



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-memoires-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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Master 2 Biotechnologies, Microbiologie, Aliment, Nutrition, Environnement
Spécialité Biotechnologies Microbiennes

Facultés des Sciences et Techniques
Université de Lorraine
VANDOEUVRES-LES-NANCY

Caractérisation fonctionnelle des communautés bactériennes associées à la truffe noire du Périgord au cours de son cycle de vie

11 Janvier – 11 Juillet 2014

Océane NICOLITCH

Encadré par Aurélie Deveau et Stéphane Uroz (Chargés de
recherches)

Au sein de l'UMR 1136 « Interactions Arbres – Microorganismes »
du Centre INRA de NANCY



Table des matières

I. Introduction	1
1. Biologie de la truffe	2
a. Taxonomie.....	2
b. La truffe, un champignon symbiotique	2
c. Développement et morphologie de l'ascocarpe.....	3
d. Cycle de vie de la truffe noire du Périgord	3
2. Fonctionnement d'une truffière artificielle	4
a. La mycorhization contrôlée	4
b. Entretien du terrain.....	4
3. La truffe, un habitat spécifique pour les bactéries	5
a. Les facteurs potentiels de sélection bactérienne	6
b. Rôles potentiels des bactéries dans le cycle de vie de la truffe	7
c. Rôles potentiels des bactéries associées aux truffes sur l'arôme	8
4. Objectifs du stage.....	9
II. Matériels et méthodes	10
1. Préparation des échantillons	10
2. Identification des souches testées	10
3. Tests fonctionnels sur milieux gélosés.....	11
4. Tests enzymatiques en microplaques.....	12
5. Assimilation d'azote par les bactéries associées aux truffes.....	12
a. Recherche des séquences <i>nifH</i>	12
b. Assimilation d'azote <i>in vitro</i>	13
5. Tests d'antibiose	14
6. Applications des résultats en truffière expérimentale	14
III. Résultats.....	16
1. Analyse taxonomique.....	16
2. Représentativité de l'approche cultivable.....	16
3. Potentiels nutritionnels des souches colonisant l'ascocarpe.....	17
a. Mobilisation des composés inorganiques.....	17
i) Potentiel de solubilisation du phosphate inorganique	17
ii) Potentiel de chélation du fer	17
iii) Potentiel de fixation de l'azote atmosphérique	18
b. Dégradation de la matière organique	19
i) Potentiel de dégradation de la cellulose.....	19
ii) Potentiel de dégradation de l'hémicellulose	21
iii) Potentiel de mobilisation du phosphate organique.....	22
4. Rôle potentiel des bactéries dans la libération des spores.....	22
5. Rôle potentiel des Actinomycètes dans la structuration des communautés microbiennes associées à la truffe noire.....	24
6. Application possible des bactéries en trufficulture	24
IV. Discussion.....	25
1. Représentativité de l'approche cultivable.....	25
a. Facteurs de sélection des communautés microbiennes.....	26
b. Potentiels nutritionnels des souches bactériennes colonisant la truffe	26
a. Mobilisation des composés inorganiques.....	27
b. Dégradation de la matière organique	28
c. Rôle potentiel des bactéries dans la libération des spores	29
CONCLUSION	30

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements à mes tuteurs Aurélie Deveau et Stéphane Uroz, Chargés de Recherche, pour la confiance qu'ils m'ont accordé. Ils m'ont donné goût à la recherche et ont su se montrer disponibles à travers leurs relectures minutieuses et leurs conseils avisés sans quoi je n'aurais pas pu mener ce projet à terme.

Je souhaite également remercier Béatrice Palin, Technicienne, pour son aide lors de mes expérimentations, Aimee Orsini pour son soutien en anglais, Cyril Bontemps pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir fourni des conseils précieux, ainsi que l'ensemble des scientifiques que j'ai côtoyé pour m'avoir épaulé tout au long de ce projet.

Tout particulièrement, je souhaite aussi remercier mes camarades de bureau dont la présence a également participé en grande partie au bilan positif de cette expérience.

Abréviations

CAS : Chrome Azurol S

CMC : Carboxymethyl Cellulose Medium

CYM : Chitin Yeast Medium

HDTMA : HexaDecylTriMethyl-Ammonium bromide

HT : Hickey Tresner

INRA : Insitut National de Recherche Agronomique

KB : King B

NCBI : National Center for Biotechnology Information

PCR : Polymerase Chain Rection

RDP : Ribosomal Database Project

TBE : Tris Borate EDTA

TCP : Tri-calcium Phosphate

TSA : Tryptic Soy Agar

I. Introduction

Les truffes sont des champignons ascomycètes ectomycorhiziens réalisant leur cycle de vie dans le sol. Certaines espèces sont reconnues dans le monde entier pour leur valeur gastronomique et leur réputation de produit de luxe (Hall *et al*, 2007) comme *Tuber melanosporum* la truffe noire du Périgord, *Tuber aestivum* la truffe de Bourgogne, *Tuber magnatum* la truffe blanche d'Alba et *Tuber borchii* la truffe blanchette. En particulier, la délicatesse de l'arôme et la rareté de la truffe Noire du Périgord ou « diamant noir » en font un produit d'exception à haute valeur marchande très convoité, dont le prix au kilo peut atteindre jusqu'à 2500 euros sur certains marchés, bien que son prix moyen en 2012 était d'environ 800 euros le kilo (Olivier *et al*, 2012). La France, l'Italie et l'Espagne sont les principaux producteurs mondiaux puisque la truffe noire se développe préférentiellement en climat méditerranéen. Cependant, actuellement la production de truffes en France est moindre par rapport à celle du début du siècle dernier. En effet, en 1914 la France a produit 985 tonnes de truffes, mais l'industrialisation de l'agriculture ainsi que la préférence des agriculteurs pour des modes de culture à court terme, l'exode rural et le reboisement par manque d'entretien des truffières naturelles ont beaucoup affecté ce rendement en augmentant les surfaces de forêts « fermées » et en favorisant ainsi d'autres espèces fongiques. En effet, de nos jours la production française annuelle de truffes n'est estimée qu'à environ 50 tonnes, avec des variations pouvant aller de 15 à 70 tonnes selon les années (Olivier *et al*, 2012). La production reste en effet aléatoire puisqu'elle est étroitement liée aux aléas climatiques, la truffe étant sensible à la sécheresse et au gel. Cependant, les variations climatiques n'expliquent pas entièrement les aléas de la production et de nombreux facteurs restent encore méconnus (Le Tacon *et al*, 2014). Afin de limiter les variations naturelles de la production dues à une mycorhization trop faible et aléatoire, dès 1973 les centres INRA de Bordeaux et Clermont-Ferrand ont développé des plants truffiers qui ont ensuite été commercialisés sous licence, permettant ainsi de palier au déclin de la production truffière en augmentant considérablement le nombre de plantations en France (Olivier *et al*, 2012). Ainsi, chaque année, environ 1 000 ha sont plantés, soit environ 300 000 arbres (Rousset-Rouard *et al*, 2008), et les truffières naturelles ne représentent plus que 10% de la production totale (Mello *et al*, 2006). Malgré une inversion de la tendance ces dernières années, la production truffière est encore bien loin d'avoisiner les 1 000 tonnes par an du début du siècle, alors que la surface ne cesse de s'étendre et que la France compte quelques 20 000 trufficulteurs. Bien que la mycorhization contrôlée permette une meilleure production dans les truffières artificielles, la plantation d'arbres truffiers reste encore trop souvent infructueuse et de nombreux facteurs responsables de la

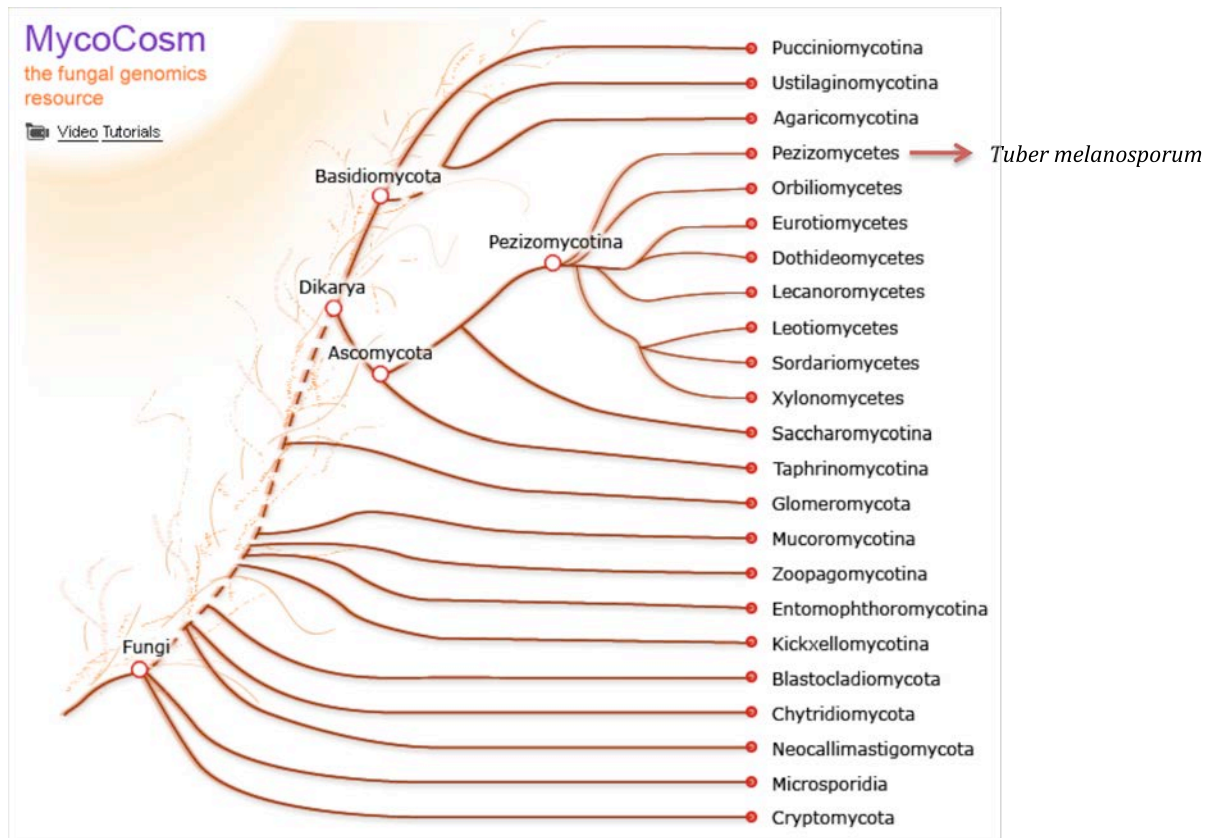


Figure 1 : Situation de la truffe noire du Périgord *Tuber melanosporum* dans la classification des champignons (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) : Les truffes font parties des Eumycètes, ils appartiennent à la classe des Septomycètes et au groupe des Actinomycètes.



Figure 2 : Observation à la loupe binoculaire de mycorhizes de *Tuber melanosporum* résultant de l'inoculation d'un plan de charme (Claude Murat)

formation des corps fructifères restent encore à découvrir. Notamment, ces dernières années, il a été découvert que les différentes espèces de truffes hébergeaient entre un et dix millions de bactéries (Barberi *et al*, 2007). Plusieurs séries de travaux menés sur les truffes blanches *T. borchii* et *T. magnatum* suggèrent que ces microorganismes pourraient avoir un impact sur le cycle de vie de leur hôte (Sbrana *et al*, 2002 ; Barbieri *et al*, 2007). Moins d'informations sont disponibles concernant la truffe noire *T. melanosporum*. Une étude récemment réalisée au sein de mon laboratoire d'accueil a montré que *T. melanosporum* était aussi étroitement associée à des communautés bactériennes complexes (Antony-Babu *et al*, 2013). Toutefois l'impact de ces communautés bactériennes sur le cycle de vie du champignon reste inexploré et a été l'objet de mes travaux de recherche.

1. Biologie de la truffe

a. Taxonomie

Les truffes forment une vaste famille, dont le genre *Tuber* comprend 227 espèces répertoriées (Olivier *et al*, 2012). Elles font partie des champignons « vrais » : les Eumycètes (*cf. figure 1*). En effet, ce sont des Eucaryotes pluricellulaires hétérotrophes qui ne produisent pas de chlorophylle. Plus précisément, ils appartiennent à la classe des Septomycètes puisqu'ils possèdent des hyphes septés. Enfin, ce sont des Ascomycètes car ils forment des spores à l'intérieur d'asques, permettant ainsi leur propagation (Riousset, 2001). Parmi toutes les espèces de truffes connues, les plus prisées sont la truffe blanche du Piémont *T. magnatum* et la truffe noire du Périgord *T. melanosporum*, aux intérêts culinaires prestigieux qui leur permettent de dominer les marchés (Martin *et al*, 2010). Toutefois, d'autres truffes telles que la truffe de Bourgogne *T. aestivum/uncinatum*, *T. brumale*, *T. mesentericum* et *T. borchii* sont également commercialisées. Les aires de répartition de ces différentes espèces varient d'une espèce à l'autre : *T. magnatum* et *T. melanosporum* sont naturellement présentes essentiellement dans le sud de l'Europe alors que les truffes mésentériques et de Bourgogne sont retrouvées plus au nord, notamment en Lorraine.

b. La truffe, un champignon symbiotique

Les truffes sont des champignons hypogés, dont l'appareil végétatif, issu de la germination des ascospores, comporte des filaments haploïdes ramifiés très fins formant le mycélium en 6 à 12 semaines, qui se développent dans le sol et puise les nutriments dont il a besoin, mais aussi pour rejoindre de jeunes racines hôtes (Riousset *et al*, 2001). En effet, la truffe forme des mycorhizes, c'est-à-dire des associations symbiotiques étroites avec l'appareil racinaire de certains arbres (*cf. figure 2*). Plus précisément, c'est un champignon ectomycorhizien, c'est-à-dire qu'il entoure les racines d'espèces ligneuses en formant un manchon : le réseau de Hartig, sans toutefois pénétrer les cellules ni la partie centrale de la racine (Hacquard *et al*, 2013). Il possède un large spectre



Figure 3 : Photographie d'un chêne pédonculé présentant un brûlé caractéristique dû à la mycorhization par *Tuber melanosporum* (Claude Murat)

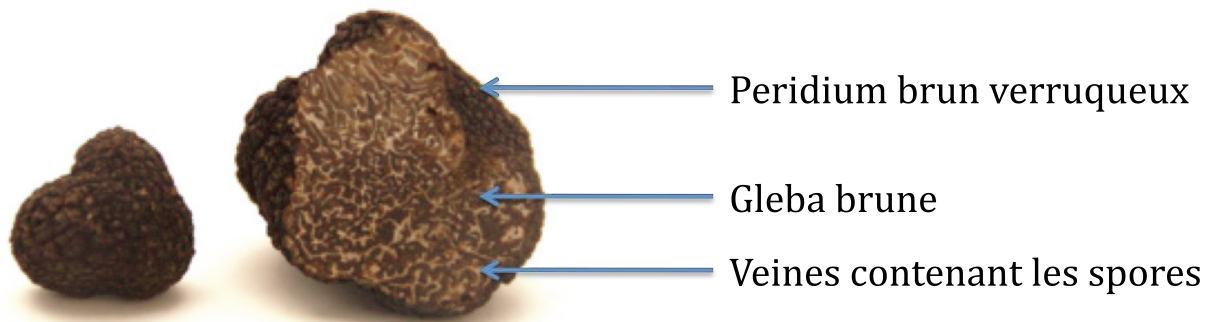


Figure 4 : Observation d'une coupe d'ascocarpe de *Tuber melanosporum* montrant ses différents tissus (<http://www.truffeculture.com/>) : On observe ici le peridium verruqueux noir brunâtre et la gleba blanche puis brune à maturité contenant des veines fines et nombreuses, rougeâtres à maturité.

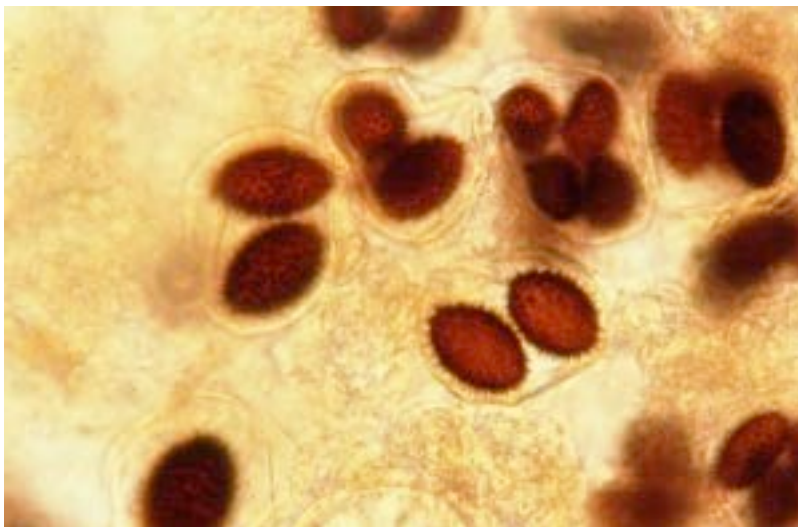


Figure 5 : Observation microscopique de spores de *Tuber melanosporum* contenues dans des asques (www.depinierestenoux.fr/)

d'hôtes, s'associant notamment au chêne, arbre assurant la meilleure production, mais aussi au noisetier, qui a l'avantage d'avoir une croissance rapide. On peut également le retrouver en association avec de charmes, tilleuls, bouleaux, cistes, châtaigniers, pins ou cèdres (Riousset *et al*, 2001). Ces derniers sont de faibles consommateurs d'eau, ce qui est favorable au développement des corps de fructification des truffes (Rousset-Rouard *et al*, 2008).

Cette interaction permet d'une part au champignon de bénéficier des réserves glucidiques de l'arbre acquises au cours de la photosynthèse, et lui procure donc un apport en carbone (Gryndler *et al*, 2013). D'autre part, l'arbre tire bénéfice de cette association à travers l'apport en nutriments, la truffe apporte également une certaine protection vis-à-vis des stress qui pourraient survenir (hydrique, toxicité des métaux, parasites) (Olivier *et al*, 2012). Autour des arbres hébergeant des *Tuber*, on peut généralement observer des zones caractéristiques sans végétation, les « brûlés » (Mello *et al*, 2010). Ces brûlés pourraient être dus à certains métabolites et composés volatiles toxiques produits par les truffes qui auraient un effet herbicide et pourraient aussi changer les propriétés édaphiques du sol, inhibant ainsi le développement des plantes voisines (*cf. figure 3*). Cet effet allélopathique aurait pour conséquence de diminuer la compétition pour l'eau et les nutriments vis-à-vis des herbacés et des Basidiomycètes (Mello *et al*, 2010).

c. Développement et morphologie de l'ascocarpe

A partir des filaments mycéliens de la truffe, se forme le jeune ascocarpe appelé primordium, c'est-à-dire la partie reproductrice du champignon (Riousset *et al*, 2001). Il est constitué d'une partie centrale, la gleba, marbrée de lignes sinueuses formant les veines à l'intérieur desquelles se forment les asques et les ascospores au cours de la maturation (Riousset *et al*, 2001). La partie externe est formée par le peridium, constitué de cellules mortes faisant partie de l'appareil végétatif.

