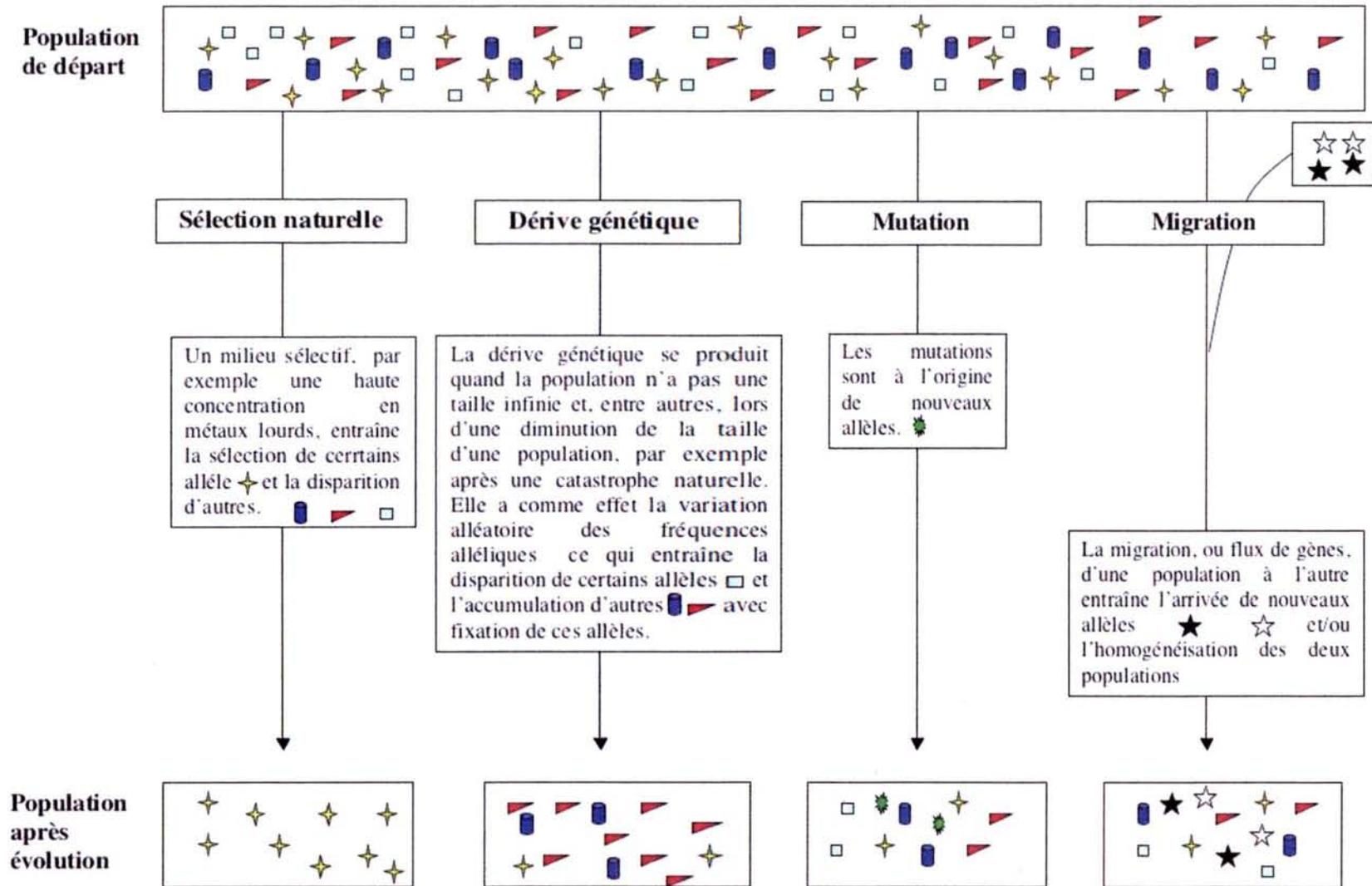
En fait, des facteurs comme la dérive génétique et les « *bottleneck* » (diminution des populations) ont un effet sur tout le génome, alors que la

recombinaison et la sélection n'influencent que quelques parties de celui-ci (Zhang et Hewitt, 2003). Il est donc possible en analysant les séquences d'ADN d'avoir une idée des phénomènes qui sont intervenus dans l'histoire d'une espèce (cf. §1.4.1.2).

