



Marc-André Selosse
BIOLOGISTE, MUSÉUM NATIONAL
D'HISTOIRE NATURELLE, PARIS
*Professeur au Muséum national d'histoire naturelle
(MNHN), il est spécialiste en botanique et mycologie.*



Liam Laurent-Webb
AGRONOME, MUSÉUM NATIONAL
D'HISTOIRE NATURELLE, PARIS
*Il est actuellement en thèse à l'Institut de systématique,
évolution, biodiversité du MNHN.*

Les truffes naissent-elles de père inconnu ?

Si les truffes sont des trésors de saveurs, elles recèlent également bien des surprises au plan biologique, comme le rôle déterminant des limaces dans le transport et l'aide à la germination de leurs spores, les liens ténus et fondamentaux qu'elles entretiennent avec les arbres mais aussi avec les plantes herbacées alentour. Leur reproduction sexuée commence à être élucidée. Mais, pour l'heure, on ne trouve pas de trace du père, autre que génétique.

Depuis la naissance de la trufficulture, au milieu du XIX^e siècle, la truffe est un joyau de notre gastronomie. Pourtant, sa production a énormément baissé : d'un millier de tonnes par an vers 1900 en France, elle n'est plus que de quelques dizaines de tonnes aujourd'hui. La France, l'Italie et l'Espagne fournissent à elles seules 99 % de la production mondiale. L'explication définitive à ce déclin n'est pas claire : changement de climat, baisse de l'activité rurale... Cachées à l'intérieur du sol, les truffes ont longtemps conservé

leurs secrets. Depuis une vingtaine d'années, des équipes de biologistes – essentiellement en France – se sont intéressées à ce champignon apprécié mais méconnu, et reprennent à la base la compréhension de son écologie. Des études génétiques ont notamment permis de mieux comprendre sa reproduction, et ont révélé la présence génétique d'un père... qui reste pour l'heure introuvable sur le terrain ! Le rôle des animaux dans la dissémination des spores et leur germination a aussi été précisé. Enfin, leur lien avec les arbres et les plantes herbacées est plus fort qu'on ne l'imagine. Autant de pistes qui permettent de découvrir un champignon à la biologie complexe et originale.

◀ *La truffe du Périgord est le premier champignon comestible dont le génome a été entièrement séquencé, en 2010.*

FOTORESEARCH RM / AGEFOTOSTOCK - RD - DR

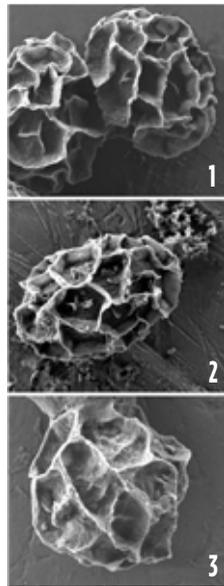
Bien qu'il existe plus de 180 espèces de champignons souterrains du genre *Tuber*, toutes présentes dans l'hémisphère Nord, nous en consommons essentiellement trois. Surtout collectée en Italie du Nord, la truffe blanche du Piémont (*Tuber magnatum*) voit son prix atteindre 5 000 €/kg. Dans tout le sud de l'Europe, deux truffes de couleur noire sont ramassées : la truffe du Périgord (*Tuber melanosporum*), la plus méridionale et la plus prisée, dont le prix atteint 1 000 €/kg, et la truffe de Bourgogne (*Tuber uncinatum*), plus septentrionale, qui se vend à 400 €/kg environ. La partie charnue que nous consommons est en fait l'organe reproducteur – ou fructification, ou encore ascocarpe –, qui comporte les spores destinées à être dispersées. Son développement est paradoxal car ces spores n'ont pas accès au vent ! Alors que les autres champignons produisent des fructifications aériennes, libérant les spores dans l'air – comme les lames des champignons de Paris ou les tubes des cèpes – la truffe souterraine a une stratégie de dispersion complètement différente, reposant sur l'ingestion par des animaux. Les spores, à paroi épaisse, résistent à la digestion et sont dispersées dans les excréments (1) ! Le développement des fructifications correspond à des saisons où, la nourriture étant peu abondante, les animaux fouillent le sol pour se nourrir. Soit à l'automne pour les truffes du Piémont et de Bourgogne, et jusqu'en hiver pour la truffe du Périgord. Cela explique que les truffes soient toutes comestibles et odorantes, ce qui attire les disperseurs.