Chez *T. melanosporum*, décrite pour la première fois en 1831 par Vittadini, l'ascocarpe est arrondi ou irrégulier, mesurant généralement entre 2 et 10 cm (*cf. figure 4*). Il est constitué d'un peridium verruqueux noir brunâtre et d'une gleba blanche puis brune à maturité contenant des veines fines et nombreuses, rougeâtres à maturité (Olivier *et al*, 2012). On peut la différencier des autres espèces moins prisées par son odeur de musc et d'humus, mais aussi par observation microscopique des spores, qui sont ellipsoïdes et brun sombre. On peut aussi réaliser une PCR afin de différencier les espèces les plus semblables, comme *T. melanosporum* et *Tuber indicum*. On en compte entre une et six par asque (*cf. figure 5*) (Riousset *et al*, 2001).

d. Cycle de vie de la truffe noire du Périgord

Chez *T. melanosporum*, la germination des spores se fait en mars, puis le mycélium croît et rejoint les racines. La formation des « truffettes » commence alors dès le mois de juin, puis celles-

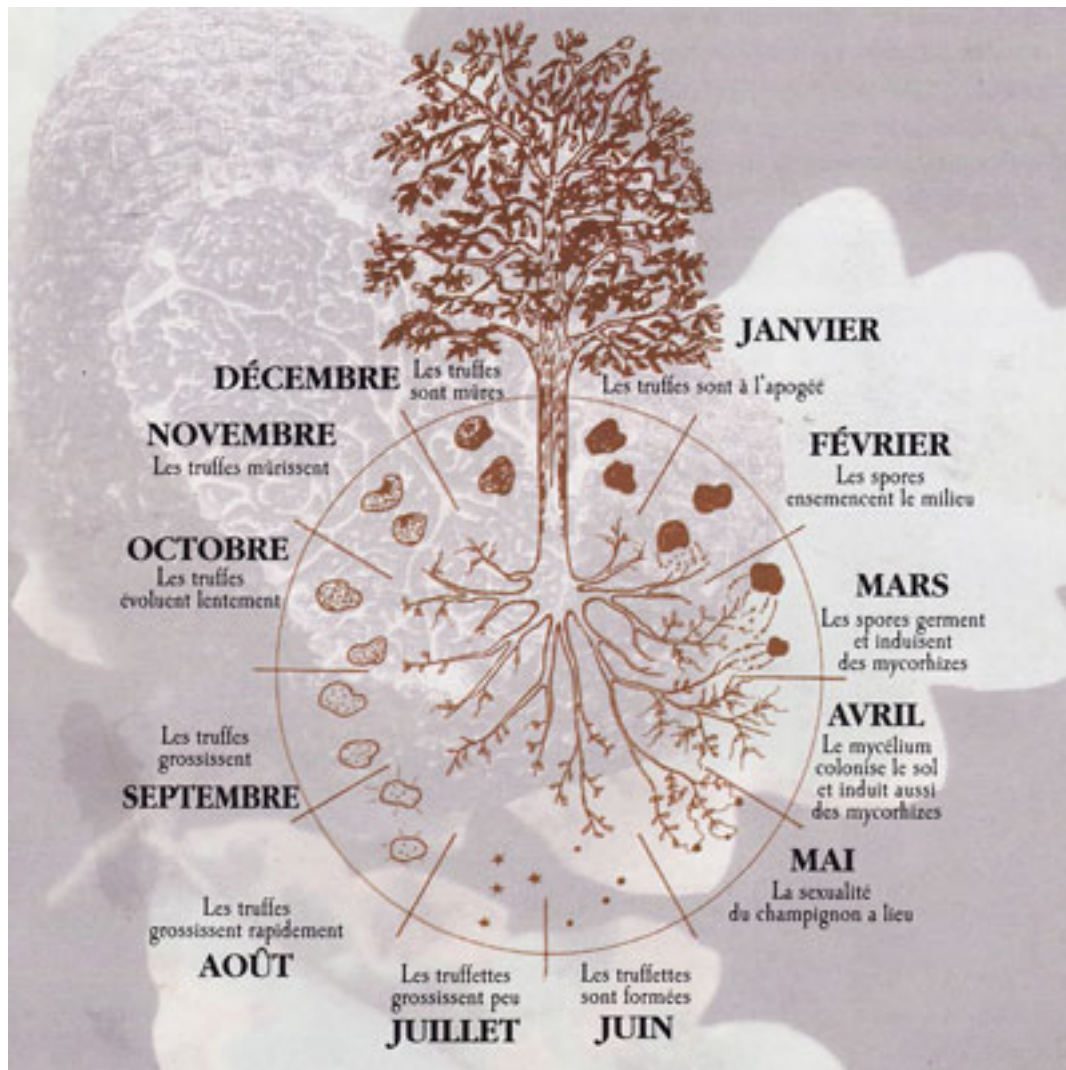


Figure 6 : Cycle de vie de *Tuber melanosporum* (<http://truffesnoires-lalbenque.com/>) : En février les spores sont libérées dans le milieu, puis il y a germination du mycélium qui croît jusqu'à atteindre les racines de l'arbre hôte avec lesquelles il forme une association symbiotique : les mycorhizes. En mai a lieu la fécondation qui aboutit à la formation des truffettes, qui vont se développer jusqu'à atteindre leur pleine maturité en Janvier.

ci se développent jusqu'à former la truffe, qui atteint sa pleine maturité au mois de janvier. Les spores, provenant de l'appareil reproductif maternel sont alors libérées de l'ascocarpe, et leur rencontre avec une structure paternelle (de provenance inconnue) conduit à la formation du corps fructifère.

2. Fonctionnement d'une truffière artificielle

Aujourd'hui, l'essentiel de la production de truffes noires du Périgord provient de truffières artificielles, les truffières naturelles ne représentant que 10% de la production annuelle sur le marché. Lors de la mise en place d'une truffière, le premier élément à prendre en compte est la localisation de celle-ci. En effet, bien que retrouvée sous des climats très variés, la truffe noire a besoin préférentiellement d'un climat continental à méditerranéen (Riousset *et al*, 2001). En effet, lors de l'induction au printemps, le climat doit rester doux et humide, tandis que l'été les périodes de sécheresse doivent être évitées ainsi que les gelées durant l'hiver (Coquelin *et al*, 2007). D'autre part, la truffe peut croître dans milieux très différents, les critères à respecter dans tous les cas étant le substratum calcaire ayant un pH compris entre 7,5 et 8 et le sol drainant, aéré et perméable à l'eau (Riousset *et al*, 2001). Elle peut pousser dans des sols pauvres ou fertiles, en général, la composition minérale est équilibrée avec un certain déficit en phosphore et en matière organique, et le rapport C/N est environ de 10 (Riousset *et al*, 2001).

a. La mycorhization contrôlée

Afin d'augmenter les chances de production, l'INRA a mis en place une technique de mycorhization contrôlée consistant à provoquer la mycorhization des racines de l'arbre hôte par le mycélium de la truffe, tout en évitant l'invasion par d'autres champignons symbiotiques (Chevalier et Frochot, 1997). Pour cela, une solution de spores est préparée par broyage de truffes mures, puis inoculée sur des graines. Ces graines seront alors semées sur un substrat stérile, présentant les propriétés idéales à la mycorhization, c'est-à-dire calcaire, alcalin et drainant. Un suivi microscopique est ensuite réalisé pour s'assurer du bon développement des mycorhizes, qui doit se faire entre 6 et 8 mois, puis les jeunes arbres sont plantés sur le site de la truffière (Chevalier et Frochot, 1997). La truffière commencera à produire entre 5 et 8 ans plus tard, et ce pendant 20 à 50 ans. Les truffes noires se récolteront alors de décembre à mars chaque année (Rousset-Rouard *et al*, 2008) (*cf. figure 6*). Certaines truffes mures sont souvent laissées volontairement sur le terrain afin de libérer les spores qu'elles contiennent et permettre une bonne induction les années suivantes (Coquelin *et al*, 2007).

b. Entretien du terrain

Les truffes étant sensibles aux trop grandes sécheresses et chaleurs durant l'été, il est d'usage de travailler le sol, ce qui pourrait permettre de limiter son échauffement et l'évaporation de l'eau

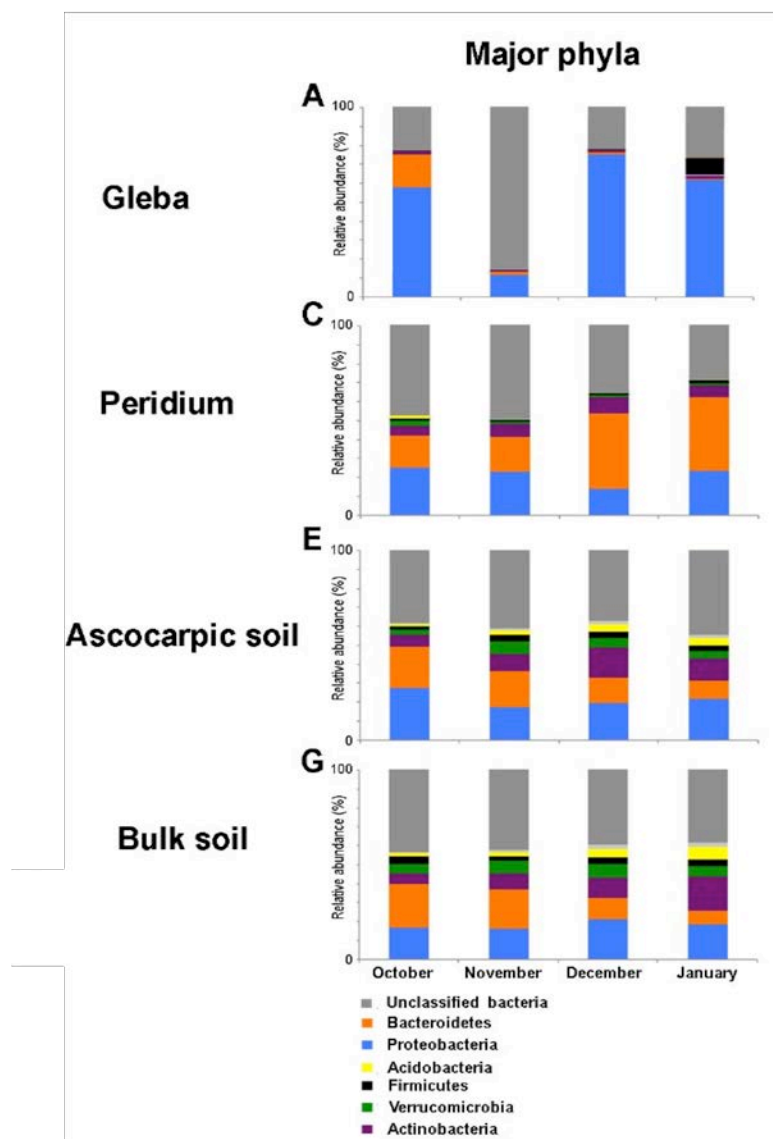


Figure 7 : Evolution de la distribution relative des phyla bactériens dans les différents compartiments considérés au stade mature (Antony-Babu *et al*, 2013) : Résultats des analyses de type pyroséquençage. Le microbiote de la truffe est différent de celui du sol et il évolue selon le stade de maturation de l'ascocarpe. On voit que les *Bacteroidetes* sont dominants dans le sol, tandis que dans la gleba, ce sont les *beta-Proteobacteries* qui dominent.

Compartiments	Sol	Ectomycorhize	Peridium	Gleba
Taxons bactériens	<ul style="list-style-type: none"> •<i>Bacteroidetes</i> •<i>Proteobacteria</i> •<i>Actinobacteria</i> 	<ul style="list-style-type: none"> •<i>Actinobacteria</i> •<i>α-Proteobacteria</i> 	<ul style="list-style-type: none"> •<i>Bacteroidetes</i> •<i>α-Proteobacteria</i> •<i>β-Proteobacteria</i> 	<ul style="list-style-type: none"> •<i>β-Proteobacteria</i>

Tableau 1 : Taxons bactériens prédominants dans *Tuber melanosporum* en fonction du compartiment

(Coquelin *et al*, 2007). De même, un arrosage modéré des arbres serait à privilégier en fonction des conditions météorologiques, sans laisser la truffière sans apport d'eau pendant plus de trois semaines. La taille des arbres pourrait également être importante afin de préserver un milieu ouvert à l'air et à la lumière (Rousset-Rouard *et al*, 2008). Cependant, même si ces pratiques sont courantes en trufficulture, la validité de ces recommandations reste à être prouvées scientifiquement.

3. La truffe, un habitat spécifique pour les bactéries

Afin de permettre une meilleure gestion des truffières, il est nécessaire de mieux connaître l'écologie de la truffe noire afin de permettre une meilleure maîtrise des facteurs clés liés au cycle de vie de celle-ci. C'est pourquoi de nombreuses études sont actuellement réalisées sur les méthodes d'inoculation des plants des truffières artificielles, le cycle de vie des truffes ainsi que sur les communautés microbiennes associées aux truffes.

Des analyses précédentes de type pyroséquençage et emprunts moléculaires ont montré que des bactéries colonisaient les mycorhizes et les ascocarpes de *T. melanosporum*, que ce microbiote était différent de celui du sol et qu'il évoluait selon le stade de maturation de l'ascocarpe (Antony-Babu *et al*, 2013). En effet, dans le sol environnant, on s'aperçoit *figure 7* que les *Bacteroidetes* sont dominants, tandis que dans la gleba, au centre de l'ascocarpe immature, ce sont les *beta-Proteobacteries* qui dominent (*cf. tableau 1*). On note par ailleurs un enrichissement de certains genres bactériens dans l'ascocarpe par rapport au sol, ainsi qu'une variation de la composition des communautés bactériennes en fonction de la saison et du stade de maturité. Les communautés bactériennes du sol étant plus proches de celles du peridium et des mycorhizes que celles de la gleba, cela pourrait suggérer qu'elles seraient recrutées à partir du sol. La différence de composition de communautés bactériennes entre l'ascocarpe et le sol environnant traduit une sélection de certains genres bactériens. On peut émettre l'hypothèse que ces bactéries pourraient participer au développement du corps fructifère. La présence de souches bactériennes ayant un impact positif sur les champignons auxquels elles sont associées est déjà bien documentée (Frey-Klett *et al*, 2007), majoritairement sur des *Basidiomycetes* mais aussi chez *T. borchii*, (Sbrana *et al*, 2000), où des *Peudomonas* ayant une activité anti-pathogène ont été découverts. Ces bactéries, appartenant aux phyla des *Proteobacteries*, *Firmicutes* ou *Actinomycetes* majoritairement, sont également retrouvées à l'intérieur de la truffe, ceci renforce l'hypothèse qu'elles pourraient jouer un rôle dans le développement de l'ascocarpe. Dans d'autres systèmes ces groupes bactériens ont le plus souvent été associés à des fonctions de mobilisation des nutriments du sol, les rendant ainsi accessibles aux champignons, mais aussi de fixation d'azote atmosphérique et de lutte contre les pathogènes racinaires (Frey-Klett *et al*, 2007). Elles favoriseraient également la germination des

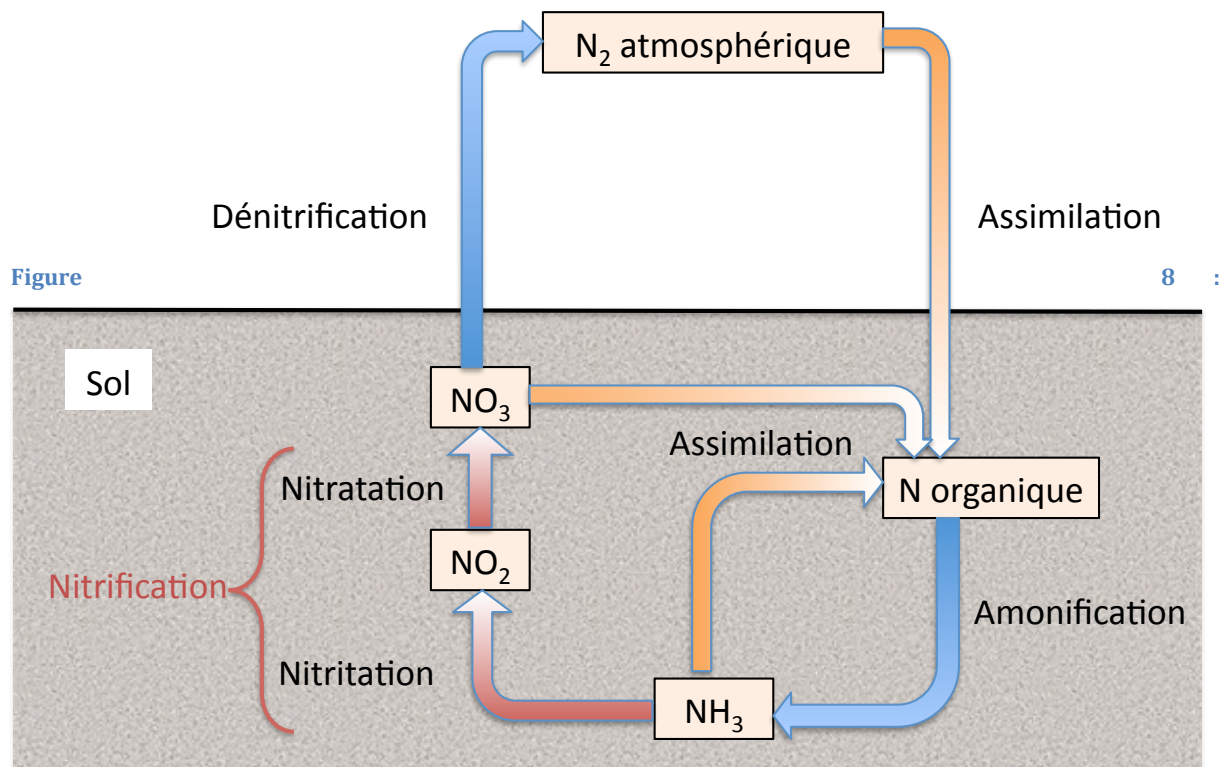
spores, la croissance du mycélium, la détoxification du sol et la formation de mycorhizes (Frey-Klett *et al*, 2007). Cependant, bien que des éléments de preuve de ces fonctions aient été trouvés chez des bactéries associées à des *Basidiomycetes*, ces expériences n'ont pas encore été menées sur la truffe noire du Périgord. C'est pourquoi il est important d'approfondir les recherches sur le sujet afin de permettre à long terme de mieux connaître les conditions optimales de culture de la truffe notamment en expérimentant si l'inoculation de mélanges bactériens à proximité de mycélium pourrait améliorer la production. Dans ce contexte, comprendre pourquoi et comment cette niche se crée ainsi que la nature des interactions existant entre ces communautés bactériennes et les truffes devient pertinent.

a. Les facteurs potentiels de sélection bactérienne

Des analyses chromatographiques et spectrométriques ont prouvé que les organes de *T. melanosporum* diffèrent par leur composition biochimique (Harki *et al*, 2006). En effet, les ascocarpes contiennent majoritairement des glucides, protéines, lipides, et composés soufrés tandis que les ectomycorhizes sont enrichies en glucides simples, des acides aminés, des acides organiques et des acides gras (Harki *et al*, 2006). La sélection de certains taxons bactériens par la truffe pourrait donc être due en partie à la capacité à consommer les métabolites particuliers accumulés dans la truffe.

La variabilité des communautés bactériennes en fonction du stade de maturation pourrait aussi s'expliquer par le contenu métabolique de ces truffes puisque les truffes immatures contiennent surtout des protéines alors que dans les truffes matures, le glucose, le mannose et le rhamnose prédominent (Harki *et al*, 2006).

D'autre part, les Actinomycètes, groupe très répandu dans les sols, produisent un large éventail de métabolites secondaires, dont des antibiotiques permettant d'empêcher la croissance de microorganismes. Ces bactéries étant également enrichies dans les ascocarpes de truffes (Antony-Babu *et al*, 2013), les Actinomycètes pourraient participer à la diminution de la biodiversité au sein de la gleba à travers la production de molécules anti-microbiennes. Cette hypothèse est appuyée par le fait que lors d'un criblage réalisé avec des sondes GeoChips (Antony-Babu *et al*, 2013) ciblant des gènes provenant d'*Actinobacteries* et de *Bactéroïdetes*, de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques ont été retrouvés. Ce phylum pourrait jouer un rôle de sélection, empêchant ainsi la colonisation par des bactéries ne possédant pas de gènes de résistance.



Cycle de l'azote : L'azote atmosphérique est assimilé par les organismes, il se retrouve alors dans la matière organique. Des bactéries peuvent alors transformer les composés azotés en ammoniac par amonification, puis en nitrate par nitrification. Le nitrate peut par la suite être à nouveau transformé en azote atmosphérique grâce à des bactéries dénitrifiantes.

b. Rôles potentiels des bactéries dans le cycle de vie de la truffe

La truffe comprenant un microbiote particulier par rapport à celui du sol environnant, il serait utile de savoir s'il peut apporter des avantages à celle-ci, comme les microbiotes associés à d'autres champignons (Frey-Klett *et al*, 2007). En effet, des études récentes ont montré une corrélation entre la productivité des truffières et les genres bactériens présents (Mello *et al*, 2010), puisque les zones productives comportaient des microorganismes non présents dans les zones moins productives. Par exemple, en réalisant une analyse de diversité basée sur le séquençage d'ADN 16S et 18S sur des truffières séparées en fonction de leur productivité, ces chercheurs ont remarqué que les zones productives étaient notamment associées à la présence d'une espèce bactérienne *Moraxella osloensis* ainsi que certains champignons, contrairement aux zones moins productives. Il est donc possible que cette espèce bactérienne puisse avoir un impact positif sur le développement et la maturation des ascocarpes puisqu'en sa présence la productivité est favorisée. Cependant, il se pourrait que ce ne soit pas la seule bactérie à favoriser le développement des truffes. En effet, des études sur une autre espèce de truffe, *T. borchii*, ont révélé que 50% des souches de *Pseudomonas* étudiées étaient capables de produire des métabolites stimulant le développement du mycélium de la truffe *in vitro*. D'autre part, celles-ci produiraient des composés antifongiques, permettant d'éviter la colonisation fortuite par des champignons contaminants (Sbrana *et al*, 2000).