**Tableau 8.** Principales méthodes moléculaires utilisées en écologie (d'après Selosse, 1998).

| Méthode                        | RFLP*  | PCR dirigée : SCNG* et SSR   |  | PCR/RFLP (et SSCP*)  | AFLP*  | RAPD* et RAMS*  |
|--------------------------------|--|--|--|--|--|---|
|                                |  | Simple locus   |  |  |  |   |
| <b>Principe</b>                | Hybridation d'une sonde ADN sur de l'ADN digéré et séparé sur gel                              | Amplification exponentielle d'un locus délimité par deux amorces flanquantes   |  | PCR suivie d'une digestion par des endonucléases (ou d'une migration en conditions dénaturantes pour la SSCP)                | Digestion de l'ADN, ligation de fragments-amorces à certains fragments digérés, puis PCR                                     | PCR sur des loci aléatoirement amplifiés par fixation d'une amorce unique en conditions peu strigentes ; il est possible d'utiliser une amorce microsatellite |
| <b>Amplification du signal</b> | Sonde radioactive (ou parfois fluorescente)  | Amplification <i>in vitro</i> par une enzyme thermostable ( <i>Taq</i> polymérase), grâce à la répétition d'un cycle thermique permettant successivement : la dénaturation de l'ADN, l'hybridation des amorces initiant la réplication et enfin la polymérisation                    |  |  |  |   |
| <b>Base de la spécificité</b>  | Choix de la sonde  | Choix des amorces et donc du locus, souvent unique. Les conditions thermiques sont déterminantes   |  |  | Lors de la ligation, choix de certains fragments digérés   | Amorces et conditions de température choisies   |
| <b>Source de variabilité</b>   | Polymorphisme au niveau des sites de restriction et/ou insertions/délétions dans les fragments | Variation en taille du locus choisi  |  | Polymorphisme au niveau des sites de restriction et/ou insertions/délétions dans les fragments correspondant au locus choisi | Présence vs absence (marqueurs dominants) ou polymorphisme de taille (marqueurs codominants) de certains fragments amplifiés |   |
| <b>Avantages</b>               | Spécifique et reproductible  | Très spécifique (donc applicable même quand plusieurs génomes sont présents (par exemple deux symbiotes) et sensible (réclame peu d'ADN). Maintenant, la pcr dirigée est de plus en plus associée à un séquençage direct, mais aussi à un <i>genotyping</i> de microsatellites (SSR) |  |  | Amplifie plusieurs loci simultanément ; génère fréquemment de nombreux polymorphismes  |   |
| <b>Inconvénients</b>           | Manipulation de la radioactivité ; besoin d'une bonne quantité d'ADN                           | Exige de connaître les séquences des sites d'hybridation des amorces   |  | Coût des enzymes   | Amplification de l'ADN contaminant et parfois peu reproductible.   |   |

\*abréviations : RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism* ; SCNG : *Single Copy Nuclear Gene* ; SSR : *Simple Sequence Repeats* ; SSCP : *Single-Strand Conformation Polymorphism* ; AFLP : *Amplified Fragment Length Polymorphism* ; RAPD : *Random Amplified Polymorphism DNA* ; RAMS : *Random Amplified Microsatellite Sequences*



**Figure 16.** Causes de l'évolution : description des différentes forces évolutives.

### 1.4.1.2 Pourquoi étudier la variabilité génétique ?

Comme nous l'avons vu précédemment, étudier la variabilité génétique est indispensable en génétique des populations, mais nous pouvons nous demander à quoi servent de telles études. En fait, les applications sont multiples:

- (i) *Elles permettent de réaliser des outils pour identifier les espèces, mais aussi les isolats au sein des espèces.*
- (ii) *Elles sont très utilisées pour faciliter la définition des politiques de conservation des espèces.*
- (iii) *Elles permettent d'étudier les relations entre les espèces et ainsi d'avoir des idées sur leur co-évolution.*
- (iv) *Elles permettent d'étudier les communautés.*
- (v) *Elles permettent d'évaluer le niveau de structuration des populations.*
- (vi) *Elles permettent de reconstituer l'histoire d'une espèce : phylogéographie.*

#### **La variabilité génétique comme outil d'identification des espèces.**

Chez les animaux et les végétaux, la définition de l'espèce ne pose pas trop de problèmes. Ce n'est pas le cas pour les micro-organismes et entre autres les champignons (Encadré 5 ; Selosse, 1998). La diversité des organismes, les variations dans les stratégies écologiques et dans les modes de reproduction augmentent les problèmes pour trouver une définition appropriée à tous les champignons (Johannesson, 2000). Le concept d'espèce fongique a évolué depuis une définition strictement basée sur des critères morphologiques, espèce phénétique, vers un concept d'espèce basé sur des études phylogénétiques (Selosse, 1998 ; Johannesson, 2000). Des termes comme taxon (groupe de niveau systématique quelconque) ou stirpe (complexe d'espèces souvent mal démêlées) sont utilisés en mycologie lorsqu'il existe des incertitudes systématiques (Selosse, 1998).