Comment repérer les truffes ? Une légende tenace a longtemps attribué l'attraction des cochons et des sangliers envers les truffes à l'émission d'une hormone sexuelle mâle, l'androstérone. Or, dès 1990, l'équipe de Michel Kulifaj, de l'université de Toulouse, a enterré des leurres imprégnés d'androstérone ou de sulfure de diméthyle et montré que seuls les seconds, qui n'ont rien de sexuel, étaient détectés par les cochons et des chiens (2). Ainsi, c'est bien ce composé chimique volatil présent dans de nombreuses truffes – ainsi que d'autres comme le bis(méthylthio)méthane dans la truffe du Piémont – qui confèrent son odeur si caractéristique au champignon. Les produits industriels dits « truffés » ou « à l'arôme de truffe » ne contiennent d'ailleurs souvent que ces compo-

sés. Autre curiosité : la production naturelle de la truffe ne provient pas de gènes particuliers, mais uniquement de l'activité accrue de certains d'entre eux présents dans de nombreuses autres espèces de champignons, comme l'ont montré Claude Murat et ses collègues de l'Inrae de Nancy en 2018 (3).

LES INVERTÉBRÉS SONT DE MEILLEURS DISPERSEURS QUE LES MAMMIFÈRES

Si l'on considère la faible valeur alimentaire des fructifications, dont la masse est dominée par des spores non digests, on peut se demander si la truffe n'abuse pas les animaux : elle les manipule en effet par son parfum sans pour autant être particulièrement nourrissante. En mesurant les grandes surfaces de truffières développées par l'humain, pour qui la truffe n'est pourtant qu'un condiment, on entrevoit bien l'ampleur qu'a prise aujourd'hui cette manipulation ! Outre les sangliers et les rongeurs, de nombreux invertébrés se nourrissent en effet de ce mets. Certains en font même leur repas exclusif, comme une grosse mouche (*Suillia gigantea*) qui y pond ses œufs : l'insecte peut ainsi servir à repérer les fructifications, au risque que celles-ci soient véreuses. Le coléoptère *Liodes cinnamomea* dévore les truffes et y creuse des cavités profondes, au grand dam des trufficulteurs qui utilisent des pièges contenant des phéromones sexuelles pour détourner l'insecte. D'autres invertébrés font de la truffe un complément à leur alimentation : nous avons ainsi récemment étudié, avec des équipes italiennes, le cas des limaces et leur rôle dans la dissémination des spores (4). Nous avons étudié en particulier *Deroceras invadens*, abondante en Europe. Nous avons d'abord montré la présence de l'ADN de truffe dans le tube digestif des limaces que nous avons ramassées dans les truffières – qui représente parfois 100% de l'ADN de champignon détecté, alors qu'il n'y en a pas dans celui des mêmes mollusques collectés sur des sites éloignés ! Cela suggère que les spores restent vivantes malgré l'ingestion. Étudiée au microscope à force atomique, la paroi de ces spores est apparue modifiée, en particulier plus lisse et de composition moins homogène que celle de spores intactes