Rôle potentiel dans la nutrition

L'utilisation de puces à ADN sur des échantillons récoltés dans les truffes a permis de mettre en évidence la présence de gènes codant pour des enzymes impliquées dans les cycles du carbone, de l'azote et du phosphore (Antony-Babu *et al*, 2013). Ces résultats suggèrent la participation des communautés bactériennes à la nutrition du champignon par solubilisation des nutriments non accessibles directement par la truffe, comme par exemple le phosphore ou le fer. Il a déjà été prouvé chez la truffe blanche *T. magnatum* que certaines *Actinobacteries* présentes au sein de la truffe solubilisait *in vitro* le phosphate et le fer, et ce de façon plus importante en présence de tréhalose et mannitol, glucides principaux composant la truffe (Pavic *et al*, 2013).

Par ailleurs, des données préliminaires suggèrent que l'azote utilisé par l'ascocarpe au cours de son développement provient du sol via les mycorhizes (Le Tacon *et al*, non publié). Dans ce contexte, la présence de bactéries capables de mobiliser l'azote inorganique dans leur voisinage pourrait favoriser la nutrition de l'ascocarpe. D'ailleurs, des chercheurs ont observé que deux bactéries associées à *T. magnatum*, *Curtobacterium flaccumfaciens* et *Rhodococcus sp.* étaient capables de réaliser l'ammonification *in vitro* (Pavic *et al*, 2013) (*cf. figure 8*), ce qui permettrait de

favoriser l'accessibilité de l'azote. D'autre part, le gène codant la nitrogénase permettant la fixation de l'azote atmosphérique a été détecté chez des souches bactériennes colonisant les ascocarpes de *T. magnatum* (Barbieri *et al*, 2010) et *T. melanosporum* (Antony-Babu *et al*, 2013). Barbieri *et al* ont également évalué l'activité nitrogénase dans les ascocarpes de *T. magnatum* en dosant la réduction de l'acétylène en éthylène. Ils ont ainsi montré que l'azote atmosphérique était fixé au sein des ascocarpes de *T. magnatum* par des bactéries du genre *Bradyrhizobium*. Toutefois, cette technique ne permet pas de savoir si l'azote fixé par les bactéries est transféré ou non au champignon.

Rôle potentiel dans la libération des spores

Lors d'une analyse par puces à ADN des communautés bactériennes associées à *T. melanosporum*, de nombreux gènes impliqués dans la dégradation de la chitine ont été détectés (Antony-Babu *et al*, 2013). Ces résultats suggèrent que les bactéries associées aux truffes auraient un rôle dans leur maturation, et plus particulièrement dans la libération des spores à travers la dégradation de la paroi de l'ascocarpe. En effet, les parois fongiques sont composées en majorité de chitine. Des tests fonctionnels ont déjà été réalisés sur les bactéries de *Tuber magnatum*, et ont prouvé que certaines *Actinobacteria* avaient la faculté de dégrader ces composés, et notamment *C. flaccumfaciens* capable de décomposer la chitine, ainsi que des lipides et protéines (Pavic *et al*, 2013). Les souches bactériennes présentes dans la truffe ont donc potentiellement des activités chitinolytiques puisque des gènes permettant ces activités sont présents, cependant nous n'avons pas encore la preuve de ces activités *in situ*.

c. Rôles potentiels des bactéries associées aux truffes sur l'arôme

L'arôme de la truffe est une de ses caractéristiques principales, et l'atout pour lequel elle est si convoitée en gastronomie. D'un point de vue écologique, les composés volatiles à la base de cet arôme jouent un rôle important dans le cycle de vie du champignon en attirant les mammifères et les insectes qui disséminent ensuite les spores fongiques (Spivallo *et al*, 2014). Ces composés volatiles pourraient également inhiber la croissance de certaines plantes et participer ainsi à la formation des brûlés (zones où la croissance des herbacées est limitée), en évitant ainsi la compétition pour les nutriments et pour l'eau vis-à-vis des végétaux, ainsi que le parasitisme de la truffe sur les plantes herbacées non hôtes (Mello *et al*, 2013).

Il est donc important de mieux connaître les éléments permettant sa formation ainsi que sa dégradation, afin de cultiver et conserver les truffes dans des conditions adéquates. De plus, le phénomène de sélection bactérienne de l'ascocarpe pourrait également être dû à la présence de composés spécifiques soufrés (Spivallo *et al*, 2014). Des chercheurs ont aussi remarqué que lors

d'un stockage de la truffe à température ambiante, l'arôme était amplifié. La truffe comprenant environ 10^7 bactéries par gramme, on peut se demander si les bactéries pourraient avoir un rôle potentiel sur la production de l'arôme de la truffe (Bellesia *et al*, 2001). Des travaux ont révélé une corrélation entre la concentration en thiophènes et la densité bactérienne (Splivallo *et al*, 2014). Ils ont alors réalisé des expériences pour savoir dans quelle mesure étaient impliquées les bactéries dans la production de l'arôme, et ont découvert que l'utilisation d'antibactériens dans supprimait la production de thiophène, contrairement à l'utilisation d'antifongiques. Concernant *T. melanosporum*, l'analyse du génome a montré que le champignon possédait l'ensemble des gènes nécessaires à la production de composés volatiles sans l'implication de bactéries. En effet, elle possède des gènes impliqués dans l'assimilation du soufre ainsi que des enzymes d'interconversion des acides aminés soufrés (Martin *et al*, 2010). La question du rôle des bactéries dans la production de l'arôme de *T. melanosporum* reste donc ouverte.

4. Objectifs du stage

L'existence de communautés bactériennes spécifiques associées aux mycorhizes et aux ascocarpes de *T. melanosporum* étant désormais un fait avéré, il reste à découvrir d'une part, les mécanismes de sélection de ces communautés bactériennes et d'autre part, leur impact sur le cycle de vie de la truffe. Mon stage s'inscrit dans un projet de recherche plus large visant à répondre à ces questions. A cette fin, une collection de bactéries a été réalisée préalablement à mon stage à partir des différents compartiments de l'ascocarpe, la gleba (partie interne) et le peridium (partie externe), ainsi que des mycorhizes et du sol environnant, afin d'être testées du point de vue fonctionnel puis comparées. Dans le cadre de ce projet, trois hypothèses non exclusives ont été émises pour expliquer l'effet de sélection de communautés bactériennes spécifiques par le champignon : i. l'existence d'interactions trophiques entre le champignon hôte et les communautés bactériennes, ii. une sélection indirecte par antibiose, iii. l'accumulation par le champignon de métaux lourds toxiques pour certaines bactéries. Mes travaux se sont focalisés sur ces deux premières hypothèses. La seconde question posée dans ce projet de recherche est de savoir si les bactéries associées à la truffe peuvent avoir un effet sur le cycle de vie du champignon. Nous avons émis l'hypothèse que ces bactéries pourraient avoir un impact à plusieurs niveaux, notamment sur la nutrition du champignon pendant le développement de l'ascocarpe, sur la libération des spores et sur la production et la stabilité de l'arôme. Mes travaux se sont focalisés sur ces deux premiers aspects.

Etape 1	Mélange PCR	Par échantillon, en μL
	5' prime Master Mix 2,5X	10
	Primer 27F 10 μ M	1
	Primer 907R 10 μ M	1
	H ₂ O	11
	+ suspension cellulaire	2
Etape 2	Mélange Purification	
	EXO I (exonuclease)	0,15
	CIP (phosphatase alcaline)	0,15
	H ₂ O	0,45
	+ produit PCR	15

Tableau 1 : Protocoles de préparation des mélanges PCR et de purification

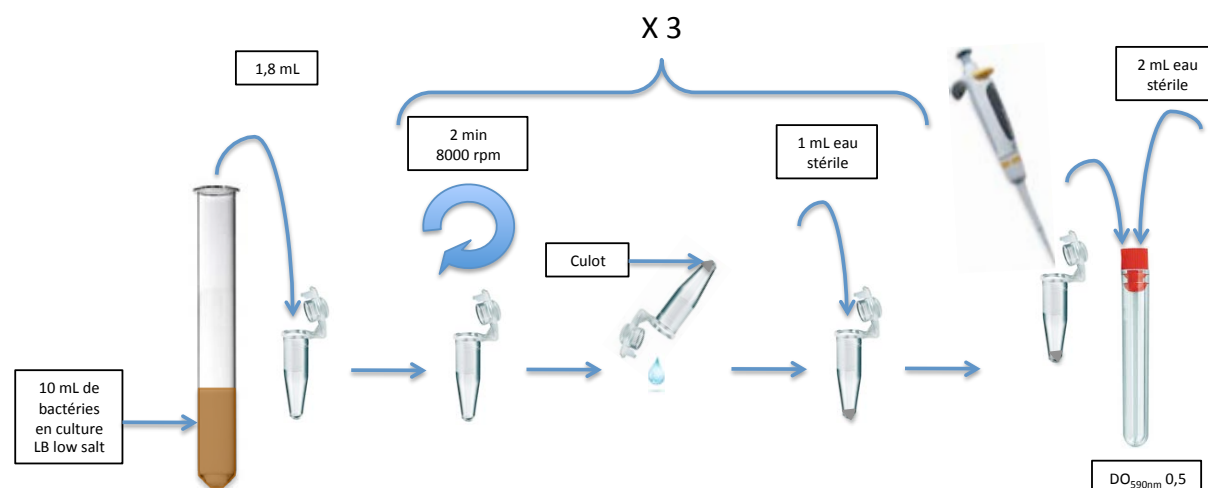


Figure 9: Préparation des inoculats bactériens par lavages successifs

94°C	30 cycles			72°C
	94°C	50°C	72°C	
4min	30s	1min	1min30s	10mn

Tableau 2 : Déroulement du cycle PCR pour l'amplification de la région 16S 27F-907R correspondant aux régions hypervariables V1 à V4

II. Matériels et méthodes

Les échantillons utilisés dans cette étude proviennent de la truffière artificielle de Rollainville, située dans les Vosges. Cette truffière a été installée sur un sol calcaire (pH 8) par Christophe Robin. Des plants de chênes et noisetiers ont été inoculés avec *T. melanosporum* en 1991. Dans le cadre de mes travaux, des échantillons ont été collectés en Octobre 2010 (D3) correspondent au stade 6a (truffe immature), et en Janvier 2011 (D6) correspondent au stade 6c (truffe mature). Les prélèvements ont été effectués sous noisetier dans différents compartiments (le sol environnant, les mycorhizes, le peridium et la gleba), afin de pouvoir comparer la diversité bactérienne et les variations d'activités dans chacun de ces compartiments. Vingt-cinq souches bactériennes ont ensuite été isolées et purifiées pour chaque échantillon et ont permis de constituer une collection de 200 souches représentative des différents compartiments d'intérêt, elles ont ensuite été conservées à -80°C.

1. Préparation des échantillons

Les expériences suivantes ont été réalisées à partir d'une sélection aléatoire de 200 souches provenant de la collection précédemment décrite, conservées dans du glycérol à -80°C. Cette sélection a été obtenue de façon à avoir des effectifs similaires pour chaque compartiment afin que les données soient analysables statistiquement. Dans un premier temps, les souches sélectionnées ont été mises en culture sur milieu solide TSA 1/10, puis incubées 48h à 25°C, afin de s'assurer qu'elles soient pures (*cf. tableau 4*). Quelques colonies de chaque souche sont ensuite prélevées puis incubées dans des tubes de 10mL de milieu LB à 0,1% de NaCl pendant 48h à 28°C, sous agitation (180rpm). Les suspensions bactériennes ont ensuite lavées à l'eau stérile et centrifugées trois fois comme expliqué *figure 9*.

2. Identification des souches testées

Les souches utilisées ont été identifiées grâce à l'analyse des séquences 16S d'ARNr, habituellement utilisées pour l'identification phylogénétique bactérienne. Ici, nous avons utilisé le couple d'amorces 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3') et 907R (5'CCGTCAATTCMTTTRAGTTT3'), amorces universelles permettant d'amplifier les régions hypervariables de V1 à V4 en un produit PCR de 880 paires de bases. La préparation du mix PCR est expliquée dans le *tableau 2*. Les cycles PCR sont décrits dans le *tableau 3*. Les produits PCR ont ensuite été analysés par électrophorèse (gel TBE 1X, 1% agarose) afin de vérifier la pureté des isolats et la taille des amplicons, puis purifiés comme présenté *tableau 2*. Un volume de 0,75µL du mix de purification a ensuite été ajouté à 15µL d'échantillon, puis incubé dans le thermocycleur 30min à 37°C, suivies de 15min à 85°C. Les concentrations d'ADN ont ensuite été dosées au

Milieu TSA 10%	Pour 1L
TSA	10g
Agar	20g
Milieu LB low salt	
<u>Tryptone</u>	10g
<u>Yeast Extract</u>	5g
<u>NaCl</u>	1g
Milieu KB	
Poudre King B	35g
Glycérol	5mL
Milieu CMC	
Cellulose	5g
K ₂ HPO ₄	1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5g
<u>NaCl</u>	0,5g
Agar	20g
Milieu TSA 3% + HDTMA	
TSA	3g
Agar	20g
Solution HDTMA (après autoclavage)	0,164g/60mL
Milieu CYM	
<u>NaCl</u>	2,5g
KH ₂ PO ₄	1g
<u>Yeast Extract</u>	0,1g
Chitine colloïdale	2g
Agar	20g
Milieu TCP	
NH ₄ Cl	5g
<u>NaCl</u>	1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1g
Glucose	10g
<u>Ca₃(PO₄)₂</u>	4g
Agar	15g

Tableau 4 Préparation des milieux nécessaires aux tests fonctionnels sur boîtes

Solution 1	pH 6,8
Pipe Na ₂ Buffer	34,63g
KH ₂ PO ₄	0,3g
<u>NaCl</u>	0,5g
NH ₄ Cl	1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,246g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,0147g
H ₂ O	800mL
Agar	15g
Solution 2	
Glucose	4g
H ₂ O	100mL
Solution 3	
<u>Chromozurol</u> <u>S</u>	0,0905g
H ₂ O	75ml
Solution 4	
FeCl ₃	0,0024g
H ₂ O	15ml
Solution 5	
HDTMA	0,1640g
H ₂ O	60 ml

Tableau 5 : Préparation du milieu CAS

Nanodrop, puis ajustées à 10ng/μL dans de l'eau. Les amplicons ont été séquencés par la méthode Sanger par la société Eurofins. Les homologues de séquences nucléotidiques ont été recherchées par blastn (Altschul *et al*, 1997) sur les bases de données National Center for Biotechnology Information (NCBI) et Ribosomal Database Project (RDP). Une analyse phylogénétique a ensuite été réalisée à l'aide du site Phylogeny.fr en choisissant la méthode du Neighbour Joining. Pour cela, un alignement multiple a préalablement été réalisé à l'aide de l'algorithme Clustal W.

3. Tests fonctionnels sur milieux gélosés

Les suspensions cellulaires ont été ajustées à la DO_{590nm} de 0,5 et 10μL de chaque suspension ont été déposés en gouttelettes sur les milieux suivants, en triplicat : King B (KB) : milieu de détection des souches productrices de sidérophores, en particulier *Pseudomonas*, Chrome Azurol S (CAS) : milieu de détection des souches productrices de sidérophores, Carboxymethyl Cellulose Medium (CMC) : milieu de détection des souches à activité cellulolytique, Chitin Yeast Medium (CYM) : milieu de détection des souches à activité chitinolytique et Tri-calcium Phosphate (TCP) : milieu de détection des souches à activité de solubilisation du phosphore inorganique (la composition de ces milieux est fournie *tableau 4*).

Le milieu CAS contenant un composé potentiellement toxique, le HDTMA (hexadecyltrimethyl-ammonium bromide), les souches ont été étalées en stries sur un milieu TSA additionné d'HDTMA afin de tester la résistance des souches vis-à-vis de cette molécule. Pour la préparation du milieu CYM, la chitine a préalablement été dégradée partiellement par traitement acide, afin que celle-ci soit plus rapidement accessible aux bactéries. La solution a ensuite été titrée à 1g/L puis répandue en surcouche sur boîte de Petri, la première couche étant composée uniquement d'eau gélosée (20g/L d'agar). Concernant le milieu CAS, la préparation s'est faite en plusieurs étapes, dont la préparation des différentes solutions est présentée *tableau 5*. Premièrement, les solutions 3 et 4 ont été mélangées sous agitation, puis la solution 5 a été ajoutée. Cette première préparation a ensuite été stérilisée par autoclavage (20min-120°C). Des volumes de 100mL de solution 2 et de 800mL de solution 1 ont ensuite été ajoutés au mélange. Pour les biotests, les isolats sont analysés par séries de 24, les souches *Pseudomonas fluorescens* Bbc6R8, D3AIN10 (apparentée au genre *Bosea*) et D6BS2 (apparentée au genre *Bacillus*) ont donc été utilisées comme témoins afin de vérifier la reproductibilité des résultats entre chaque série.

La lecture de l'ensemble des boîtes ensemencées a été réalisée après 7 jours d'incubation à 25°C. Pour cela, les diamètres des halos de dégradation ont été mesurés ainsi que ceux des colonies obtenues sur les milieux CYM, TCP et CAS. Les résultats sur milieu CMC ont été obtenus après recouvrement des boîtes par du rouge Congo (1 mg/ml d'eau) pendant 40min, puis par du NaCl à 1M pendant 15min afin de rincer le colorant des boîtes. Les halos de dégradation

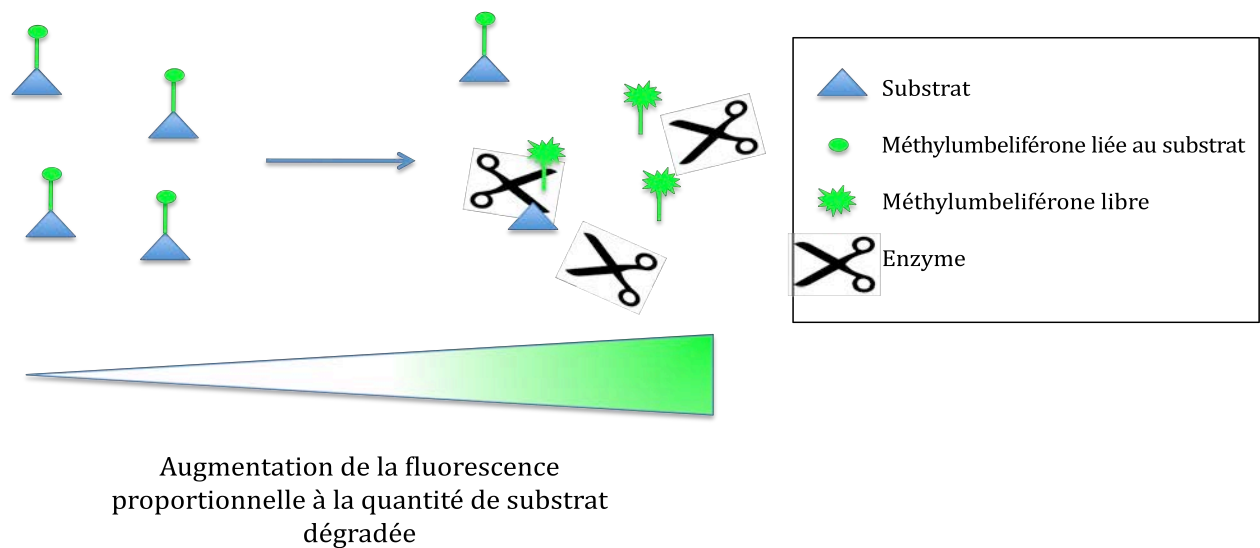


Figure 10 : Principe des tests enzymatiques utilisant un substrat lié à la Méthylumbelliférone excitée à une longueur d'onde de 355nm

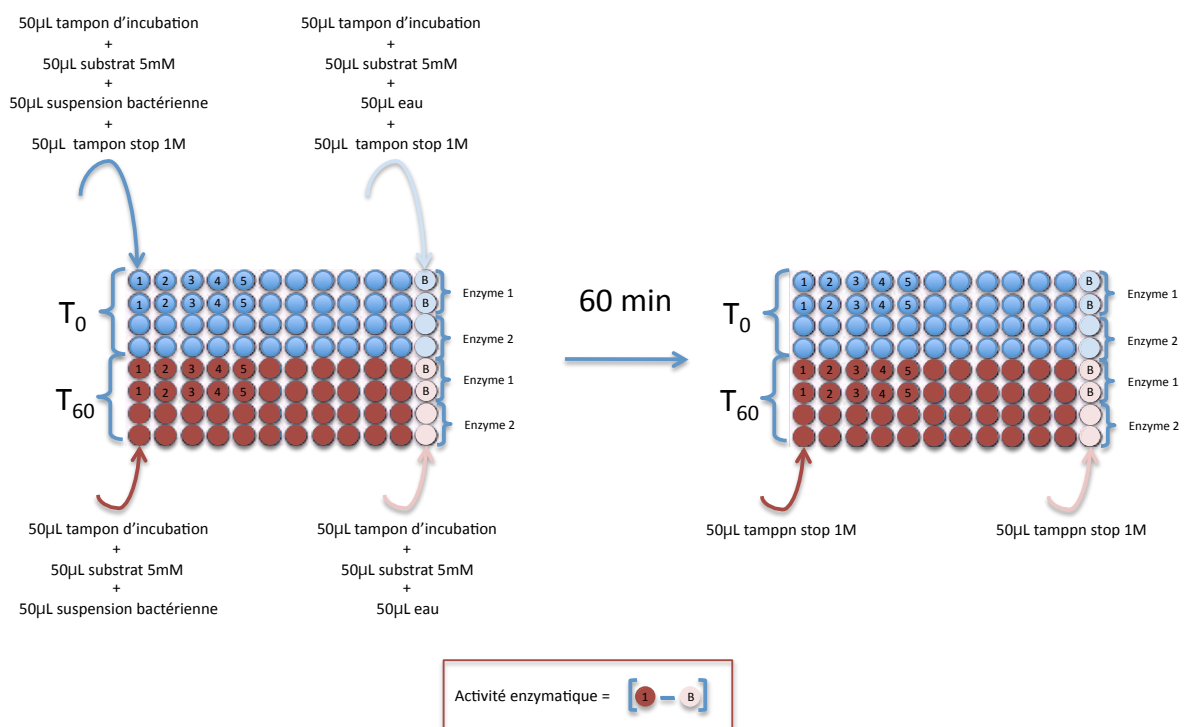


Figure 11 : Préparation des échantillons pour les mesures d'activités enzymatiques en microplaques

ont alors pu être observés. Pour ce qui est du milieu KB, ce sont des halos de fluorescence que l'on doit mesurer, ceux-ci ont donc été observés à l'aide d'une lampe à UV.