#### **Encadré 5. Que sont les espèces ?**

L'espèce peut être définie de plusieurs façons (Ridley, 1996 ; Selosse, 1998) :

- **sens phénétique** : groupe d'organismes partageant des similarités morpho-anatomiques.
- **sens biologique** : groupe d'organismes effectivement ou potentiellement interféconds, qui sont reproductivement isolés des autres groupes de même nature (Mayr, 1975).
- **sens reproductif** : proche du sens biologique, définit l'espèce comme un groupe d'organismes qui partagent un système de reconnaissance commun lors de la reproduction.
- **sens écologique** : groupe d'organismes partageant la même niche écologique.
- **sens cladistique** : groupe d'organismes partageant une origine évolutive commune.

Par exemple, *Laccaria laccata* est un stirpe complexe (Singer, 1977). Chez les truffes, il existe des incertitudes sur la division de certaines espèces, comme le complexe : *T. aestivum*-*T. uncinatum*, nous y reviendrons ultérieurement (Encadré ; §1.4.2.1).

Malgré ces problèmes, les études de la variabilité génétique ont permis la mise au point d'outils pour l'identification des espèces de truffes dans les différentes phases de leur cycle biologique, ainsi que dans les aliments (cf. §1.4.2.1).

### La conservation des espèces

La disparition de certaines espèces n'est pas uniquement provoquée par la taille des populations, mais elle est aussi en partie la conséquence de leur faible variabilité génétique (Figure 17). Dans les programmes de conservation, il existe principalement quatre grands problèmes (Steinmetz, 1991): (i) celui de la taille de l'échantillon à conserver, (ii) celui du choix de l'échantillon à conserver, (iii) celui de la dimension des îlots de conservation et (iv) celui de la gestion de ces îlots. Donc, les connaissances sur la diversité génétique, sur la structuration géographique, sur les systèmes de reproduction et les mécanismes biologiques, assurant le maintien et l'évolution de la diversité, sont directement applicables aux modes de conservation.

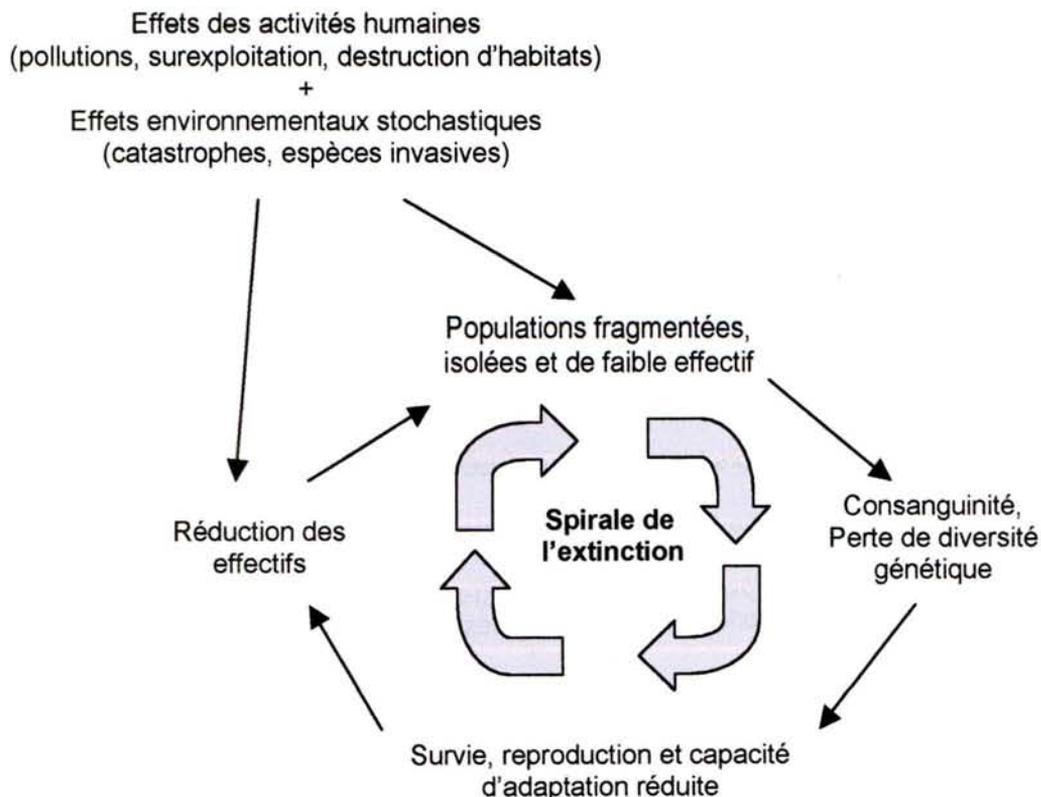


Figure 17. Schéma représentant les principales causes de l'extinction des espèces.