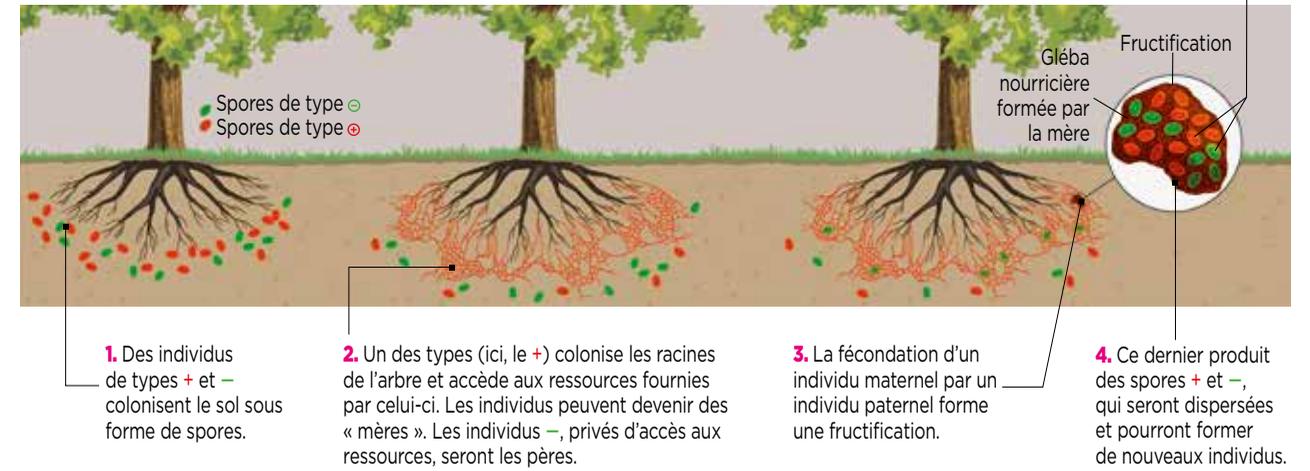


▲ Comparaison entre des spores contrôle (1), avalées par des souris (2) ou ingérées par des limaces (3). Dans ce troisième cas, elles sont moins altérées malgré l'ingestion, en raison d'une meilleure action de leurs enzymes digestives.

CYCLE DE REPRODUCTION DE LA TRUFFE

La nécessité d'une fécondation entre deux individus a été corroborée par la découverte de gènes de type sexuel. Il en existe deux variantes (+ et -). Un individu + ne peut féconder qu'un individu -, et vice-versa. La fructification (organe reproducteur) contient un mélange de spores + et -, selon le type sexuel qu'elles ont hérité des parents.

Spores + et - formées après la fécondation. Elles comportent de l'ADN des deux parents.



ou ingérées par des souris. Nous avons même montré que le transit dans le tube digestif de la limace accroît la capacité des spores à germer : nous pensons que cela est dû à une meilleure action des enzymes digestives du mollusque. En effet, pour se nourrir, la limace gratte la surface des aliments à l'aide d'une langue râpeuse, la radula. Résultat : Les spores sont mieux libérées que lors de la mastication par la souris. Les enzymes digestives ont donc un accès plus direct à la paroi de celles-ci. Et les modifications qui résultent de ces actions enzymatiques amélioreraient la germination des spores. Cette meilleure maturation des spores par des invertébrés comme les limaces expliquerait une autre particularité de la truffe. L'étude de la variabilité génétique de ce champignon, menée dans notre équipe par Elisa Taschen entre 2013 et 2016, a en effet révélé que, si les individus voisins sont génétiquement proches, les différences augmentent vite avec la distance, dès le premier mètre (5). Un argument qui suggère que la dissémination s'effectue d'abord grâce aux invertébrés. En effet, les dispersions des spores par les mammifères se font sur des grandes distances et devraient homogénéiser les populations. En revanche, avec les inver-

trébrés comme les limaces, la maturation des spores est plus efficace, et ces dernières sont transportées moins loin, ce qui conserve des différenciations génétiques à faible distance. Les mammifères seraient alors des utilisateurs indécis (en tout cas peu utiles) d'une dispersion qui a évolué surtout avec des invertébrés...

L'ARBRE EST LA SOURCE MAJEURE DE LA BIOMASSE DES FRUCTIFICATIONS

Transitoire, la fructification est nourrie et développée par la partie pérenne du champignon : des filaments souterrains microscopiques, que l'on appelle des hyphes. Le réseau des hyphes forme le mycélium. On sait que les truffes poussent sous les chênes mais aussi sous les charmes et noisetiers, voire les pins. Vers 1880, un ministre prussien de l'agriculture posa ainsi la question de la nature du lien entre truffes et arbres au biologiste allemand Albert Frank. Celui-ci observa alors que certains filaments du mycélium sont associés physiquement aux racines des arbres. Ce fut une découverte primordiale, car cette association est pratiquée par bien d'autres espèces de champignons ! Il nomma mycorhize cette structure mixte,

CREDIT PHOTO

SYLVIE DESERT

mêlant filaments fongiques et racines (du grec *mukes*, champignon, et *rhiza*, racine). La mycorrhize est vitale pour les deux partenaires : le champignon explore le sol et y prélève de l'eau et des sels minéraux (azote, potassium et phosphore) qu'il partage avec la plante, tandis que celle-ci lui fournit du sucre et sans doute des vitamines. La fructification des truffes est reliée aux mycorrhizes par des filaments très ténus : on a même pu penser qu'elle perdait rapidement toute connexion au reste du mycélium et se nourrissait directement de la matière organique morte du sol. Toutefois, entre 2013 et 2018, des travaux sous la direction de François Le Tacon, de l'Inrae de Nancy, ont prouvé le contraire (6). Si l'on marque les produits de la photosynthèse d'un arbre à l'aide d'un isotope rare du carbone, le carbone 13, on retrouve ce carbone marqué dans les mycorrhizes puis dans les fructifications qui se développent sous l'arbre. En revanche, si l'on introduit dans le sol des feuilles mortes enrichies en carbone 13, les fructifications n'en contiennent pas. Preuve que c'est bien l'arbre qui, via les mycorrhizes, est la source majeure de la biomasse des fructifications. D'ailleurs, ces travaux ont culminé avec l'observation, en 2018, du lien de la fructification au mycélium d'une façon rocambolesque : un spéléologue, intrigué par de petites boules noires pendant au plafond d'une grotte de l'Oise, a permis de découvrir de petites fructifications précisément suspendues par ces liens !