4. Tests enzymatiques en microplaques

Afin de tester différents types d'activités cellulolytiques, chitinolytiques et phosphatase et d'avoir une approche complémentaire des tests *in vitro* réalisés en parallèle, nous avons réalisé des mesures d'activités enzymatiques potentielles en microplaques permettant de mesurer la quantité de substrat hydrolysé en une heure par chaque souche bactérienne. Pour cela, nous avons utilisé des substrats couplés à un fluorochrome, la méthylumbelliférone, qui lorsqu'elle est libre dans le milieu et excitée à une longueur d'onde de 355nm, émet de la fluorescence à 460nm. La mesure de cette fluorescence permet alors de connaître la quantité de méthylumbelliférone libre, et par conséquent la quantité de substrat hydrolysé, qui est proportionnelle à la quantité d'enzyme sécrétée (cf. figure 10). Pour cela, dans chaque puits de la microplaque opaque sont déposés 50µL de tampon d'incubation, 50µL de substrat et 50µL de suspension bactérienne (cf. figure 11). Les activités doivent être mesurées à T_0 et à T_{60} , où l'ajout de tampon stop se fait juste avant la lecture. De l'eau déminéralisée a été utilisée pour faire le blanc. Par la suite, les résultats obtenus avec les différentes suspensions bactériennes ont été soustraits à ceux obtenus avec le blanc afin d'éliminer l'autofluorescence des cellules ou du couple substrat-fluorochrome. La préparation des solutions mères de substrats et des différents tampons utilisés est présentée tableaux 6 et 7, tandis que les suspensions bactériennes ont été préparées comme précédemment et ajustées à une DO_{590nm} de 0,5. Un volume de 3mL de chaque solution mère est ensuite dilué dans 7mL d'eau afin d'obtenir les solutions de travail. La distribution des données obtenues ne suivant pas une loi normale, elles ont été traitées en utilisant le test statistique non paramétrique de Kruskal-Wallis, complémenté d'un test Khi2 afin de mettre en évidence si la distribution des souches bactériennes en classes d'efficacité était significativement différentes selon l'origine et/ou le temps de prélèvement. Le test de Kruskal-Wallis a été réalisé directement sur les données quantitatives. Le test du Khi2 a été réalisé sur des effectifs de classes d'efficacité pour chaque biotest, en veillant à ce que l'effectif de chaque catégorie soit supérieur à 5.

5. Assimilation d'azote par les bactéries associées aux truffes

a. Recherche des séquences *nifH*

Afin de compléter les analyses précédentes sur la mobilisation possible des nutriments par les bactéries présentes au sein de la truffe, nous nous sommes intéressés à la potentialité de certaines bactéries à fixer l'azote atmosphérique grâce à la nitrogénase. Pour cela, nous avons recherché la présence du gène *nifH* codant pour la sous-unité nitrogénase réductase à l'aide d'amorces

Tampon d'incubation : tampon maléate pH 6	Pour 500mL
Tris 0,2M	12,1g
Maléate 0,2M	11,6g
NaOH 0,2M	2,1g/260mL
Tampon stop : tampon Tris pH 10	
Tris 1M	60,55g

Tableau 5 : Préparation des tampons des tests enzymatiques

Substrats 5mM	Pour 10 ml de 2-méthoxyéthanol
MU-β-glucuronide hydrate	17,615mg
MU-β D-xylopyranoside	15,415mg
MU-β-D-cellobioside	25,023mg
MU-β-D-glucopyranoside	16,915mg
MU-N-acetyl-β-D-glucosaminide	18,968mg
MU-phosphatase	12,808mg
Solution MU de calibration 25mM	44,05mg

Tableau 6 : Préparation des solutions mères de substrat

Mix PCR	Par échantillon, en µL
Master Mix 2,5X	8
Primer 27F 10µM	1
Primer 907R 10µM	1
H ₂ O	9
+ échantillon	1

Tableau 7 : Mise en place du protocole de recherche du gène Nif

IGK3/DVV	IGK3 5'AARGGNGGNATHGGNAA3'		DVV 5'ATIGCRAAICCCRCACIACIACRTC3'		
95°C	35 cycles				72°C
	94°C	58°C	72°C		
10min	45s	30s	1min		10mn
PolF/PolR	PolF 5"TGCGAYCCSAARGCBGACTC3'		PolR 5'ATSGCCATCATYTCRCCGGA3'		
94°C	30 cycles				72°C
	94°C	55°C	72°C		
5min	1min	1min	2min		5mn
PRB271/272/273	nifH-fl-forA 5'GCSTTCTACGGMAAGGGTGG3'	nifH-fl-forB 5'GGBTGYGACCCSAASGCYGA3'		nifH-fl-rev 5'GCGTACATSGCCATCATCTC3'	
94°C	30 cycles				72°C
	94°C	48°C	72°C		
5min	30s	45s	1min		7mn

Tableau 8 : Protocole de réalisation des cycles PCR pour l'amplification du gène de la nitrogénase-réductase

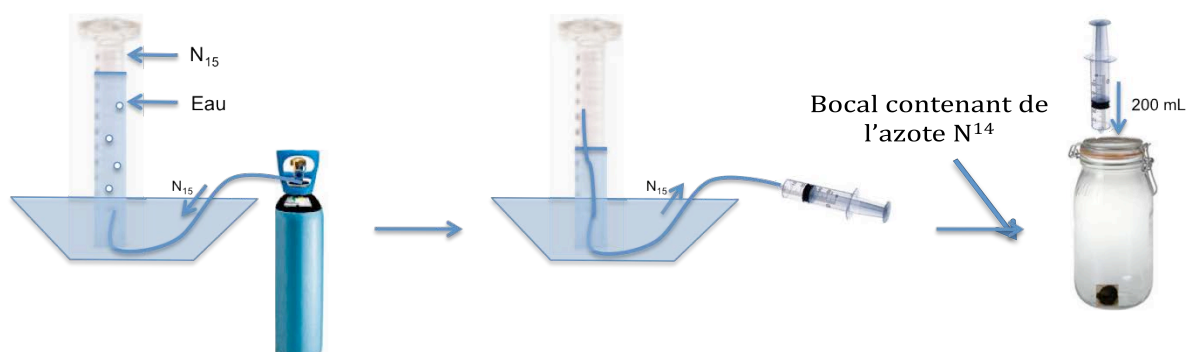


Figure 12: Protocole de test de l'assimilation d'azote par les bactéries associées à la truffe

dégénérées dont les protocoles sont décrits *tableau 8*. Un grand nombre de couples d'amorces dégénérées ayant différents degrés de spécificité pour différents genres bactériens a été développé par le passé (Gaby et Buckley, 2012). Dans une première étape, nous avons sélectionné à partir de la littérature (Gaby et Buckley, 2012 ; Poly *et al*, 2001) trois couples d'amorces « universelles » et nous avons testé leur efficacité et leur spécificité sur plusieurs souches témoins connues pour posséder le gène *nifH*. Deux souches ne possédant pas ce gène ont été utilisées comme témoins négatifs. Préalablement, nous avons extrait l'ADN des souches *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Pseudomonas putida* KT440 et *sinorhizobium* sp. 2064 selon le protocole d'extraction d'ADN de Pospiech et Neumann (1995). Les couples d'amorces PolF-PolR (respectivement 5' TGCGAYCCSAARGCBGACTC 3' et 5' ATSGCCATCATYTCRCCGGA 3') et IGK3/DVV (5' AARGGNGGNATHGGNAA 3' et 5' ATIGCRAAICCCIRCAIACIACRTC 3') ont été utilisées avec les paramètres d'amplification décrits dans le *tableau 8*. L'amplification avec les amorces *nifH*-f1-forA/*nifH*-f1-rev (5'GCSTTCTACGGMAAGGGTGG3', 5'GCGTACATSGCCATCATCTC3') puis *nifH*-f1-forB (5'GGBTGYGACCCSAASGCYGA3')/ *nifH*-f1-rev (Poly *et al*. 2001), se fait par PCR nichée, en deux étapes successives décrites dans le *tableau 8*. Suite à ces premiers tests le couple PolF-PolR a été défini comme le plus adapté pour rechercher la présence du gène *nifH* dans la collection bactérienne étudiée ici.

b. Assimilation d'azote *in vitro*

Etant donné que la présence du gène *nifH* indique seulement une potentialité à fixer l'azote atmosphérique, une expérience de fixation de l'azote par les truffes *in vivo* a également été réalisée (*cf. figure 12*). Pour cela, neuf truffes ont été prélevées le 09.01.2014 dans la truffière de Rollainville et stockées à 4°C pendant 4 jours. Après prélèvement, les truffes ont été brossées sous l'eau pour éliminer le sol adhérent puis séchées en surface avec du papier absorbant. Chaque truffe a été pesée puis trois truffes ont été stérilisées par autoclave 20min à 120°C (contrôle négatif pour éliminer la communauté bactérienne). Chaque échantillon a été placé dans un bocal en verre étanche de 2L dont l'air a été remplacé par de l'azote N¹⁴ afin d'éviter l'inhibition de l'activité nitrogénase par l'oxygène atmosphérique (Goldberg *et al*, 1986). Trois traitements ont été réalisés en triplicat : trois truffes ont été incubées avec l'azote N¹⁴, trois non autoclavées et trois autoclavées ont été incubées en présence de 10% de N¹⁵ injecté dans les bocaux à l'aide d'une seringue. Après 24h d'incubation à température ambiante, quelques grammes de truffes ont été prélevés puis fixés dans du paraformaldéhyde 3%, pour pouvoir réaliser ultérieurement des observations en microscopie par hybridation *in situ*. La partie restante de chaque échantillon a été

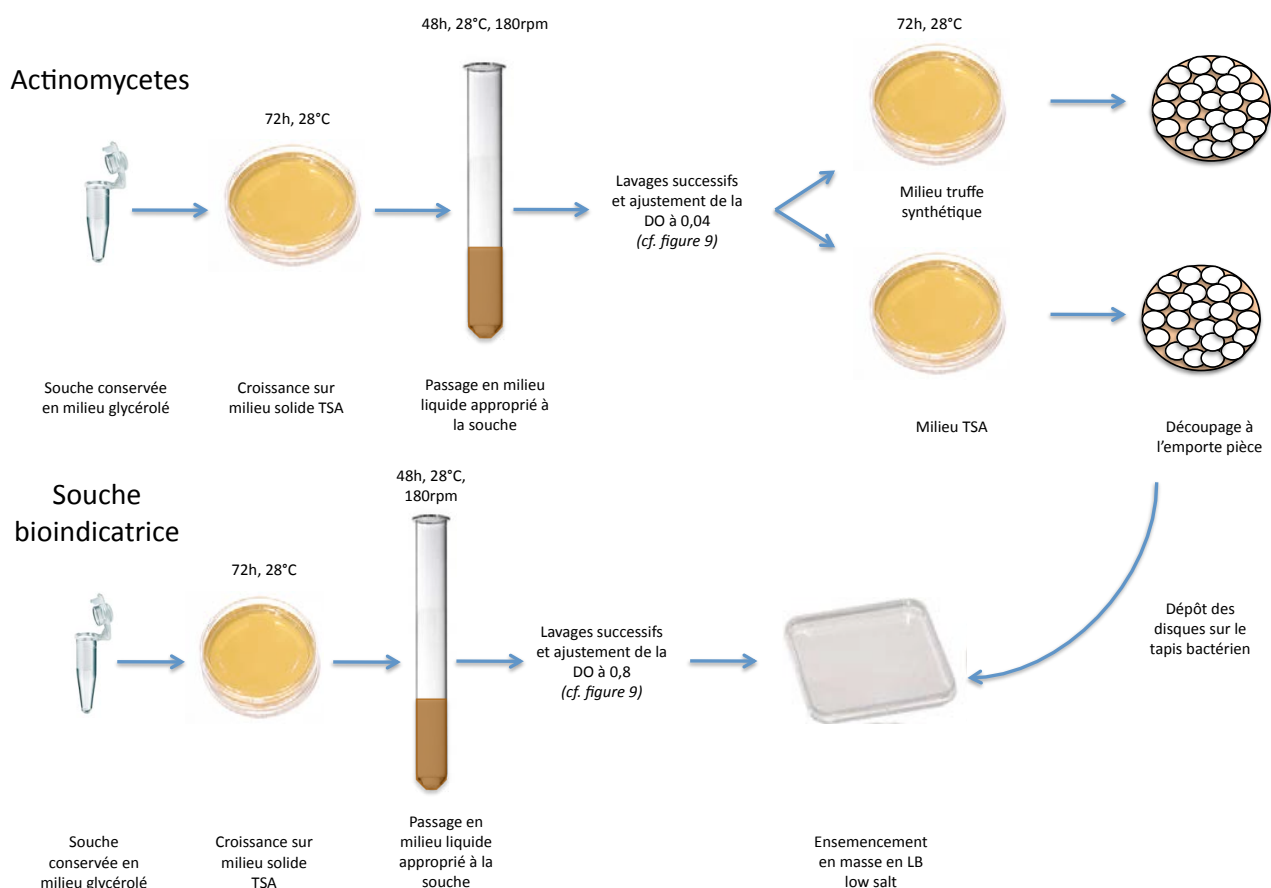


Figure 13 : Protocole de préparation des tests d'antibiose

YEME	800mL
Saccharose	200g
Extrait de levure	2,4g
Extrait de malt	2,4g
Bacto-peptone	4g
Glucose	8g
MgCl ₂ , 6H ₂ O 1M	0,5g
Glycine 10% (5g/L)	2,5mL
HT	1L
Extrait de levure	1g
Extrait de viande	1g
Dextrine blanche	10g
Bacto-tryptone	2g
CaCl ₂	0,02g

Milieu Truffe	4L
Glucose	4,015g
Mannose	0,537g
Glucosamine	1g
Rhamnose	0,047g
Tréhalose	4,015g
Mannitol	4,015g
Cystéine	0,149g
Acide aspartique	0,058g
Glutamine	0,172g
Sérine	0,108g
Alanine	0,282g
Cystine	0,123g
Valine	0,052g
Isoleucine	0,051g
Triglycérides	0,187g
Phosphatidylcholine	0,077g
Acide linoléique	0,173g
Acide oléique	0,073g
Acide palmitique	0,051g
KCl	0,686g
Na ₂ HPO ₄	0,260g
Na ₂ SO ₄	0,139g
MgCl ₂	0,030g

Tableau 9 : Préparation des milieux pour les tests d'antibiose

séchée à 65°C pendant 3 jours, broyée, pesée puis analysée par spectroscopie de masse au sein du plateau PTEF.

5. Tests d'antibiose

La présence d'*Actinobacteries* dans l'ascocarpe pourrait participer à la sélection de bactéries particulières, telles que les alpha-Protéobactéries qui sont particulièrement présentes dans la gleba. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des tests d'antibiose. Pour cela, nous avons dans un premier temps fait des cultures des souches d'*Actinobacteries* à tester sur milieu TSA 1/10^{ème} gélosé à partir de la collection conservée en glycérol à -80°C (cf. figure 13). Ces souches ont été incubées à 28°C pendant 48h sous agitation (180rpm) puis inoculées dans 10mL de milieu liquide HT ou YEME (cf. tableau 9), selon les caractéristiques des souches. Des lavages successifs ont ensuite été réalisés comme Figure 10 mais en ajustant la DO_{590nm} à 0,04, puis 100µL de ces souches ont été étalées en tapis d'une part sur trois boîtes de milieu TSA 10% et d'autre part sur trois boîtes de milieu synthétique (cf. tableau 9) imitant la composition de la truffe, afin que les conditions de production des métabolites secondaires soient les plus semblables possibles à celles rencontrées dans l'ascocarpe. L'incubation s'est faite à 28°C, pendant 1, 2 et 3 jours, puis les boîtes ont été placées à 4°C pour amplifier la sécrétion potentielle d'antibiotiques.

Parallèlement, deux souches bioindicatrices appartenant aux Gram+ (D3AOUT12, genre *Micrococcus*) et aux Gram- (D3AIN2, genre *Bosea*) ont été sélectionnées pour être confrontées aux actinobactéries. Ces bactéries bioindicatrices ont d'abord été inoculées dans 10mL de LB liquide low salt, puis incubées 48h à 28°C sous agitation (180rpm). 1mL de culture à DO_{590nm} 0,8 a ensuite étéensemencé en masse dans du milieu LB low salt gélosé en boîtes carrées. Des disques ont alors été découpés dans les boîtes d'Actinobactéries, incubées 1, 2 ou 3 jours. En effet, des métabolites différents peuvent parfois être produits selon les différents stades de croissance et de sporulation de ces bactéries. Ces disques ont ensuite été déposés sur les boîtes de souches bioindicatrices en triplicats (cf. figure 13) puis incubées à 28°C pendant 48h. Des halos ont alors pu être observés lorsqu'un effet bactéricide existait.

6. Applications des résultats en truffière expérimentale

Nous avons précédemment émis l'hypothèse que les bactéries présentes dans les truffes pouvaient avoir un impact sur son développement. Différents tests fonctionnels ont donc été réalisés *in vitro*, mais nous avons également décidé de tester les potentialités de ces bactéries *in situ*. Pour cela, nous sommes partis de la pratique culturale des « pièges à truffes » qui permettrait potentiellement d'augmenter la production truffière localement. Ces pièges consistent à prélever une carotte de sol à proximité d'un arbre hôte, puis à remplacer la terre extraite par de la tourbe

Souche	Genre	Mélange
D6AOUT17	<i>Bosea</i>	1
D5AOUT5	<i>Rhizobium</i>	1
D3AOUT23	<i>Bosea</i>	1,2
D3AOUT26	<i>Rhizobium</i>	1,2
D6AIN13	<i>Bosea</i>	1
D6AIN6	<i>Bosea</i>	1
D3AIN8	<i>Bosea</i>	1,2
D3AIN25	<i>Phyllobacterium</i>	1,2
D3AIN13	<i>Achromobacter</i>	2
D5AS11	<i>Pseudomonas</i>	2
D6AOUT2	<i>Rathayibacter</i>	2
D6AOUT16	<i>Streptomyces</i>	2
D6AS19	<i>Ensifer</i>	2
D34AIN17	<i>Pedobacter</i>	2

Tableau 10 : Liste des souches utilisées dans les mélanges bactériens inoculés en truffière

N° arbre	
A	Rien
B	Trou (terre remise)
C	Trou + tourbe
D	Trou + tourbe + spores
E	Trou + tourbe + mélange 1
F	Trou + tourbe + mélange 2
G	Trou + tourbe+ spores + mélange 1
H	Trou + tourbe+ spores+ mélange 2
O	Arbre non expérimenté

} Témoins

Tableau 11 : Liste des différents traitements appliqués en truffière (cf. tableau12)

mélangée à des spores de truffes. Ici, nous avons d'une part testé l'hypothèse selon laquelle ces spores augmentent la production localement, et parallèlement expérimenté si l'apport de deux mélanges de bactéries pouvait augmenter la production, en présence ou en absence de spores. Le premier mélange était composé de souches bactériennes dominantes dans la gleba, faisant partie des alpha-Protéobactéries, tandis que le second était composé d'autres groupes bactériens dont l'activité s'est révélée positive lors des précédentes expériences (*cf. tableau 10*). Pour cela, les bactéries choisies ont d'abord été incubées à 25°C pendant 48h sur du milieu gélosé TSA 1/10^{ème}, puis quelques colonies ont été prélevées et placées dans 10mL d'eau stérile. Un volume de 2mL des suspensions a ensuite été étalé en tapis à l'aide de billes sur des boîtes de TSA de diamètre 140mm, puis de nouveau incubé 48h à 25°C. Les bactéries ont ensuite été récupérées à l'aide de râpeaux stériles puis placées individuellement dans 200mL de MgSO₄ 0,1M. Leur absorbance a été ajustée à 0,5 unité de DO_{590nm}, puis les solutions sont mélangées. Ces mélanges ont alors été ajoutés à 35L de tourbe puis mélangés à la bétonnière, et les témoins ont été préparés comme présentés *tableau 11*. Des trous d'environ 5L ont ensuite été creusés à l'aide d'une foreuse, puis la terre a été remplacée par le mélange prévu. Les traitements ont été répartis dans la truffière en trois blocs, chacun étant homogène en espèces d'arbres et en situation, dans lesquels ont été fait quatre répétitions de chaque traitement (*cf. tableau 12*). La production de truffes dans le dispositif sera suivie par le trufficulteur pendant les trois saisons de production suivant l'inoculation.