### Co-évolution entre les espèces

Darwin, dans son livre « *Origin of Species* », n'a pas employé le terme co-évolution, mais il a utilisé occasionnellement co-adaptation pour décrire l'adaptation de deux organismes (Encadré 6).

**Encadré 6.** Extrait du livre de Darwin : « *Origin of Species* » p95 1<sup>ère</sup> édition:

« *Thus I can understand how a flower and a bee might slowly become, either simultaneously or one after the other, modified and adapted in the most perfect manner to each other, by continued preservation of individuals presenting mutual and slightly favourable deviations of structure* »

L'idée de changements réciproques chez deux espèces qui interagissent s'appelle co-évolution (Thompson, 1989). En fait, il existe de plus en plus d'exemple de co-évolution adaptative pour les

symbioses, mais aussi pour les relations hôtes-pathogènes. Ceci montre que les génomes des deux protagonistes sont « liés », faisant de la co-évolution un phénomène fondamental dans l'organisation de la biodiversité (Thompson et al., 2002). Elle peut être mise en évidence, et étudiée, par la comparaison de la structure génétique et de la variabilité génétique des protagonistes (Schardl et al., 1997 ; Jerome et Ford, 2002 ; Thompson et Cunningham, 2002). Toutefois, elle n'entraîne pas toujours une adaptation positive des espèces, mais il est maintenant évident qu'elle est aussi à l'origine d'une « *maladaptation* » (Thompson et al., 2002).

### **La diversité génétique comme outil d'étude des communautés : exemple des champignons ectomycorhiziens**

Chez les champignons ectomycorhiziens, l'étude de la variabilité génétique et de la structure génétique vise, non seulement, à déterminer la structure spatiale mais aussi la dynamique des espèces ou des populations la composant (Horton et Bruns, 2001). Traditionnellement, ces études sont basées sur la récolte des carpophores (Dahlberg et Stenlid, 1994 ; Gryta et al., 1997 ; Bonello et al., 1998 ; Fiore-Donno et Martin, 2001). Mais, depuis l'amélioration des techniques de biologie moléculaire, les échantillonnages de mycorhizes et de sols se sont multipliés (Smit et al., 1999 ; Guidot et al., 2001, 2002, 2004 ; Zhou et Hogetsu, 2002 ; Landeweert et al., 2003 ; Luis et al., 2004). La comparaison entre ces deux types d'échantillonnage indique que les analyses basées sur la récolte des carpophores entraînent un biais et ne correspondent pas toujours à la situation trouvée dans le sol (Dahlberg et al., 1997 ; Jonsson et al., 1999).

*Quelle est la dynamique temporelle des champignons ectomycorhiziens ?*

En 1998, Franckland définit le phénomène de succession des champignons ectomycorhiziens, se caractérisant par la colonisation, le

maintien et la disparition d'espèces. Généralement, la diversité fongique augmente, via le recrutement de nouvelles espèces, lors des stades précoces puis diminue avec le vieillissement des peuplements (Dalhberg et Stenlid, 1995).

|   |
|---|
| <p><b>Génet</b> : il correspond à un organisme défini sur la base du génotype</p> |
|---|

Dans le cadre de cette théorie, les stades précoces de succession se composent d'espèces, appelées « *early stage fungi* », formant de nombreux génets de taille réduite (1 à 10 m) et produisant beaucoup de carpophores et de spores. Ces espèces favorisent la reproduction sexuée. Parmi celles-ci, on trouve *Pisolithus tinctorius* (Anderson et al., 1998), *Hebeloma cylindrosporium* (Gryta et al., 1997) et *Laccaria bicolor* (Selosse et al., 1998a,b).

Au contraire, dans les stades plus tardifs se retrouvent des « *late stage fungi* » se développant principalement par croissance végétative, les génets sont généralement de grande taille (10 à 100 m) et peu nombreux. *Suillus bovinus* (Dahlberg et Stenlid, 1994), *S. pungens* (Bonello et al., 1998) et *S. variegatus* (Dahlberg, 1997) sont des « *late stage fungi* ».

Toutefois, il semble que la situation soit beaucoup plus complexe. En effet, il existe des champignons « *multistage* » comme *S. bovinus* qui est présent à plusieurs stades de maturité de la forêt, mais dans les stades tardifs la taille des génets augmente et leur nombre diminue (Dalhberg et Stenlid, 1994). Pour ce champignon, Dalhberg et Stenlid (1995) suggèrent qu'il colonise le milieu grâce à des basidiospores, colonisation suivie par une croissance végétative du mycélium avec élimination compétitive de certains génets. D'autre part, plusieurs travaux indiquent que la colonisation par spores n'est pas limitée aux stades précoces. Par exemple, *Laccaria amethystina* privilégie la sporulation avec beaucoup de petits génets dans une hêtraie d'altitude (Gherbi et al., 1999 ; Fiore-Donno et Martin, 2001). De même, Redecker et al. (2001) obtiennent des résultats similaires pour plusieurs Russulacées.