LES SPORES SONT BIEN LE PRODUIT DE LA FÉCONDATION ENTRE DEUX INDIVIDUS

Comment savoir à quel individu appartient une mycorrhize ou une fructification ? La réponse a été donnée via des techniques génétiques révélant des portions du génome variables entre individus, les microsatellites. Grâce à l'analyse de ces derniers, nous avons montré que les mycorrhizes voisines des fructifications semblent formées par le même individu que celui de la fructification... à un détail près. En effet, des extractions profondes, capables de détruire la paroi résistante des spores, ont révélé la présence de l'ADN d'un second individu ! Les spores sont donc le produit... de la fécondation entre deux individus. Le premier

Les pères sont indétectables, alors qu'ils devraient vivre aux côtés des mères



▲ Autour des arbres truffiers, on trouve une zone pauvre en végétation, appelée « brûlé ». Ce phénomène résulte de la colonisation des plantes herbacées par la truffe.

– considéré comme la mère – forme et nourrit aussi la fructification, et son mycélium est présent sur les mycorrhizes voisines où il se nourrit. Le second ne donne que des gènes ; c'est le père. Père et mère sont génétiquement très proches et, comme les individus voisins sont génétiquement proches, le père est donc sans doute dans l'environnement immédiat de la mère. Pourtant, nos tentatives pour retrouver les traces du père chez la truffe du Périgord et celle de Bourgogne sont restées vaines : on ne détecte jamais son ADN sur les mycorrhizes voisines ! Nous nous sommes demandé si l'écologie des pères n'était donc pas un peu différente. Il existe, en effet, un phénomène qui suggère que la truffe interagit avec de petites plantes herbacées. Autour des arbres abritant de la truffe, il existe ainsi une zone de végétation rabougrie, peu dense et faite d'herbes mal développées appelée « brûlé » car elle semble incendiée : la composition de la végétation est la même qu'aux alentours, mais elle est moins dense et les individus sont plus chétifs. Lors de sa thèse dans notre équipe, entre 2016 et 2019, Laure Schneider-Maunoury a cherché à savoir si la truffe interagissait directement avec les racines de ces plantes, et si l'on trouvait là ces pères invisibles par ailleurs (7). Elle a d'abord détecté de l'ADN sur les racines de ces plantes, appartenant à des espèces variées. Puis, avec Aurélie Deveau de l'Inrae de Nancy, nous avons développé une méthode permettant de colorer les filaments de truffe : l'hybridation in situ en fluorescence. Dans cette méthode, un fragment d'ADN dont la séquence est propre à l'espèce recherchée est marqué à l'aide d'un colorant fluorescent, puis déposé sur des coupes des racines fines. Là, après un traitement adapté,

il s'attache à des fragments d'ADN présentant une séquence identique, s'il y en a, et les rend fluorescents. Cette méthode a révélé des filaments de truffe colonisant les racines et grandissant entre les cellules racinaires sans y pénétrer. Il ne s'agit pas de mycorrhizes : la structure n'est pas organisée et les filaments de truffe sont plutôt épars. Aucun symptôme ni aucune déformation n'affecte ces racines : on parle d'une colonisation endophyte. Pour étudier d'éventuels liens physiologiques avec les truffes, nous avons enfin réalisé des expériences en pot, mettant des plantes herbacées en contact avec des chênes verts mycorrhisés ou non par la truffe du Périgord. Nos observations suggèrent un lien : d'une part, les hyphes de truffe noire sont deux fois plus abondants dans le sol en présence de plantes herbacées ; d'autre part, la présence de truffe réduit de 40 % le développement de ces plantes et les appauvrit en azote et en phosphate (8). Bien plus, en présence de truffe, le nombre de germinations de mauvaises herbes dans les pots est réduit de près de 25 % !