			F2	0					
			G2	0					
			0	0					
			H2	0					
		E2	0	0					
		D2	0	0					
		C2	0	0					
A1	0	0	A2	0					
B1	F1	0	0	0					
C1	G1	B2	0	0					
D1	0	D3	0	0	0				
E1	H1	0	0	0	0	0			
H2	D2	0	0	0	0	0	0		
G2	C2	E3	G3	0	0	0	0	0	
F2	B2	0	0	0	0	0	0	0	
E2	A2	0	H3	0	0	0	0	0	D4
G3	F3	0	0	0	B4	0	0	0	E4
A3	0	F3	A4	0	0	0	0	0	F4
B3	H3	0	0	0	H1	0	0	0	
D3	E3	0	B1	E1	0	0	0	0	
C3	B3	A1	C1	F1	0	0	0	0	
A3	C3	0	D1	G1	H4	C4	0	0	
0	0	A1	B1	C1	A4	0	C4	0	
0	H4	D1	E1	0	B4	D4	D4	0	
G4	0	F1	G1	0	0	E4	E4	0	
0	0	H1	A2	B2	C4	0	F4	0	
0	E2	C2	D2	F2	0	V	G4	0	
0	0	G2	H2	A3	0	F4	H4	0	
H3	0	B3	C3	0	0	0	A4	0	
0	0	D3	E3	0	G4		B4	0	
0	F3	G3							

1	Chêne vert			
2	Chêne vert			
3	Chêne vert+ pubescent			

Tableau 12 : Plan de la truffière expérimentale divisée en trois blocs (orange, vert, bleu), dans lesquelles quatre répétitions sont effectuées (1,2,3,4). Les lettres correspondent au traitement effectué (cf. tableau 11)

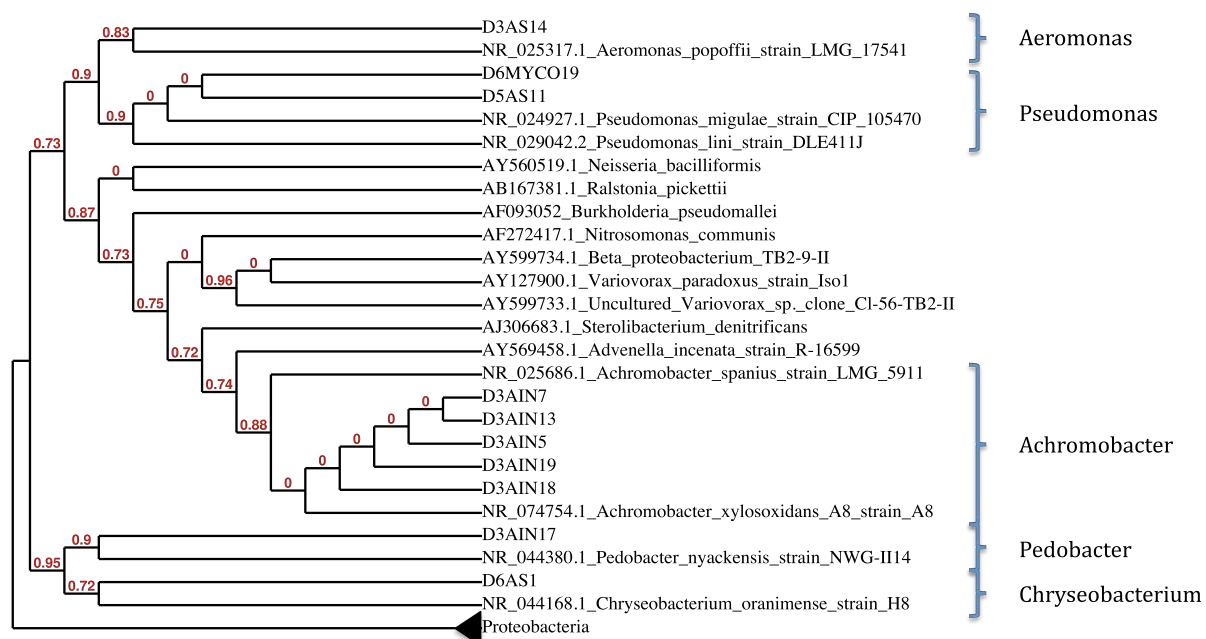


Figure 14 : Arbre phylogénétique représentant les séquences ADNr 16S des Beta-, Gamma-proteobacteries et Bacteroidetes obtenues à partir des collections bactériennes. Les nombres à chaque nœud représentent la valeur de bootstrap obtenue pour 100 échantillonnages

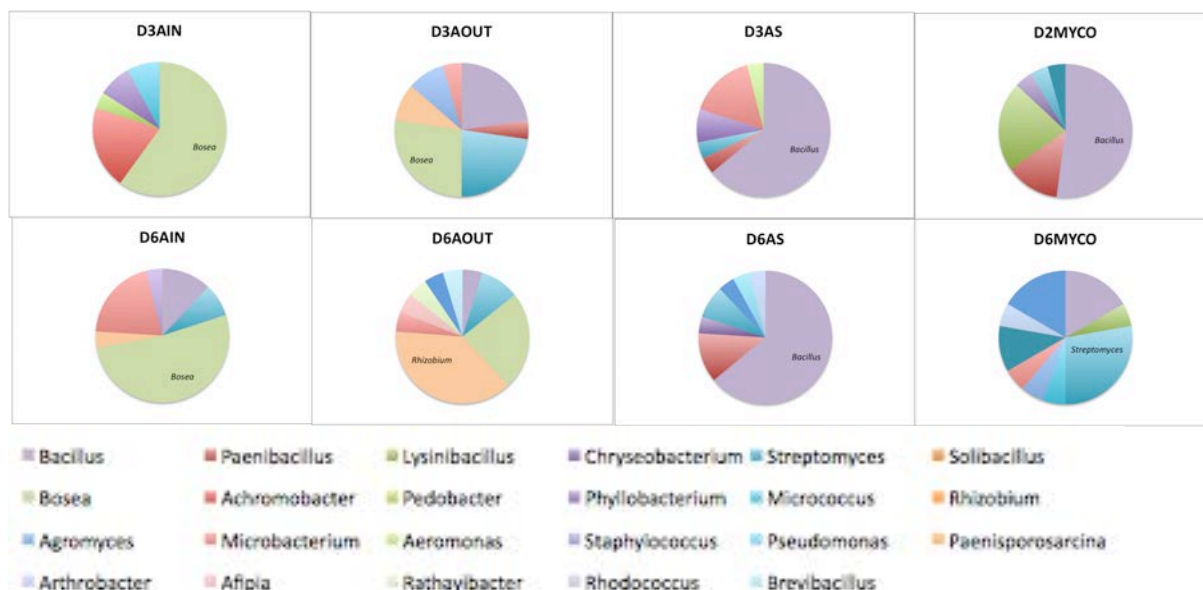


Figure 15 : Distribution des souches testées

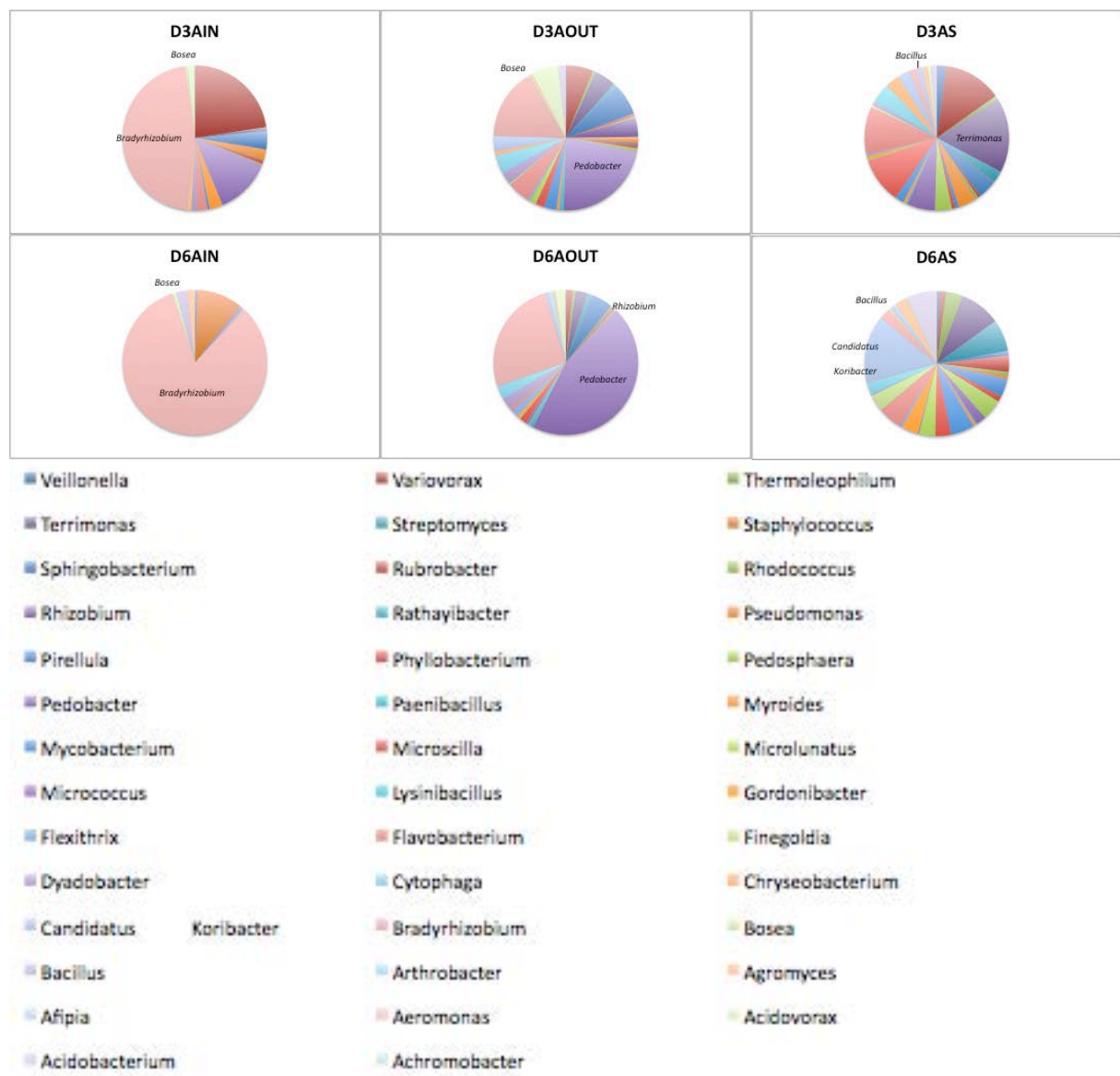


Figure 16 : Répartition des souches bactériennes retrouvées par pyroséquençage par compartiment et par stade

III. Résultats

1. Analyse taxonomique

A partir des échantillons provenant des différents compartiments testés (gleba, peridium, mycorhizes, sol) à différents stades (Octobre et Janvier), 180 isolats ont été sélectionnés aléatoirement pour la suite des expériences. Avant de tester les potentiels fonctionnels de ces isolats, nous avons voulu avoir une meilleure connaissance de la collection bactérienne, via l'analyse des séquences 16S ARNr des groupes taxonomiques présents ainsi que de leurs proportions. Parmi les 200 souches bactériennes analysées, la portion 16S de l'ARNr de 180 souches a pu être amplifiée par PCR et une séquence exploitable pour des analyses phylogénétiques a pu être obtenue pour 169 souches. (cf. figure 14). Les souches cultivées se répartissent au sein de 4 phyla : les Actinobactéries, les Firmicutes, les Protéobactéries et les Bactéroidetes, et de 22 genres différents. La composition des communautés isolées diffère d'un compartiment à l'autre puisque les souches isolées du sol et des mycorhizes sont dominées par des Firmicutes (genre *Bacillus*) (cf. figure 14) tandis que les souches isolées du péridium et de la gleba appartiennent essentiellement aux alpha-Protéobactéries (genres *Bosea* et *Rhizobium*). Par ailleurs, les communautés varient en fonction du stade de maturation en particulier dans les mycorhizes, où les Firmicutes (genre *Bacillus* 52%) dominant en Octobre, tandis que ce compartiment est dominé par des Actinobactéries (genre *Streptomyces* 42%) en Janvier. De même, dans le péridium, le genre *Bosea* domine en Octobre (27%) tandis que le peridium en Janvier est dominé par le genre *Rhizobium* (54%). En particulier, on voit les proportions de genres *Streptomyces* et *Bacillus* chuter entre Octobre et Janvier (de 23 à 0% pour le genre *Bacillus* et de 23 à 15% pour les *Streptomyces*). Le sol et la gleba reste dominés par les mêmes genres bactériens (respectivement *Bacillus* et *Bosea*) malgré les changements temporels.

2. Représentativité de l'approche cultivable

Les analyses de séquences cultivables ont été comparées avec les données de pyroséquençage obtenues à partir des mêmes échantillons pour les compartiments de la gleba, du peridium et du sol aux différents stades (Antony-Babu *et al*, 2013 ; cf. figure 16). Les souches bactériennes analysées se répartissent en 9 phyla dont 41 genres différents. De même que pour les souches cultivables, les communautés bactériennes analysées par pyroséquençage présentent une variation en fonction du compartiment d'origine. La gleba contient majoritairement des alpha-Protéobactéries (genre *Bradyrhizobium*) tandis que le peridium est dominé par des séquences 16S ARNr groupe des Bactéroidetes (genre *Pedobacter*) et des alpha-Protéobactéries (genre *Bradyrhizobium*). Les groupes bactériens majoritairement représentés dans l'ascocarpe (peridium et gleba confondus) sont donc les mêmes que ceux obtenus à travers l'approche cultivable mais

avec une distribution différente. Cependant, les genres retrouvés dans ces compartiments varient par leur diversité et leur structure. Quant au sol, il contient majoritairement des Bacteroidetes (genre *Terrimonas*), des Acidobactéries (genre *Candidatus Koribacter*) et des Actinobactéries (genre *Streptomyces*). Contrairement aux compartiments précédents, les genres bactériens retrouvés par les méthodes de pyroséquençage sont donc différentes de celles isolées sur boîtes de Petri à partir du sol (majoritairement des Firmicutes). Les mêmes variations temporelles que pour l'approche cultivable sont cependant observées dans chacun des compartiments, au niveau des proportions de genres bactériens présents. D'autre part, dans le sol, on ne retrouve pas la même diversité par l'approche cultivable où seuls 12 genres différents ont été obtenus, qu'avec les données de pyroséquençage où l'on compte 31 genres différents.

3. Potentiels nutritionnels des souches colonisant l'ascocarpe

Grâce à une approche cultivable, nous souhaitons déterminer le potentiel fonctionnel des souches bactériennes isolées précédemment, afin d'avoir une idée de leur rôle au sein de la truffe noire du Périgord.

a. Mobilisation des composés inorganiques

i) Potentiel de solubilisation du phosphate inorganique

Tout d'abord, nous avons réalisé des tests de mobilisation du phosphate sur boîtes de Petri afin de vérifier si les bactéries de notre collection avaient cette capacité. Cependant, seuls 16% des isolats ont eu une croissance sur le milieu TCP (*cf. annexe 1*). De plus, la croissance de la plupart d'entre eux n'était que résiduelle. Sur ces 16%, seules 4 isolats bactériens ont présenté un réel halo de solubilisation. L'isolat solubilisant le phosphore retrouvé dans le peridium au stade immature était apparentée à un genre *Streptomyces*, de même que celui retrouvé dans le sol au même stade. Les deux autres, retrouvées dans le sol et dans les mycorhizes en Janvier (stade mature), étaient apparentés à des *Pseudomonas*.

ii) Potentiel de chélation du fer

Les tests de chélation ont également été réalisés sur boîtes de Petri, à l'aide de deux milieux gélosés différents permettant la détection des souches possédant des sidérophores, afin d'avoir deux approches complémentaires. 21% des isolats ont eu une croissance résiduelle sur le milieu CAS. Les tests de toxicité d'un composant du milieu, le HDTMA, a également montré que seuls 9% des isolats pouvaient croître sur ce composé. Parmi ceux-ci, un seul, appartenant au genre *Bacillus* et retrouvé dans le sol en Octobre, a présenté un halo de mobilisation du fer.

Par contre, pour le milieu KB, 91% des souches testées ont présenté une croissance. Cependant, seules quelques souches ont présenté un halo de fluorescence aux UV : une par

Echantillons	δN^{15}
Truffe autoclavée 1	6,57
Truffe autoclavée 2	8,56
Truffe autoclavée 3	6,75
Truffe traitée au N^{14} 1	5,79
Truffe traitée au N^{14} 2	7,69
Truffe traitée au N^{14} 3	8,96
Truffe traitée au N^{15} 1	6,70
Truffe traitée au N^{15} 2	8,32
Truffe traitée au N^{15} 3	7,58

Tableau 13 : Résultats obtenus lors de l'expérience de fixation d'azote N^{15}

compartiment, sauf dans la gleba et dans les mycorhizes au stade immature ou il n'y a aucune souche positive. Parmi les cinq souches présentant un halo de dégradation, celle retrouvée dans le peridium au stade immature appartenait au genre *Streptomyces* tout comme celle retrouvée dans le sol au même stade. Celle retrouvée dans le peridium mature appartenait au genre *Bosea*, tandis que les deux souches positives retrouvées dans le sol et dans les mycorhizes en Janvier étaient apparentées à des *Pseudomonas*.

iii) Potentiel de fixation de l'azote atmosphérique

Pour ce qui est de la fixation de l'azote atmosphérique, nous avons recherché chez les bactéries de la collection la présence du gène *nifH* codant la nitrogénase. Pour cela, nous avons testé plusieurs protocoles afin de trouver celui le plus adapté. Dans un premier temps, nous avons utilisé le protocole de la PCR nichée utilisant les amorces *nifH*-f1-forA/*nifH*-f1-rev puis *nifH*-f1-forB/*nifH*-f1-rev, en travaillant sur de l'ADN extrait. Cependant, les produits obtenus étaient très spécifiques, et ce même en réalisant une PCR à gradient de températures. La PCR utilisant les amorces IGK3/DVV semblait plus spécifique, cependant l'amplification s'est avérée très faible voire nulle sur les témoins positifs. Avec les amorces PolyF/R, une seule bande de forte intensité a été obtenue pour les témoins positifs et aucune bande pour les témoins négatifs. C'est donc le couple d'amorces que nous avons choisi pour la suite des expériences. Nous avons ensuite comparé la qualité des amplicons issus de ce protocole obtenus à partir d'extraits d'ADN et à partir de suspensions bactériennes lavées comme précédemment (cf. figure 9), afin de vérifier si nous pouvions réaliser la réaction de PCR directement à partir des cultures, sans en extraire l'ADN. Les bandes obtenues avec les témoins en suspension liquide étant identiques à celles des ADN, nous avons réalisé les PCR à partir de suspensions bactériennes de la collection.

A l'issue des migrations, 16 souches bactériennes ont présenté une bande d'amplification, mais seulement cinq échantillons présentaient des fragments dont la taille semblait correspondre à celle du gène *nifH* de 360pb. Ces produits PCR sont actuellement en cours de séquençage par Eurofins afin de confirmer qu'il s'agit bien du gène codant la nitrogénase réductase. Deux des souches bactériennes possédant ce fragment ont été retrouvées dans la gleba et trois dans le peridium. Parmi ces bactéries, une de celles retrouvées dans la gleba était apparentée à au genre *Bosea* tandis que les quatre autres étaient apparentées au genre *Rhizobium*. D'autre part, les cinq séquences ont été retrouvées au stade mature de la truffe.