Etant donné que la plupart de ces études sont réalisées par échantillonnage des carpophores, elles ne reflètent probablement pas la structure des populations souterraines (réseau mycéliens, ectomycorhizes...) (Jonsson et al., 1999). Toutefois, l'analyse des mycorhizes réalisée pour *Suillus grevillei* associé à *Larix kaempferi* au Japon (Zhou et al., 2001) et pour *Hebeloma cylindrosporium* associé à *Pinus pinaster* (Guidot et al., 2001) montre que la distribution des fructifications et des mycorhizes est liée. Ainsi, la disparition des carpophores est suivie de la disparition des mycorhizes. Cependant, la distribution des mycorhizes ne correspond peut-être pas à la distribution réelle du mycélium dans le sol. Guidot et al. (2002) ont identifié et quantifié le mycélium d'*Hebeloma cylindrosporium* à partir d'extraction d'ADN de sol.

Ces auteurs détectent ce champignon jusqu'à 50 cm des fructifications, au-delà il n'est plus détectable. De même, un an après la fructification *H. cylindrosporum* n'est plus retrouvé (Guidot et al., 2003).

*Ceci indique que ce champignon est éliminé, en milieu forestier, du sol et des racines et qu'il recolonise chaque année le milieu grâce aux basidiospores.*

Malheureusement, si le nombre d'études portant sur les communautés fongiques au niveau des mycorhizes et du sol se multiplie, il en existe encore peu qui se focalisent sur une espèce pour voir sa distribution et sa diversité génétique.

### **Subdivision des populations et structure génétique**

En fait, les populations naturelles correspondent rarement à une population de taille infinie où les individus peuvent s'unir aléatoirement sur l'ensemble de l'aire de répartition. Les populations sont donc presque toujours subdivisées géographiquement en unités dans lesquelles les individus s'unissent plus souvent avec des individus proches qu'éloignés géographiquement, ces unités sont appelées des dèmes (Hartl, 1994). Souvent le terme de populations est employé à la place de dème (Encadré 4).

*Cette subdivision des populations correspond à une structuration géographique, appelée aussi structure génétique.*

Etant donné que la dérive génétique va agir différemment dans chaque population, elles vont progressivement se différencier les unes des autres. Cela aura pour conséquence d'avoir des allèles spécifiques pour certaines populations, ainsi que des fréquences alléliques différentes dans chacune d'elles.

Il existe plusieurs techniques permettant de mettre en évidence une différenciation génétique, c'est-à-dire des variations dans les fréquences alléliques entre populations.

**Encadré 7.** Niveau de structuration génétique basé sur les valeurs de *Fst* (Wright, 1978) :

0,00 < *Fst* < 0,05 = faible différenciation génétique  
 0,05 < *Fst* < 0,15 = moyenne différenciation génétique  
 0,15 < *Fst* < 0,25 = forte différenciation génétique  
 0,25 < *Fst* = très forte différenciation génétique

L'indice de fixation (*Fst*) est un des plus utilisés (Wright, 1978). Le *Gst* est un indice correspondant au *Fst*, c'est-à-dire qu'il est basé seulement sur les fréquences alléliques, alors que le *Nst* est basé non

seulement sur les fréquences alléliques mais aussi sur les différences entre haplotypes (Pons et Petit, 1996). Comme nous le verrons un peu plus loin,

ces indices sont fondamentaux pour avoir des informations sur l'histoire d'une espèce.

***La diversité génétique peut permettre d'avoir des informations sur l'histoire d'une espèce.***

Il existe divers facteurs pouvant être à l'origine de la différenciation génétique. Des facteurs environnementaux comme le type de sol sont importants pour les champignons (Diez et al., 2001 ; Jany et al., 2002). Mais il existe aussi des facteurs historiques comme la fragmentation ancestrale des populations et une re-colonisation rapide (Figure 18). Si l'on est capable d'identifier l'origine de la différenciation génétique, cela donnera des indications sur l'histoire de l'espèce. Ceci est important si l'on dispose de peu de données fossiles, comme c'est le cas pour les champignons.