NOTRE MAÎTRISE DE LA PRODUCTION DE TRUFFE RESTE IMPARFAITE

Cette interaction sans doute parasitaire avec les plantes herbacées a complexifié notre vision de l'écologie de la truffe. On ne connaît pas encore en détail les échanges, ni leur rôle dans l'alimentation du champignon, mais cela explique l'origine du brûlé. Les pères se trouvent-ils sur les racines des plantes herbacées, comme nous l'espérons ? Malheureusement, les typages génétiques n'ont détecté que les ADN des mères voisines, et non ceux des pères ! Comment donc expliquer que ces pères soient indétectables, alors que, proches génétiquement des mères, ils devraient vivre à leurs côtés ? Bien que d'autres compartiments du sol restent à explorer, les études réalisées sur des populations de truffes du Périgord et de Bourgogne, autant par notre équipe que par d'autres en France et en Italie, suggèrent une piste. Le suivi de parcelles truffières sur plusieurs années a révélé que les individus femelles forment souvent plusieurs fructifications et peuvent persister plusieurs années : cela suggère que leur mycélium est bien établi, pérenne et couvre plusieurs dizaines de centi-

mètres carrés. À l'inverse, les pères ne sont, la plupart du temps, détectés que sur une seule fructification et durant une seule année. Pour expliquer cette fugacité, nous avons proposé que des spores restées dans le sol fécondent, en germant, les grands individus déjà établis. Ces petites germinations (de tout petits mycéliums, peut-être même pas connectés aux plantes voisines) n'auraient pas les ressources pour nourrir une fructification ; de plus, sur place, la concurrence des individus déjà établis doit être forte. Mais elles peuvent se comporter en mâles, avant de disparaître après la fécondation. L'une de nos découvertes récentes soutient cette possibilité. Des examens systématiques du sol en fin de saison dans des truffières ont révélé que près de 40 % des fructifications restent dans le sol, non récoltées (9) sans que l'on sache vraiment pourquoi : elles ont pu être « oubliées » par les chiens des trufficulteurs, ou ont « mal » mûri et n'ont jamais émis d'odeur. Mais elles accumulent des spores dans le sol, susceptibles de germer et de féconder leurs grands voisins. Au passage, cela expliquerait pourquoi les pères et les mères sont génétiquement proches, car ces spores non déplacées ont souvent pour mère... l'individu qu'elles fécondent ! Cela expliquerait la forte consanguinité entre parents observée chez les truffes.

Ces nouvelles découvertes enrichissent notre vision de ces champignons qui ont mis en place, au cours de leur évolution, de très nombreux liens d'entraide ou d'exploitation avec des espèces végétales ou animales. L'un de ces liens, le plus récent, reste encore très aléatoire : celui à l'humain. En effet, notre maîtrise de la production de truffe reste imparfaite. Bien sûr, l'inoculation de la truffe sur de jeunes arbres avant leur installation en truffière a été un progrès : 80 % des truffes de Bourgogne et du Périgord proviennent aujourd'hui de la plantation de tels arbres truffiers. L'inoculation de la truffe blanche du Piémont vient tout juste d'être maîtrisée par des équipes de l'Inrae. Mais il reste à faire. Les travaux récents, qui suggèrent un rôle des invertébrés dans la germination des spores, ou l'importance des herbacées dans la nutrition du mycélium, permettront peut-être d'utiliser demain les interactions de la truffe avec les organismes qui les entourent. ■

40 %

DES FRUCTIFICATIONS échappent à la récolte. Elles accumulent des spores dans le sol, susceptibles de germer et de féconder les grands individus déjà établis.

(1) S. Schickmann *et al.*, *Oecologia*, 170, 395, 2012.

(2) T. Talou *et al.*, *Mycol. Res.*, 2, 277, 1990.

(3) C. Murat *et al.*, *Nat. Ecol. Evol.*, 12, 1956, 2018.

(4) F. Ori *et al.*, *Fungal Biol.*, 125, 796, 2021.

(5) E. Taschen *et al.*, *Mol. Ecol.*, 25, 5611, 2016.

(6) F. Le Tacon *et al.*, *PLoS ONE*, 8, e64626, 2013.

(7) L. Schneider-Maunoury *et al.*, *New Phytol.*, 225, 2542, 2019.

(8) E. Taschen *et al.*, *Plant Soil*, 446, 577, 2020.

(9) L. Schneider-Maunoury *et al.*, *Mycorrhiza*, 29, 663, 2019.