Pour les expériences de fixation de l'azote N^{15} (cf. tableau 13), les moyennes des δN^{15} des contrôles négatifs (truffes traitées au N^{14} et truffes autoclavées) étaient respectivement de 7,48 (\pm

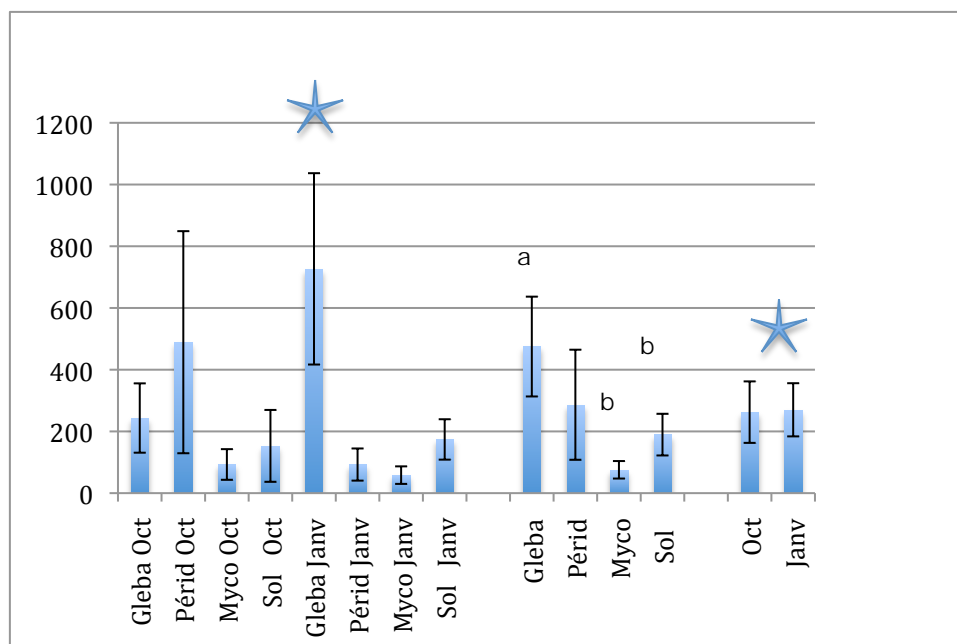


Figure 17 : Moyenne des activités glucopyranosidase par compartiment et par stade : Les étoiles représentent les compartiments montrant une activité significative appuyée par test de Kruskal-Wallis., tandis que les lettres montrent les différences obtenues avec les tests de Khi2

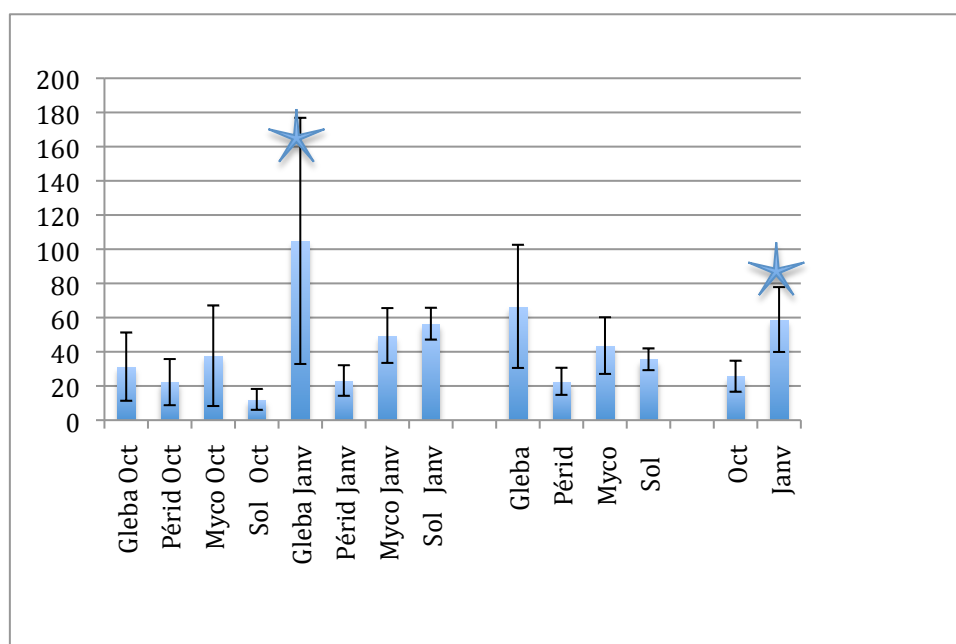


Figure 18 : Moyenne des activités cellobiosidase par compartiment et par stade : Les étoiles représentent les compartiments montrant une activité significative appuyée par test de Kruskal-Wallis., tandis que les lettres montrent les différences obtenues avec les tests de Khi2.

1,6) et de 7,29 ($\pm 1,1$). La moyenne des valeurs obtenues pour les trois truffes traitées au N¹⁵ était de 7,53 ($\pm 0,8$). Cette approche n'a donc pas permis de mettre en évidence la fixation d'azote.

b. Dégradation de la matière organique
i) Potentiel de dégradation de la cellulose

Dans un premier temps nous avons testé la dégradation de la cellulose sur boîtes de Petri en utilisant le milieu CMC. Sur ce milieu, 82% des souches testées ont présenté une croissance (*cf. annexe 1*). Après révélation de l'activité cellulolytique, peu de souches se sont avérées positives (*cf. annexe 2*). En analysant l'origine des souches bactériennes présentant un potentiel cellulolytique, on remarque que la majorité d'entre elles sont rencontrées dans le sol et les mycorhizes, et quelques-unes dans le peridium. De plus, toutes ces souches dégradant la cellulose font partie du groupe des *Bacilliales* ou des *Actinomycetes*. D'un point de vue temporel, 11 isolats se sont révélés capables de dégrader la cellulose en Octobre et 12 en Janvier. Ce résultat suggère qu'il n'y a donc pas de variation d'efficacité en fonction du temps.

Dans un second temps, nous avons réalisé des mesures d'activités enzymatiques par fluorescence en microplaques afin d'avoir une seconde approche de détection des potentiels enzymatiques des souches bactériennes de notre collection (*cf. annexes 3 et 4, figures 17, 18, 19*). Notamment, afin de vérifier le potentiel exocellulolytique des souches nous avons testé les activités glucopyranosidase et cellobiohydrolase des souches de la collection.

Variations temporelles

Premièrement, 40% des isolats ont une activité glucopyranosidase en Octobre, alors qu'on en trouve 51% en Janvier, quant aux activités cellobiohydrolases, en Octobre 48% des isolats se sont révélés positifs et 39% en Janvier. Cependant l'analyse des moyennes révèle des résultats similaires pour les deux stades vis-à-vis de l'activité glucopyranoside (263 en Octobre et 270 en Janvier), mais pour l'activité cellobiohydrolase une moyenne d'activités plus élevée a été observée en Janvier (58) par rapport au mois d'octobre (26). Le test de Kruskal-Wallis révèle une différence significative ($p\text{-value} < 0,05$) en fonction de la période de récolte des échantillons. En effet, on relève des $p\text{-values}$ de 0,014 pour l'activité glucopyranosidase et de 0,002 pour l'activité cellobiohydrolase. Pour les tests Khi2, afin d'avoir des effectifs suffisants les données ont été triées en deux catégories : les souches bactériennes ayant une activité nulle et celles ayant une activité positive. Cependant, cette analyse ne souligne pas de différence ($p\text{-value} < 0,05$) entre les mois d'Octobre et de Janvier puisqu'on obtient une $p\text{-value}$ de 0,15 pour l'activité glucopyranosidase et de 0,20 pour l'activité cellobiohydrolase. Plus de souches ayant une activité glucopyranosidase ont donc été retrouvées en Janvier. L'absence de différence significative observée avec le test de Khi2

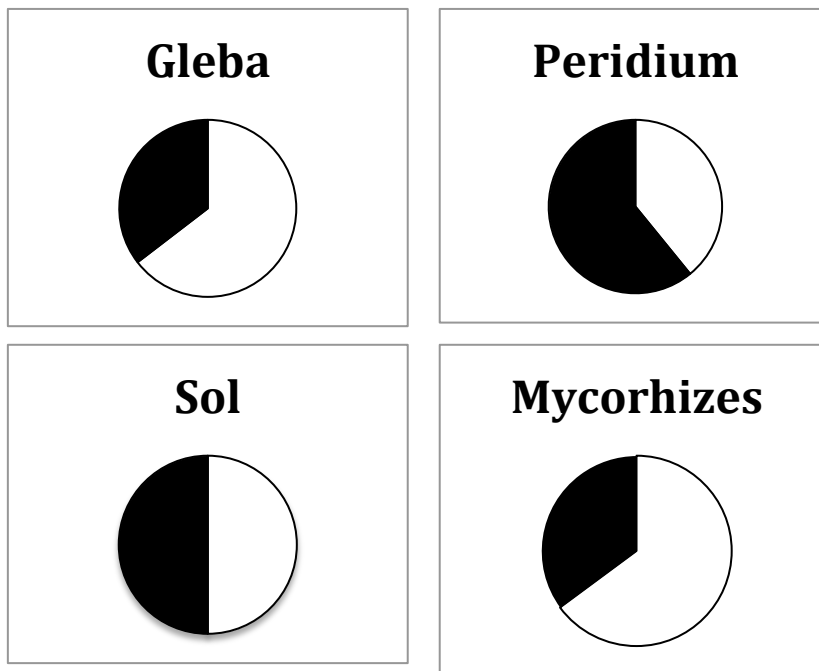


Figure 19 : Distribution des souches positives pour la glucopyranosidase en fonction des compartiments (en noire). Les souches non efficaces sont en Blanc

est probablement due au choix des catégories, alors que le test de Kruskal-Wallis analyse la somme des rangs des échantillons. Vis-à-vis de l'activité cellobiohydrolase, on retrouve donc moins de souches positives en Janvier, mais celles-ci ont des activités plus élevées. Globalement, l'activité exocellulolytique semble alors plus présente en Janvier qu'en Octobre, tous compartiments confondus.

Impact de l'origine écologique

Les tests de Kruskal-Wallis ne révèlent pas de différence significative (p-value de 0,153) entre les compartiments pour l'activité glucopyranosidase. Cependant, le test de Khi2 montre une différence entre les pourcentages d'isolats positifs, qui sont de 35% pour la gleba, 62% pour le peridium, 34% pour les mycorhizes et 50% pour le sol. L'effectif des souches ayant une activité est significativement plus élevé dans le péridium par rapport à celui de la gleba et des mycorhizes. Par contre, l'efficacité moyenne la plus élevée est observée dans la gleba. La gleba contient donc moins de souches positives, mais caractérisées par un potentiel fonctionnel plus élevé. Concernant l'activité cellobiohydrolase, les deux tests montrent une similarité de distribution des activités enzymatiques entre les compartiments, puisqu'on obtient des pourcentages de 46% d'isolats positifs pour la gleba, 49% pour le peridium, 37% pour les mycorhizes et 42% pour le sol. En effet, les p-values obtenues sont de 0,110 pour le test de Kruskal-Wallis et de 0,800 pour le test Khi2. Globalement, l'activité exocellulolytique semble alors plus présente dans l'ascocarpe (peridium et gleba) que dans les autres compartiments.

Impact de l'origine écologique et du stade de développement de la truffe

Statistiquement, les tests de Kruskal-Wallis révèlent une différence significative de distribution des isolats positifs pour les deux activités exocellulolytiques en fonction du compartiment et du stade, ce qui n'est pas le cas du test Khi2. La moyenne des activités cellobiohydrolases semble en effet plus élevée dans la gleba au stade mature que dans toutes les autres catégories (105), tendance également observée pour l'activité glucopyranosidase (moyenne de 727) bien qu'une moyenne élevée ait également été relevée dans le peridium au stade immature (moyenne de 489). Cependant, les effectifs de souches positives pour la glucopyranosidase n'évoluent pas dans l'ascocarpe par rapport à la saison. On remarque néanmoins une augmentation de l'effectif de souches positives en Janvier par rapport au moins d'Octobre dans les mycorhizes et dans le sol. Globalement, même si l'effectif des souches ayant une activité exocellulolytique ne varie pas dans l'ascocarpe par rapport au temps, l'activité moyenne augmente significativement.

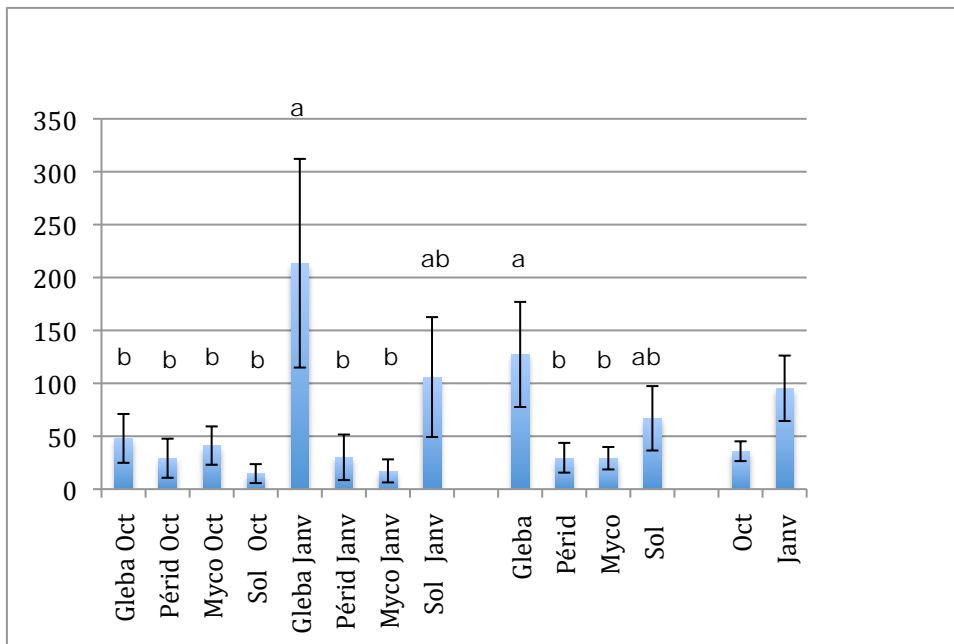


Figure 20 : Moyenne des activités xylosidase par compartiment et par stade : Les étoiles représentent les compartiments montrant une activité significative appuyée par test de Kruskal-Wallis., tandis que les lettres montrent les différences obtenues avec les tests de Khi2.

De plus, les souches présentant ces potentiels enzymatiques font majoritairement partie des genres *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces* ou *Bosea*.

ii) Potentiel de dégradation de l'hémicellulose

La dégradation de l'hémicellulose se fait à travers les activités enzymatiques xylosidase et glucuronidase. Ces activités ont été testées à l'aide de tests enzymatiques en microplaques comme précédemment. Les activités glucuronidases n'ont pas pu être analysées par le test Khi2 du fait de la trop forte proportion en isolats ayant une activité nulle. De même, les résultats obtenus par test de Kruskal-Wallis n'ont démontré aucune différence significative entre les compartiments ou entre les stades pour les deux activités. Cependant ce résultat est probablement dû à la distribution des données. Seules les données d'activité xylosidase seront donc détaillées par la suite. Pour les tests Khi2, afin d'avoir des effectifs suffisants les données ont été triées en deux catégories : les souches bactériennes ayant une activité nulle et celles ayant une activité positive.

Variations temporelles

L'observation des moyennes des activités xylosidases révèle une activité plus élevée (mais non significative) en Janvier (95) qu'en Octobre (36). De même, la proportion d'isolats présentant une activité xylosidase s'est avérée plus élevée en Janvier (31%) par rapport au mois d'Octobre (22%) (cf. figure 20).

Impact de l'origine écologique

Les moyennes obtenues pour l'activité xylosidase révèlent une plus forte activité dans la gleba (127) que dans les autres compartiments (30 pour le peridium, 29 pour les mycorhizes et 67 pour le sol). Cependant, l'effectif des souches efficaces est supérieur dans le peridium (49%) par rapport aux autres compartiments (15% pour la gleba, 21% pour les mycorhizes et 23% pour le sol). Ce résultat est confirmé par le test de Khi2 avec lequel on obtient une p-value de 0,002.

Impact de l'origine écologique et du stade de développement de la truffe

L'analyse de l'ensemble des catégories révèle une proportion significativement supérieure d'isolats présentant une activité xylosidase dans le peridium en Janvier (57%) que dans les autres catégories, en particulier la gleba en Octobre (20%). Par ailleurs, l'observation de l'ensemble des catégories montre une moyenne plus élevée en Janvier dans la gleba (214) que dans les autres compartiments.

De même que précédemment, on observe que les genres les plus représentés parmi les souches efficaces font partie des genres *Arthrobacter*, *Bacillus* ou *Streptomyces*.

iii) Potentiel de mobilisation du phosphate organique

Dans un premier temps, nous avons essayé de déterminer la capacité des souches à solubiliser le phosphore inorganique, mais ici nous cherchons à analyser le potentiel de ces souches à rendre accessible le phosphore organique. Pour les tests Khi2, afin d'avoir des effectifs suffisants les données ont été triées en deux catégories : les souches bactériennes ayant une activité inférieure à 200 et celles ayant une activité supérieure à 200.

Variations temporelles

Aucun des deux tests statistiques ne montre de différence significative entre les stades tous compartiments confondus. D'ailleurs les moyennes des deux stades sont similaires : 2244 en Octobre et 2421 en Janvier. Cependant, lorsqu'on observe les effectifs des catégories efficaces, on remarque une proportions plus importante de souches ayant une activité en Janvier (59%) qu'en Octobre (45%).

Impact de l'origine écologique

Le test de Kruskal-Wallis ne révèle aucune différence entre les compartiments, contrairement au test de Khi2 (p-value <0,00001) avec lequel on remarque des effectifs de souches positives sont plus élevés dans l'ascocarpe (peridium : 62% et gleba : 77%) que dans le sol (27%) et les mycorhizes (39%). Par ailleurs, les moyennes d'activités phosphatases sont plus élevée dans les mycorhizes (3420) et dans le sol (2815) que dans l'ascocarpe (peridium : 1743 et gleba : 1545).

Impact de l'origine écologique et du stade de développement de la truffe

L'analyse de l'ensemble des catégories révèle une différence significative appuyée par le test Khi2 (p-value < 0,0001) entre l'effectif des souches positives de la gleba (80%) et du sol (23%) en Octobre, et entre celui du peridium (87%) et du sol (32%) en Janvier. L'analyse des moyennes par contre, ne révèle pas de différence.

De même que précédemment, on observe que les genres les plus représentés parmi les souches efficaces font partie des *Brevibacillus* et *Pedobacter*.

4. Rôle potentiel des bactéries dans la libération des spores

De même que précédemment, le potentiel de dégradation de la paroi fongique, et ainsi le potentiel d'aide à la libération des spores des souches testées a tout d'abord été mesuré à l'aide de tests fonctionnels sur boîte de Petri. Cependant, sur le milieu CYM contenant de la chitine, on remarque un déséquilibre dans le pourcentage de souches parvenant à croître sur ce milieu. Le pourcentage de croissance moyen n'est que de 47% alors que dans la gleba immature, il est de

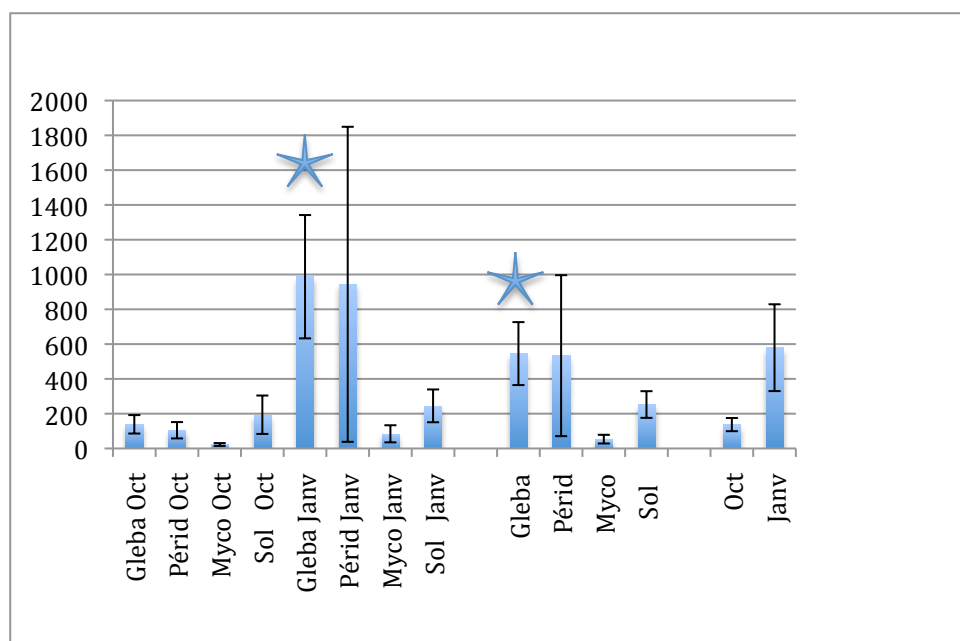


Figure 21 : Moyenne des activités N-actéyl-glucosaminidase par compartiment et par stade : Les étoiles représentent les compartiments montrant une activité significative appuyée par test de Kruskal-Wallis, tandis que les lettres montrent les différences obtenues avec les tests de Khi2.