*Comment peut-on révéler ces facteurs ?*

Les marqueurs moléculaires, et surtout les séquences d'ADN, sont utilisés pour révéler la structure génétique, l'histoire évolutive et l'évolution des populations (Zhang et Hewitt, 2003). Cela permet entre autres de révéler

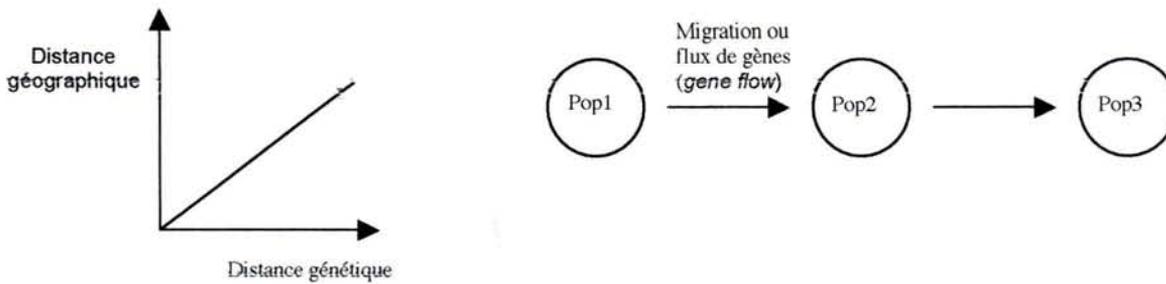
l'histoire démographique d'une espèce (Encadré 9; Emerson et al., 2001), d'étudier les mécanismes de l'évolution comme la recombinaison (Posada et Crandall, 2001), la sélection (Zhang et Hewitt, 2003) et la phylogéographie (Avisé, 1998 ; Hare, 2001).

**Encadré 8.** Définition de phylogéographie :

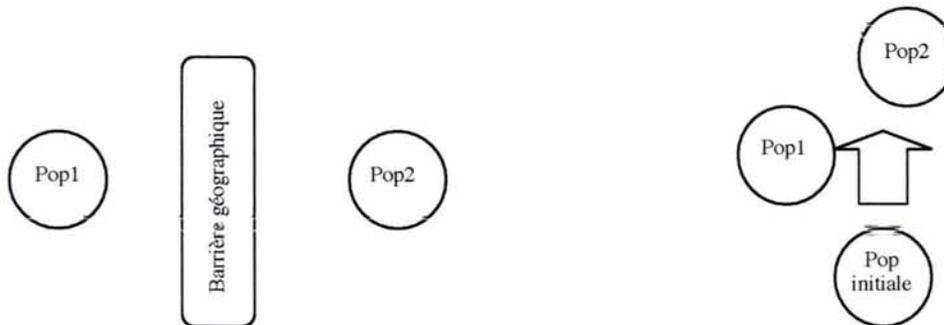
Ce terme a été employé pour la première fois par Avisé (1987). Cette discipline fait partie de la **biogéographie** et elle s'intéresse à l'influence des facteurs historiques sur la distribution actuelle des haplotypes (=structure génétique). Au contraire, l'**écogéographie** s'intéresse aux facteurs contemporains sur la distribution actuelle des haplotype

Parmi les facteurs qui peuvent influencer la structure génétique, l'isolement par la distance (Figure 18) est relativement simple à mettre en évidence. En effet, il suffit de tester une corrélation entre les distances génétiques, pouvant être des indices de similarité ou même les *Fst* entre populations, et les distances géographiques. Pour cela, le test de Mantel est couramment employé (Mantel, 1967).

*Mais il faut faire attention à la signification de ce test. En effet, un résultat non significatif indique seulement que l'isolement par la distance n'est pas impliqué, mais il peut très bien y avoir une différenciation génétique et donc par conséquent une structure génétique !*



**A. Isolement par la distance (*isolation by distance*)** : cela se produit quand il existe des événements de migrations successifs, dans ce cas il existe corrélation entre les distances génétique et géographique.



**B. Fragmentation de populations (*population fragmentation*)** : quand les populations sont séparées et donc sans flux de gènes elles évoluent indépendamment

**C. recolonisation rapide (*range expansion*)** : quand une recolonisation rapide du milieu s'effectue à partir d'une population

**Figure 18.** Facteurs à l'origine de la différenciation génétique.

**Encadré 9.** La théorie de la coalescence : une approche rétrospective ([http://anthro.unige.ch/GMDP/Laurent/GMDP\\_coal.htm](http://anthro.unige.ch/GMDP/Laurent/GMDP_coal.htm)).

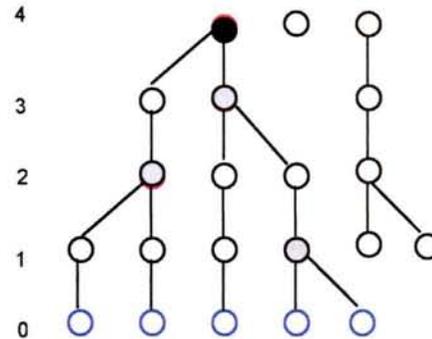
L'approche classique de la génétique des populations consiste à essayer de prédire l'évolution du polymorphisme génétique dans une population sous l'influence de différentes forces évolutives. C'est donc une **approche essentiellement prospective**. Une fois que l'on a compris ce qui se passe au niveau de la population, il faut encore développer la théorie qui concerne des échantillons tirés de la population, car c'est le matériel que l'on observe.