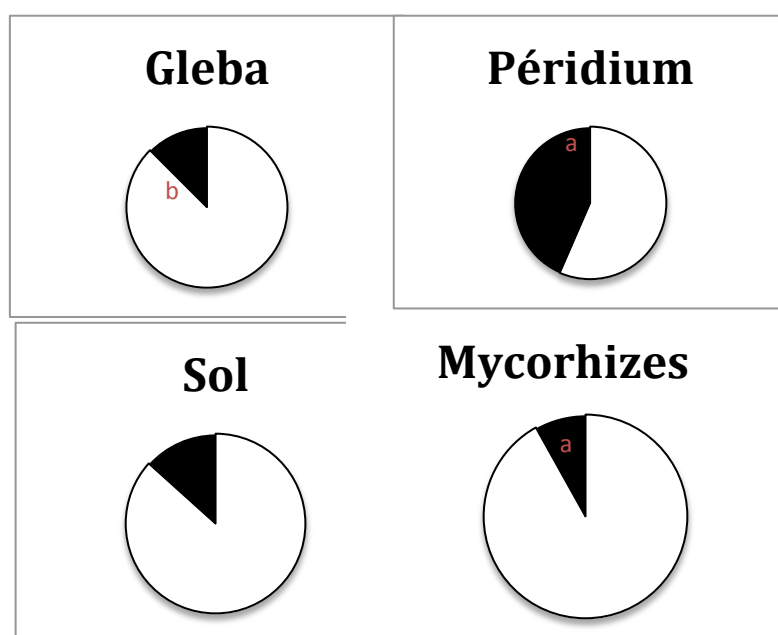


Figure 22 : Distribution des souches positives pour la N-actéyl-glucosaminidase en fonction des compartiments (en noire). Les souches non efficaces sont en Blanc

remarque un déséquilibre dans le pourcentage de souches parvenant à croître sur ce milieu. Le pourcentage de croissance moyen n'est que de 47% alors que dans la gleba immature, il est de 83%. De plus, seules cinq souches sont parvenues à dégrader la chitine et ainsi créer un halo de dégradation : en Octobre une dans le peridium, une dans les mycorhizes et une dans le sol, et en Janvier deux dans le sol. Parmi celles-ci, quatre faisaient partie du genre des *Streptomyces* et une au genre des *Agromyces*.

A la suite de cette expérience, nous avons réalisé des tests enzymatiques en microplaques comme précédemment afin de déterminer l'activité N-acétyl-glucosaminidase de chaque souche (cf. figures 21 22 et 23). Pour les tests Khi2, afin d'avoir des effectifs suffisants les données ont été triées en deux catégories : les souches bactériennes ayant une activité inférieure à 200 et celles ayant une activité supérieure à 200.

Variations temporelles

L'analyse de Khi2 montre une variation de la distribution des souches efficaces significativement différente en fonction du temps tous compartiments confondus (p-value de 0,007). La proportion de souches ayant une activité supérieure à 200 est de 28% en Janvier alors qu'il est de 11% en Octobre. Par ailleurs, l'observation des moyennes nous mène à la même conclusion puisqu'on obtient une moyenne de 59% d'activité pour les isolats provenant d'échantillons récoltés en Janvier et de 26% pour les isolats provenant d'échantillons récoltés en Octobre. Le test de Kruskal-Wallis n'a pas révélé de différence significative.

Impact de l'origine écologique

La variation d'activité exochitinase d'un point de vue spatial a été montrée à l'issue des tests de Kruskal-Wallis (p-value de 0,002) et de Khi2 (p-value <0,0001). En effet, il semble y avoir une proportion plus élevée d'isolats ayant une activité supérieure à 200 dans le peridium (44%) que dans les autres compartiments (gleba 13%, sol 13% et mycorhizes 8%). L'analyse des moyennes révèle par ailleurs des activités plus élevées dans la gleba (545) et dans le peridium (534) que dans le sol (253) et les mycorhizes (54).

Impact de l'origine écologique et du stade de développement de la truffe

L'analyse de l'ensemble des catégories révèle une proportion d'isolats ayant une activité supérieure à 200 significativement supérieure dans le peridium en Janvier, donnée appuyée par tests de Khi2 (p-value de 0,0003) et de Kruskal-Wallis (p-value de 0,004). De même, une observation des moyennes d'activités obtenues nous permet de relever une activité bien plus forte

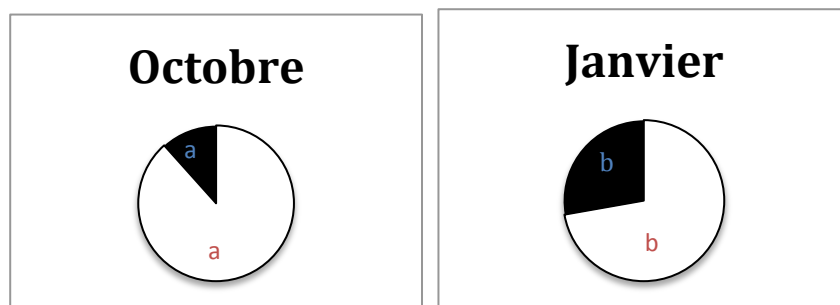


Figure 22 : Distribution des souches positives pour la N-actéyl-glucosaminidase en fonction du stade (en noire). Les souches non efficaces sont en Blanc

5. Rôle potentiel des Actinomycètes dans la structuration des communautés microbiennes associées à la truffe noire

Afin de comprendre comment sont sélectionnées les bactéries retrouvées à l'intérieur de la truffe, nous avons voulu savoir si les Actinomycètes présents dans la truffe, groupe taxonomique connu pour sa production de nombreux métabolites secondaires, avaient un effet sur la croissance (ou l'inhibition de croissance) des bactéries provenant des différents compartiments. Ces expériences sont actuellement en cours, mais pour le moment sur 15 Actinomycètes testés, deux ont inhibé la croissance de la souche Gram positive et de la souche Gram négative utilisée comme bioindicateurs. Les deux souches ont été isolées en Janvier, une appartenant au groupe des *Arthrobacter* retrouvée dans le sol et l'autre appartenant au genre *Microbacterium* retrouvée dans la gleba. Si ce groupe sert effectivement à créer une niche particulière au sein de la truffe, on s'attend à ce qu'il y ait des différences statistiquement significatives en terme de production d'antibiotiques par les Actinomycètes des différents compartiments. D'une part, il est possible que les Actinomycètes de l'ascocarpe produisent plus d'antibiotiques que ceux des autres compartiments. Dans ce cas, cela induirait une sélection plus stricte des communautés bactériennes associées à la truffe. D'autre part, si les Actinomycètes de l'ascocarpe produisaient moins d'antibiotiques que ceux des autres compartiments, cela pourrait permettre une meilleure colonisation de la truffe par certains genres bactériens.

6. Application possible des bactéries en trufficulture

Nous avons cherché à tester si certaines souches bactériennes enrichies dans les ascocarpes de truffes étaient susceptibles de stimuler la formation de truffes après inoculation dans le sol en période de formation des truffettes. Cependant, l'effet de cette inoculation ne pourra être mesuré qu'en période de production des truffes, à la fin du cycle annuel de développement du champignon c'est à dire pendant l'hivers 2014-2015 et les années suivantes. Les résultats ne sont donc pas encore disponibles. Deux paramètres ont ici été testés : l'ajout de spores fongiques au pieds des arbres et l'inoculation de bactéries. Si l'inoculation de spores stimule la fructification, on s'attend à ce que les essais avec ajout de spores aient une productivité plus élevée que ceux des témoins (sans ajout et creusement d'un trou). Si les souches bactériennes ont un effet positif la formation des truffes, une production supérieure de truffes sera observée dans les traitements inoculés avec des bactéries seules par rapport aux zones non-inoculées. Enfin si un effet synergique existe entre l'inoculation de spores et de souches bactériennes les traitements doubles spores/bactéries devraient fournir le plus fort rendement.

IV. Discussion

1. Représentativité de l'approche cultivable

Les mêmes différences ont pu être observées par les approches cultivables et non cultivables en fonction des compartiments et du stade. Les compartiments (truffe, mycorhize et sol) possèdent donc des communautés bactériennes différentes et dynamiques puisqu'elles évoluent en fonction de la saison, corroborant le phénomène décrit par métagénomique (Antony-Babu *et al*, 2013).

D'autre part, l'analyse de la distribution des genres bactériens par ces deux méthodes révèle que la richesse bactérienne retrouvée par pyroséquençage dans les compartiments de la truffe est semblable à celle retrouvée par l'approche cultivable puisque moins d'une dizaine de genres différents ont pu être isolés à partir du peridium et de la gleba. Néanmoins, la diversité retrouvée dans le sol par l'approche cultivable ne reflète pas celle obtenue par pyroséquençage puisqu'elle est divisée par 2. Ce résultat est classiquement observé dans les approches cultivables. En effet, l'approche cultivable est souvent indispensable pour étudier les propriétés métaboliques et fonctionnelles des microorganismes, surtout des fonctions dont on ne connaît pas les gènes, néanmoins elle induit des biais qualitatif et quantitatif. Cette approche ne reflète pas la vraie structure des communautés bactériennes car on estime que seul 1% de la diversité bactérienne environnementale est cultivable. Parmi les microorganismes non-cultivables certains ont des conditions de croissance spécifiques (Vaz-Moreira *et al*, 2009). Le milieu utilisé pour l'isolement des souches bactériennes de la collection était un milieu synthétique pauvre afin que les conditions de croissance soient au plus proche de celles du sol. Cependant l'isolement sur plusieurs milieux de culture aurait pu permettre une meilleure couverture des bactéries présentes. Malgré le manque de diversité des isolats obtenus on peut cependant noter l'isolement de genres bactériens rares d'intérêt pour l'aspect fonctionnel, comme les genres *Pedobacter* ou *Chryseobacterium*, pour lesquels peu d'informations sont disponibles.

Par ailleurs, même si dans l'ascocarpe les groupes taxonomiques majoritaires étaient semblables pour les deux approches, à l'échelle du genre une variabilité a été notée entre les deux méthodes. En effet l'approche haut-débit montre que dans la gleba, le genre *Bradyrhizobium* est dominant. L'approche cultivable montre que c'est le genre *Bosea*, qui est dominant dans la gleba, genre rare dans l'approche haut débit. Cependant, les genres *Bosea* et *Bradyrhizobium* étant phylogénétiquement proches au sein des alpha-protéobactéries. La question d'un biais technique lié à la petite taille des fragments PCR obtenus par pyroséquençage (250 pb contre 800 pb dans l'approche cultivable) peut se poser. Les souches bactériennes essentiellement retrouvées par les deux approches pourraient faire partie du même genre.

a. Facteurs de sélection des communautés microbiennes

La truffe est un habitat microbien particulier puisque les molécules qui la composent pourraient participer à la sélection de communautés bactériennes particulières. Notamment, la présence de chitine dans la paroi cellulaire fongique pourrait participer à cet effet de niche en enrichissant l'ascocarpe en bactéries pouvant bénéficier de ce composé comme source de carbone, ou d'autres composés de la truffe. Ce phénomène est notamment décrit par De Boer *et al* (2004) qui ont observé cette interaction entre l'espèce bactérienne *Collimonas fungivorans* et *Fusarium spp.* De même, la sélection de fonctions particulières a également été observée par Warmink et van Elsas (2008) dans la mycosphère de *Laccaria proxima* où un enrichissement en bactéries hétérotrophes a été découvert. Au cours de mes travaux, un autre facteur potentiel de sélection des bactéries de la gleba a été étudié : la production de métabolites secondaires par les *Actinomycetes* présents dans l'ascocarpe. En effet, de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques ont été retrouvés dans la gleba (Antony-Babu *et al*, 2013). Cependant, il existe également une sélection à échelle plus large qui n'a pas été étudiée au cours de mon stage. Une diminution de la biodiversité bactérienne dans les brûlés a été observée lors d'une étude précédente et serait due à la diminution de la quantité de racines, qui sont inhibées par la truffe (Mello *et al*, 2013), mais aussi au changement des conditions physicochimiques du sol dû à la symbiose ectomycorhizienne (Calvaruso *et al*, 2007). Ce phénomène pourrait donc avoir un rôle dans la sélection bactérienne du sol environnant la truffe, et ainsi favoriser les genres ayant un impact positif sur son développement.

b. Potentiels nutritionnels des souches bactériennes colonisant la truffe

Exploitabilité des résultats fonctionnels

Parmi les isolats bactériens que nous avons testés, de nombreux nous ont posé des difficultés de culture. Sur boîtes de Petri, la proportion de souches bactériennes capables de croître sur les milieux TCP et CAS était trop faibles pour permettre une analyses des souches positives. Cette difficulté à cultiver les bactéries de notre collection sur le milieu CAS peut provenir de la toxicité du composé HDTMA puisque les expériences ont montré un pourcentage de croissance extrêmement faible sur HDTMA seul. Quant aux milieux KB, CMC et CYM, les pourcentages de croissance étaient suffisants, ce qui aurait pu permettre une analyse pertinente des souches positives sur ces milieux. Or, les effectifs des souches positives étant inférieurs à cinq par catégorie, aucune différence significative n'a pu être établie entre les compartiments. De même, de nombreuses activités enzymatiques se sont révélées difficiles à analyser également du fait des

fortes proportions d'isolats bactériens présentant des activités nulles, rendant l'analyse statistique parfois impossible.

Ces tests ont déjà été réalisés sur des communautés bactériennes du sol, et des proportions élevées de croissance et d'isolats positifs avaient pu être observées sur boîtes de Petri (Uroz *et al*, 2009). Par ailleurs, de nombreux isolats s'étaient révélés positifs sur les tests de bioactivités en microplaques (Uroz *et al*, 2013). Il peut donc sembler étonnant d'avoir des difficultés à cultiver nos isolats sur ces milieux. Cependant, les communautés bactériennes étudiées dans notre étude provenaient d'un sol particulier, calcaire au pH basique, alors que l'analyse précédente avait été réalisée sur sol forestier acide (Uroz *et al*, 2013) ou avec des bactéries des genres *Collimonas* et *Burkholderia*, genres non retrouvés dans notre collection (Uroz *et al*, 2009). Les différences de disponibilité en nutriments et la variation de pH pourraient expliquer ces difficultés puisque des communautés bactériennes associées à ce type de sol n'avaient pas encore été étudiées.

a. Mobilisation des composés inorganiques

Dans les régions colonisées par la truffe noire du Périgord, les principaux problèmes de fertilité du sol viennent de la faible teneur en phosphore et en fer (Pavic *et al*, 2013). Le phosphore étant un élément limitant de son environnement nous avons émis l'hypothèse que si les bactéries pouvaient aider à la nutrition de la truffe, elles pourraient le faire à travers leur capacité à solubiliser le phosphore inorganique. Cependant, l'analyse des résultats n'a pas été possible. De même, nous avons voulu savoir si la truffe était enrichie en bactéries produisant des sidérophores, agents de chélation du fer qui est également un élément limitant dans l'habitat de la truffe noire. Si tel avait été le cas, on aurait pu émettre l'hypothèse selon laquelle les bactéries possédant des sidérophores le transféreraient à la truffe. Cependant les résultats obtenus n'ont pas permis de discriminer les compartiments.

Par ailleurs, nous avons recherché chez les bactéries de la collection la présence du gène *nifH* codant la nitrogénase-réductase. Les cinq fragments amplifiés suggèrent potentiellement une proportion plus élevée de bactéries possédant ce gène dans l'ascocarpe, puisqu'aucun gène *nifH* provenant du sol et des mycorhizes n'a été amplifié. S'il permet de décrypter une tendance de sélection de bactéries fixant l'azote au sein de l'ascocarpe, ce résultat est également intéressant par le fait qu'il pourrait prouver la présence du gène dans l'environnement de la truffe une fois la confirmation de séquence obtenue. D'autre part, l'une des bactéries possédant potentiellement le gène de la nitrogénase fait partie du genre des *Bradyrhizobium*. Or, chez *T. magnatum*, ce sont chez des bactéries de ce genre que Barbieri *et al* (2010) ont découvert des activités nitrogénases. La forte proportion d'*alpha-Proteobacteria* dans la gleba pourrait donc expliquer aussi le fait que les gènes nitrogénase n'aient été retrouvés que dans ce compartiment. Cependant, malgré la

découverte de séquences *nifH* par Antony-Babu *et al* (2013) dans ce compartiment et au cours de mes expériences de potentiels fragments de ce gène, il a été montré lors des expériences *in vivo* de fixation d'azote N^{15} que les bactéries associées à la truffes ne semblaient pas fixer activement l'azote et ne contribueraient donc pas à la nutrition de la truffe de cette manière. Il est donc possible que les séquences retrouvées dans l'ascocarpe ne soient pas des gènes de nitrogénase-réductase, réponse qui sera obtenue lors du séquençage. Par ailleurs, il est également possible que le gène ne soit pas exprimé dans l'ascocarpe ou qu'il code une protéine non fonctionnelle. Il se peut aussi que le complexe nitrogénase ne soit pas complet, puisque seule la sous-unité réductase a été recherchée. Ce résultat est étonnant car une fixation d'azote a déjà été prouvée chez *T. magnatum* à l'aide d'un test de réduction de l'acétylène (Barbieri et al, 2010).

b. Dégradation de la matière organique

Afin de mieux connaître la capacité des souches bactériennes de notre collection à dégrader les parois cellulaires végétales, nous avons testé leurs potentiels cellulolytiques et hémicellulolytiques des isolats. Les tests statistiques suggèrent des activités plus élevées en Janvier ainsi que des proportions d'isolats présentant un potentiel exocellulolytique plus grandes. Ce phénomène est également observé pour l'activité chitinolytique et est dû à une sélection des souches en fonction de la période. En effet, les communautés bactériennes présentes dans le sol en hiver auraient une capacité plus élevée à dégrader les substrats carbonés complexes, comme par exemple la cellulose ou la chitine (Koranda *et al*, 2013). Ce phénomène est dû à un changement saisonnier de structure des communautés bactériennes et à une adaptation physiologique de celles-ci. D'autre part, il semblerait que l'activité cellulolytique soit plus élevée dans l'ascocarpe puisqu'on observe les activités les plus fortes dans la gleba, et les proportions de souches positives les plus élevées dans le peridium. Il est donc possible qu'il y ait un enrichissement en souches bactériennes à potentiel cellulolytique au sein de l'ascocarpe. Cependant, ce résultat paraît illogique puisque la truffe n'est pas composée de cellulose ou d'hémicellulose, la niche créée n'est donc pas bénéfique aux bactéries possédant la capacité à dégrader ces molécules. C'est pourquoi mesurer l'activité enzymatique *in situ* est indispensable pour vérifier la présence de cette activité dans l'environnement naturel. De plus, ces tests en microplaques ne sont révélateurs que d'un potentiel exocellulolytique, les résultats négatifs obtenus sur boîtes de Petri sont donc peut-être révélateurs d'une absence d'activité endocellulolytique. D'autre part, les méthodes de pyroséquençage montrent un enrichissement en bactéries du genre *Variovorax* dans la gleba par rapport au sol, or ce genre est connu pour son potentiel cellulolytique (Ghio *et al*, 2012).

c. Rôle potentiel des bactéries dans la libération des spores

Les bactéries présentes dans la truffe pourraient également avoir un rôle dans la maturation de l'ascocarpe, et plus précisément dans la dégradation de la paroi cellulaire fongique, ce qui pourrait permettre en Janvier (stade mature) de favoriser la libération des spores dans le sol. Cette hypothèse a été testée à travers l'activité exochitinytique (test N-acétyl glucosaminidase) des isolats. La même augmentation d'activité en Janvier que pour l'activité cellulolytique a été observée, pour les raisons décrites précédemment. Des activités plus élevées et des proportions de souches positives plus fortes ont aussi été obtenues dans le peridium et dans la gleba. Il est donc possible qu'il y ait une sélection des souches à potentiel chitinytique au sein de l'ascocarpe, permettant ainsi la dégradation de la paroi fongique lorsque les spores sont matures et prêtes à être libérées. Si ces bactéries sont effectivement impliquées dans la dégradation de l'ascocarpe, ce processus pourrait avoir un rôle dans la sélection du microbiote ascocarpique en favorisant les groupes bactériens capables de tirer des nutriments de la paroi cellulaire fongique. Cette activité a déjà été observée chez une souche d'*Actinobacteria* retrouvée chez *T. magnatum* (Pavic *et al*, 2013). Cependant, la présence de cette fonction dans l'ascocarpe peut aussi devenir néfaste pour le champignon si elle provoque une dégradation trop importante. En effet, l'activité chitinytique est aussi un moyen de lutte contre la colonisation par des pathogènes fongiques (Suryanto *et al*, 2012). Néanmoins, si le criblage réalisé en microplaque (test N-acétyl glucosaminidase) révèle la présence d'un potentiel exochitinytique chez les souches bactériennes, le criblage de ces mêmes souches sur milieu gélosé avec chitine a révélé très peu de souches chitinytiques. Ce résultat suggère une capacité à utiliser une partie des constituants de la chitine. La capacité à hydrolyser la chitine reste assez rare. Le même type de résultats a été obtenu dans l'étude de Uroz *et al*, 2013. Des expériences *in vivo* restent indispensables pour prouver cette activité dans la truffe. D'autre part, on a remarqué que les souches présentant un fort potentiel enzymatique avaient en général plusieurs activités. Les souches chitinytiques de l'ascocarpe pouvant être sélectionnées par présence de chitine pourraient donc également avoir des activités cellulolytiques co-sélectionnées.