La théorie de la coalescence a une approche entièrement différente. Elle part d'un échantillon de gènes observés, et vise à reconstruire l'histoire généalogique de ces gènes, selon une certaine histoire démographique de la population et un certain modèle de mutation, jusqu'à l'ancêtre commun le plus récent de ces gènes. On n'a donc pas besoin de modéliser l'ensemble de la population. On se préoccupe uniquement de notre échantillon. C'est une **approche essentiellement rétrospective**

**La théorie de la coalescence décrit donc simplement le processus de coalescence des gènes d'un échantillon depuis la génération présente jusqu'à l'ancêtre commun de tous les gènes d'un échantillon.**

**Encadré 9.** suite...

Pour simplifier, considérons une très petite population de taille constante contenant 5 gènes à la génération 0 sur la figure suivante :



En remontant dans le passé, on voit que les lignages vont progressivement fusionner les uns avec les autres par une série de coalescence, jusqu'à un seul ancêtre commun, à la génération 4. Donc tous les gènes de la génération 0 ont un ancêtre commun 4 générations auparavant. Maintenant, si l'on regarde le processus, on voit qu'un des gènes de la génération 4 s'est fixé dans la population à la génération 0. Les autres gènes de la génération 4 se sont perdus, ils n'ont pas été transmis jusqu'à la génération présente. Ce processus de fixation d'un gène et de perte des autres gènes est en fait exactement le processus de dérive génétique. **On voit donc que le processus rétrospectif de coalescence est entièrement analogue à un processus prospectif de dérive génétique.** Mais il a deux avantages principaux par rapport au processus de dérive :

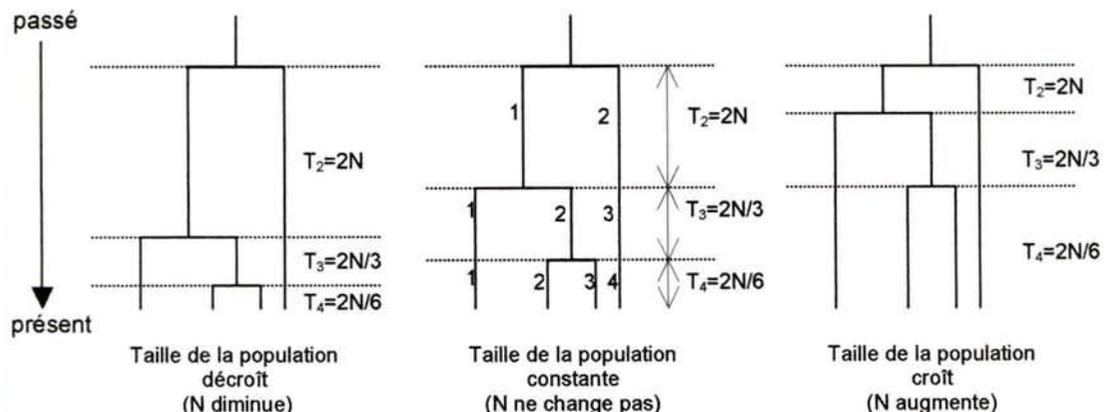
1. On ne va **s'intéresser qu'aux lignées qui laisseront des descendants** à la génération actuelle.
2. On ne va **considérer qu'un échantillon tiré au hasard** de la population, et pas la généalogie de la population entière.

Cette théorie a beaucoup d'applications, elle permet entre autres d'avoir une idée sur l'histoire démographique d'une espèce. En effet, un changement de taille d'une population laisse une signature sur l'ADN (substitution entre individus) qui dépend de la direction du changement (diminution ou augmentation) et du temps (récent ou ancien). Donc découvrir la relation entre le temps de coalescence et la taille des populations est fondamental en génétique des populations (Emerson et al., 2001).

En fait, la topologie des généalogies peut donner une indication sur la démographie. En effet, le temps entre deux moments de coalescence est défini par la formule :

$T_j = 4N/(j(j-1))$ ,  $j$  correspond au nombre de lignées et  $N$  à la taille de la population.

Comme le montre l'exemple ci-dessous, le temps de coalescence ( $T$ ) dépend de la taille de la population et il est ainsi possible de savoir si une modification démographique est intervenue dans le passé.



En revanche, les facteurs historiques sont beaucoup plus difficiles à identifier. Les techniques traditionnelles basées sur les *F-statistiques* (Wright, 1978) ne permettent pas de différencier les facteurs à l'origine de la structure génétique (flux de gènes ou facteurs historiques ; Figure 18) (Templeton, 1998). Pour pouvoir les séparer, il existe un certain nombre de techniques qui sont principalement basées sur des arbres faits à partir des gènes (*gene tree*) (Templeton et al., 1995 ; Templeton, 1998 ; Posada et Crandall, 2001; Knowles et Madson, 2002).

Enfin, si initialement les études de phylogéographie étaient réalisées avec l'ADN mitochondrial (Avice, 1998), il est maintenant acquis que l'ADN nucléaire peut être utilisé (Hare, 2001 ; Zhang et Hewitt, 2003).

**Comme nous venons de le voir, étudier la diversité génétique est fondamental pour mieux connaître une espèce. Je vais maintenant tenter de donner un aperçu des études biochimique et moléculaire qui ont fourni de nouveaux outils d'identifications des truffes, mais aussi une idée sur la diversité génétique de quelques espèces de *Tuber*.**

#### 1.4.2 Les nouveaux outils d'identification des *Tuber*

Les truffes ont donné lieu à un certain nombre d'études et cela depuis plusieurs siècles (§ 1.1.3). Elles se sont basées, dans un premier temps, sur l'observation des différentes espèces au microscope et à la réalisation de clefs pour l'identification de celles-ci. Ces clés sont basées sur les caractéristiques du péridium (aspect, couleur, dimensions) et sur celles des spores (forme, ornementation). Cependant il persiste quelques cas où les similitudes morphologiques rendent l'identification difficile, c'est le cas pour *T. aestivum*-*T. uncinatum*, *T. brumale*-*T. moschatum*, *T. melanosporum*-*T. hiemale* (Figure 3 ; Chevalier et al., 1985 ; Rioussset et al., 2001). Ces problèmes sont d'autant plus importants si l'on souhaite identifier les mycorhizes et non les ascocarpes. C'est pourquoi, depuis le début des années 1980, des techniques biochimiques mais aussi moléculaires ont été mises au point pour l'identification des *Tuber*.

### 1.4.2.1 Méthodes Biochimiques

#### **Analyse des protéines totales**

Mouchès et al. (1978) ont montré que l'analyse électrophorétique monodimensionnelle des protéines constitutives des corps fructifères peut être utilisée comme critère taxonomique chez les champignons supérieurs. Dans le cas des truffes, Mouchès et al. (1978, 1981) ont trouvé que chaque espèce de *Tuber*, identifié morphologiquement, correspond à un profil électrophorétique spécifique. D'autre part, l'analyse bidimensionnelle des protéines de *T. melanosporum* et *T. moschatum* montre que seulement 55% des protéines ont une migration identique d'une espèce à l'autre (Mouchès et al., 1981).

*Cette méthode a permis de différencier Tuber melanosporum, T. moschatum, T. brumale, T. excavatum et même T. uncinatum de T. aestivum, ce qui n'est pas le cas avec d'autres méthodes, comme nous le verrons ultérieurement (Encadré 10).*

Dupré et al. (1985) ont repris les analyses de Mouchès et al. (1978, 1981) avec un plus grand nombre d'échantillons français et italiens. L'analyse monodimensionnelle confirme les résultats antérieurs pour quatre espèces déjà étudiées : *Tuber melanosporum*, *T. uncinatum*, *T. excavatum*, *T. aestivum* ; mais aussi pour cinq nouvelles espèces : *T. macrosporum*, *T. magnatum*, *T. malençonii*, *T. mesentericum* et *T. rufum*. En revanche, les résultats divergent pour *T. brumale* et *T. moschatum*, ils confirment leur appartenance à la même entité (Dupré et al., 1985).

Dupré (1997) s'est intéressée au profil polypeptidique du mycélium de neuf isolats de *Tuber*. Comme dans le cas des ascocarpes, le spectre protéinique des mycéliums peut constituer un critère d'identification. Cependant, il a été impossible d'établir une correspondance entre les profils protéiniques provenant des ascocarpes et ceux des cultures mycéliennes (Dupré, 1997). Ceci montre bien que le métabolisme est différent dans ces deux phases du cycle biologique des truffes (cf. § 1.3). En revanche, l'utilisation de cette technique au niveau des mycorhizes pose des problèmes pouvant être dus à l'interaction entre le champignon et la plante (Dupré, 1997).

*Donc, l'analyse des protéines totales a permis l'identification des corps fructifères de plusieurs espèces de Tuber, mais cette technique n'a pu être utilisée au niveau des mycorhizes. Cependant, elle pose pas mal de problèmes puisque les profils sont souvent difficiles à interpréter, elle nécessite de grandes quantités de matériel et les résultats peuvent varier en fonction de l'état physiologique du matériel. Elle a donc été rapidement*