Les résultats enzymatiques obtenus doivent cependant être nuancés. En effet, une forte proportion de souches appartenant au genre *Bacillus* ont été isolées à partir des compartiments, alors qu'ils n'étaient pas dominants avec les analyses de pyroséquençage. Or, ce genre est connu pour son activité chitinytique (Nandakumar *et al*, 2007). La présence de cette activité pourrait être due à un biais de l'approche cultivable.

CONCLUSION

Les travaux réalisés au cours de mon stage apportent de nouveaux éléments suggérant un impact des communautés bactériennes de la truffe sur la maturation de celle-ci. La participation des bactéries à la nutrition de ce champignon n'a pas pu être prouvée lors de ces travaux puisque les bactéries de la truffe ne semblent pas fixer activement l'azote, ni chélater le fer. Cependant, l'enrichissement en bactéries ayant des potentiels d'activités cellulolytique et chitinolytique dans l'ascocarpe constitue un indice intéressant à propos de leur impact sur la truffe. Même si les résultats d'activité cellulolytique sont difficiles à expliquer, ces résultats nous amènent à penser que les bactéries présentes dans la truffe pourraient potentiellement aider à la libération des spores à travers la dégradation de la chitine de la paroi fongique. Cependant il reste à prouver que ces activités sont également exprimées *in vivo*.

Références

- Adams, David J. « Fungal Cell Wall Chitinases and Glucanases ». *Microbiology (Reading, England)* 150, n° Pt 7 (juillet 2004): 2029-2035. doi:10.1099/mic.0.26980-0.
- Altschul, S F, T L Madden, A A Schaffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller, and D J Lipman. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs." *Nucleic Acids Research* 25, no. 17 (September 1, 1997): 3389–3402.
- Antony-Babu, S, A Deveau, JD Van Nostrand, J Zhou, F Le Tacon, C Robin, P Frey-Klett, et S Uroz. « Black Truffle-Associated Bacterial Communities during the Development and Maturation of Tuber Melanosporum Ascocarps and Putative Functional Roles ». *Environmental Microbiology*, 3 octobre 2013. doi:10.1111/1462-2920.12294.
- Barbieri, E, P Ceccaroli, R Saltarelli, C Guidi, L Potenza, M Basaglia, F Fontana, et al. « New Evidence for Nitrogen Fixation within the Italian White Truffle Tuber Magnatum ». *Fungal Biology* 114, n° 11-12 (décembre 2010): 936-942. doi:10.1016/j.funbio.2010.09.001.
- Barbieri, E, C Guidi, J Bertaux, P Frey-Klett, J Garbaye, P Ceccaroli, R Saltarelli, A Zambonelli, et V Stocchi. « Occurrence and Diversity of Bacterial Communities in Tuber Magnatum during Truffle Maturation ». *Environmental Microbiology* 9, n° 9 (septembre 2007): 2234-2246. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01338.x.
- Bellesia, F, A Pinetti, B Tirillini, et A Bianchi. « Temperature-Dependent Evolution of Volatile Organic Compounds in Tuber Borchii from Italy ». *Flavour and Fragrance Journal* 16, n° 1 (1 janvier 2001): 1-6. doi:10.1002/1099-1026(200101/02)16:1<::AID-FFJ936>3.0.CO;2-Y.
- Bürgmann, H, F Widmer, W Von Sigler, et J Zeyer. « New Molecular Screening Tools for Analysis of Free-Living Diazotrophs in Soil ». *Applied and Environmental Microbiology* 70, n° 1 (janvier 2004): 240-247.
- Calvaruso, Christophe, Marie-Pierre Turpault, Elisabeth Leclerc, and Pascale Frey-Klett. "Impact of Ectomycorrhizosphere on the Functional Diversity of Soil Bacterial and Fungal Communities from a Forest Stand in Relation to Nutrient Mobilization Processes." *Microbial Ecology* 54, no. 3 (October 2007): 567–77. doi:10.1007/s00248-007-9260-z.
- Cavazzini, D, F Meschi, R Corsini, A Bolchi, G L Rossi, O Einsle, et S Ottonello. « Autoproteolytic Activation of a Symbiosis-Regulated Truffle Phospholipase A2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 288, n° 3 (18 janvier 2013): 1533-1547. doi:10.1074/jbc.M112.384156.
- Ceccaroli, P, M Buffalini, R Saltarelli, E Barbieri, E Polidori, S Ottonello, A Kohler, E Tisserant, F Martin, et V Stocchi. « Genomic Profiling of Carbohydrate Metabolism in the Ectomycorrhizal Fungus Tuber Melanosporum ». *The New Phytologist* 189, n° 3 (février 2011): 751-764. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03520.x.
- Chevalier, G, et H Frochot. « Truffle cultivation techniques », 1997. <http://hdl.handle.net/2042/5669>.
- Coquelin, A., F. Torre, et R. Del-Negro. « Modélisation de la formation de l'ascocarpe de la truffe noire Tuber melanosporum en fonction du couple humidité-température du sol ». *Ecologia mediterranea* 33 (2007): 15-28.
- Courty, P-E, K Pritsch, M Schlöter, A Hartmann, et J Garbaye. « Activity Profiling of Ectomycorrhiza Communities in Two Forest Soils Using Multiple Enzymatic Tests ». *The New Phytologist* 167, n° 1 (juillet 2005): 309-319. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01401.x.
- De Boer, Wietse, Johan H J Leveau, George A Kowalchuk, Paulien J A Klein Gunnewiek, Edwin C A Abeln, Marian J Figge, Klaas Sjollem, Jaap D Janse, and Johannes A van Veen. "Collimonas Fungivorans Gen. Nov., Sp. Nov., a Chitinolytic Soil Bacterium with the Ability to Grow on Living Fungal Hyphae." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, no. Pt 3 (May 2004): 857–64.
- Fierer, Noah, and Robert B. Jackson. "The Diversity and Biogeography of Soil Bacterial Communities."

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, no. 3 (January 17, 2006): 626–31. doi:10.1073/pnas.0507535103.
- Frey-Klett, P, M Chavatte, M-L Clausse, S Courrier, C Le Roux, J Raaijmakers, M Martinotti, J-C Pierrat, et J Garbaye. « Ectomycorrhizal Symbiosis Affects Functional Diversity of Rhizosphere Fluorescent Pseudomonads ». *The New Phytologist* 165, n° 1 (janvier 2005): 317-328. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01212.x.
- Frey-Klett, P, J Garbaye, et M Tarkka. « The Mycorrhiza Helper Bacteria Revisited ». *The New Phytologist* 176, n° 1 (2007): 22-36. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02191.x.
- Gaby, J-C, et D Buckley. « A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the nifH Gene of Nitrogenase ». *PloS One* 7, n° 7 (2012): e42149. doi:10.1371/journal.pone.0042149.
- Frey-Klett, P., P. Burlinson, A. Deveau, M. Barret, M. Tarkka, and A. Sarniguet. “Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75, no. 4 (December 1, 2011): 583–609. doi:10.1128/MMBR.00020-11.
- Ghio, S, G-S-D Lorenzo, V Lia, P Talia, A Cataldi, D Grasso, et E Campos. « Isolation of Paenibacillus Sp. and Variovorax Sp. Strains from Decaying Woods and Characterization of Their Potential for Cellulose Deconstruction ». *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 3, n° 4 (2012): 352-364.
- Goldberg, I, V Nadler, et A Hochman. « Mechanism of Nitrogenase Switch-off by Oxygen ». *Journal of Bacteriology* 169, n° 2 (février 1987): 874-879.
- Gryndler, M, L Soukupová, H Hršelová, H Gryndlerová, J Borovička, E Streiblová, et J Jansa. « A Quest for Indigenous Truffle Helper Prokaryotes ». *Environmental Microbiology Reports* 5, n° 3 (juin 2013): 346-352. doi:10.1111/1758-2229.12014.
- Hacquard, S, E Tisserant, A Brun, V Legué, F Martin, et A Kohler. « Laser Microdissection and Microarray Analysis of Tuber Melanosporum Ectomycorrhizas Reveal Functional Heterogeneity between Mantle and Hartig Net Compartments ». *Environmental Microbiology* 15, n° 6 (juin 2013): 1853-1869. doi:10.1111/1462-2920.12080.
- Hall, I R, G T Brown, et A Zambonelli. *Taming the Truffle: The History, Lore, and Science of the Ultimate Mushroom.* (2007). http://www.timberpress.com/books/taming_truffle/hall/9780881928600.
- Harki, E., D. Bouya, et R. Dargent. « Maturation-associated alterations of the biochemical characteristics of the black truffle Tuber melanosporum Vitt. » *Food Chemistry* 99, n° 2 (2006): 394-400. doi:10.1016/j.foodchem.2005.08.030.
- “JGI Fungi Portal - Home.” Accessed April 30, 2014. <http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>.
- Kielak, AM, MS Cretoiu, AV Semenov, SJ Sørensen, et JD van Elsas. « Bacterial Chitinolytic Communities Respond to Chitin and pH Alteration in Soil ». *Applied and Environmental Microbiology* 79, n° 1 (janvier 2013): 263-272. doi:10.1128/AEM.02546-12.
- Koranda, M, C Kaiser, L Fuchslueger, B Kitzler, A Sessitsch, S Zechmeister-Boltenstern, et A Richter. « Seasonal Variation in Functional Properties of Microbial Communities in Beech Forest Soil ». *Soil Biology & Biochemistry* 60, n° 100 (mai 2013): 95-104. doi:10.1016/j.soilbio.2013.01.025.
- Kuramae, Eiko E., Etienne Yergeau, Lina C. Wong, Agata S. Pijl, Johannes A. van Veen, and George A. Kowalchuk. “Soil Characteristics More Strongly Influence Soil Bacterial Communities than Land-Use Type.” *FEMS Microbiology Ecology* 79, no. 1 (January 1, 2012): 12–24. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01192.x.
- Lauber, Christian L., Micah Hamady, Rob Knight, and Noah Fierer. “Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale.” *Applied and Environmental Microbiology* 75, no. 15 (August 1, 2009): 5111–20. doi:10.1128/AEM.00335-09.
- “Le Monde Des Truffes.” Accessed May 30, 2014. <http://www.truffe-passion.fr/>.

- “Le Site Du Syndicat Des Trufficulteurs de La Région de Lalbenque.” Accessed May 30, 2014. <http://truffesnoires-lalbenque.com/>.
- Le Tacon, François, Benoît Marçais, Michel Courvoisier, Claude Murat, Pierre Montpied, and Michel Becker. “Climatic Variations Explain Annual Fluctuations in French Périgord Black Truffle Wholesale Markets but Do Not Explain the Decrease in Black Truffle Production over the Last 48 Years.” *Mycorrhiza* 24 Suppl 1 (April 2014): S115–125. doi:10.1007/s00572-014-0568-5.
- Li, C. Y., et MA. Castellano. « Azospirillum isolated from within sporocarps of the mycorrhizal fungi Hebeloma crustuliniforme, Laccaria laccata and Rhizopogon vinicolor ». *Transactions of the British Mycological Society* 88, n° 4 (juin 1987): 563-565. doi:10.1016/S0007-1536(87)80043-8.
- Ma, Anzhou, X Zhuang, J Wu, M Cui, D Lv, C Liu, et G Zhuang. « Ascomycota Members Dominate Fungal Communities during Straw Residue Decomposition in Arable Soil ». *PloS One* 8, n° 6 (2013): e66146. doi:10.1371/journal.pone.0066146.
- Mamoun, M., et J. M. Olivier. « Dynamique des populations fongiques et bactériennes de la rhizosphère des noisetiers truffiers. II. Chélation du fer et répartition taxonomique chez les Pseudomonas fluorescents ». *Agronomie* 9, n° 4 (1989): 345-351. doi:10.1051/agro:19890404.
- Martin, F, A Kohler, C Murat, R Balestrini, P Coutinho, O Jaillon, B Montanini, et al. « Périgord Black Truffle Genome Uncovers Evolutionary Origins and Mechanisms of Symbiosis ». *Nature* 464, n° 7291 (15 avril 2010): 1033-1038. doi:10.1038/nature08867.
- Mello, A, G-C Ding, Y M Piceno, C Napoli, L M Tom, TZ DeSantis, G L Andersen, K Smalla, et P Bonfante. « Truffle Brûlés Have an Impact on the Diversity of Soil Bacterial Communities ». *PloS One* 8, n° 4 (2013): e61945. doi:10.1371/journal.pone.0061945.
- Mello A, Miozzi L, Vizzini A, Napoli C, Kowalchuck G, and Bonfante P. “Bacterial and Fungal Communities Associated with Tuber Magnatum productive Niches.” *Plant Biosystems* 144 (2010): 323–32. doi:10.1080/11263500903374724.
- Mello, A, C Murat, et P Bonfante. « Truffles: Much More than a Prized and Local Fungal Delicacy ». *FEMS Microbiology Letters* 260, n° 1 (juillet 2006): 1-8. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00252.x.
- Nandakumar R, Babu S, Raguchander T and Samiyappan R. “Chitinolytic Activity of Native Pseudomonas Fluorescens Strains” 9 (2007): 61–68.
- Olivier, JM, JC Savignac, et Pierre Sourzat. *Truffe et trufficulture*. Périgueux: Fanlac, 2012.
- Pacioni, G, M Leonardi, P Di Carlo, D Ranalli, A Zinni, et G De Laurentiis. « Instrumental Monitoring of the Birth and Development of Truffles in a Tuber Melanosporum Orchard ». *Mycorrhiza* 24 Suppl 1 (avril 2014): S65-72. doi:10.1007/s00572-014-0561-z.
- Pavić, A, S Stanković, E Saljnikov, D Krüger, F Buscot, M Tarkka, et Ž Marjanović. « Actinobacteria may influence white truffle (Tuber magnatum Pico) nutrition, ascocarp degradation and interactions with other soil fungi ». *Fungal Ecology* 6, n° 6 (décembre 2013): 527-538. doi:10.1016/j.funeco.2013.05.006.
- Peter, H, S Beier, S Bertilsson, E Lindström, S Langenheder, et LJ Tranvik. « Function-Specific Response to Depletion of Microbial Diversity ». *The ISME Journal* 5, n° 2 (février 2011): 351-361. doi:10.1038/ismej.2010.119.
- Poly, F, L Ranjard, S Nazaret, F Gourbière, and L J Monrozier. “Comparison of nifH Gene Pools in Soils and Soil Microenvironments with Contrasting Properties.” *Applied and Environmental Microbiology* 67, no. 5 (May 2001): 2255–62. doi:10.1128/AEM.67.5.2255-2262.2001.
- Pospiech, A, and B Neumann. “A Versatile Quick-Prep of Genomic DNA from Gram-Positive Bacteria.” *Trends in Genetics: TIG* 11, no. 6 (June 1995): 217–18.
- RiOUSset, L, G RiOUSset, G Chevalier, et MC Bardet. *Truffes d'Europe et de Chine*. Paris: INRA, 2001.
- Rousk, Johannes, Erland Bååth, Philip C. Brookes, Christian L. Lauber, Catherine Lozupone, J. Gregory Caporaso, Rob Knight, and Noah Fierer. “Soil Bacterial and Fungal Communities across a pH Gradient in an Arable Soil.” *The ISME Journal* 4, no. 10 (October 2010): 1340–51. doi:10.1038/ismej.2010.58.

- Rousset-Rouard. *L'avenir de la truffe face au réchauffement climatique: la truffe européenne est-elle en danger. Actes des 2es rencontres internationales de la truffe, janvier 2008*. Paris: Albin Michel, 2008.
- Sbrana, C, G Bagnoli, S Bedini, C Filippi, M Giovannetti, and M P Nuti. "Adhesion to Hyphal Matrix and Antifungal Activity of Pseudomonas Strains Isolated from Tuber Borchii Ascocarps." *Canadian Journal of Microbiology* 46, no. 3 (March 2000): 259–68.
- Sbrana, C, M Agnolucci, S Bedini, A Lepera, A Toffanin, M Giovannetti, et M P Nuti. « Diversity of Culturable Bacterial Populations Associated to Tuber Borchii Ectomycorrhizas and Their Activity on T. Borchii Mycelial Growth ». *FEMS Microbiology Letters* 211, n° 2 (4 juin 2002): 195-201.
- Splivallo, Deveau A, Valdez N, Kirchhoff N, Frey-Klett P, and Karlovsky P. "Bacteria Associated with Truffle Fruiting Bodies Contribute to Truffle Aroma." *Environmental Microbiology*, June 5, 2014. doi:10.1111/1462-2920.12521.
- Suryanto, Dwi, Netti Irawati, and Erman Munir. "Isolation and Characterization of Chitinolytic Bacteria and Their Potential to Inhibit Plant Pathogenic Fungi." *Microbiology Indonesia* 5, no. 3 (December 1, 2012): 8. doi:10.5454/mi.5.3.8.
- Tarkka, Mika T., and Pascale Frey-Klett. "Mycorrhiza Helper Bacteria." In *Mycorrhiza*, edited by Professor Dr Ajit Varma, 113–32. Springer Berlin Heidelberg, 2008. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-78826-3_6.
- "Truffles L&Co." Accessed May 30, 2014. <http://www.truffeculture.com/>.
- Uroz S, Calvaruso C, Turpault MP, and Frey-Klett P. "Mineral Weathering by Bacteria: Ecology, Actors and Mechanisms." *Trends in Microbiology* 17, no. 8 (August 2009): 378–87. doi:10.1016/j.tim.2009.05.004.
- Uroz, S., C. Calvaruso, M. P. Turpault, J. C. Pierrat, C. Mustin, and P. Frey-Klett. "Effect of the Mycorrhizosphere on the Genotypic and Metabolic Diversity of the Bacterial Communities Involved in Mineral Weathering in a Forest Soil." *Applied and Environmental Microbiology* 73, no. 9 (May 1, 2007): 3019–27. doi:10.1128/AEM.00121-07.
- Uroz, S, P E Courty, J C Pierrat, M Peter, M Buée, M P Turpault, J Garbaye, and P Frey-Klett. "Functional Profiling and Distribution of the Forest Soil Bacterial Communities along the Soil Mycorrhizosphere Continuum." *Microbial Ecology* 66, no. 2 (August 2013): 404–15. doi:10.1007/s00248-013-0199-y.
- Vaz-Moreira I, Egas C, Nunes OC, Manaia CM. "Culture-Dependent and Culture-Independent Diversity Surveys Target Different Bacteria: A Case Study in a Freshwater Sample," 2009.
- Warmink, Jan Aaldrik, and Jan Dirk van Elsas. "Selection of Bacterial Populations in the Mycosphere of Laccaria Proxima: Is Type III Secretion Involved?" *The ISME Journal* 2, no. 8 (August 2008): 887–900. doi:10.1038/ismej.2008.41.
- Widmer, F, B T Shaffer, L A Porteous, et R J Seidler. « Analysis of nifH Gene Pool Complexity in Soil and Litter at a Douglas Fir Forest Site in the Oregon Cascade Mountain Range ». *Applied and Environmental Microbiology* 65, n° 2 (février 1999): 374-380.

	CMC		TCP		CYM		KB		CAS		Effectifs	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
D3AIN	21	91	4	17	19	83	16	70	7	30	23	13
D3AOUT	16	76	3	14	10	48	18	86	4	19	21	12
D2MYCO	19	83	3	13	12	52	22	96	1	4	23	13
D3soil	21	88	3	13	7	29	23	96	2	8	24	13
D5D6AIN	19	83	6	26	10	43	19	83	11	48	23	13
D5D6AOUT	16	76	2	10	7	33	21	100	6	29	21	12
D6MYCO	15	75	4	20	8	40	20	100	4	20	20	11
D5D6soil	22	88	3	12	12	48	25	100	3	12	25	14
SOMMES et moyennes pourcentages	149	82	28	16	85	47	164	91	38	21	180	100

Annexe 1 : Effectifs des souches ayant une croissance sur boîtes de Petri pour les différents tests fonctionnels

	CMC		TCP		CYM		KB		CAS		Effectifs	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
D3AIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	13
D3AOUT	2	13	1	33	1	10	1	6	0	0	21	12
D2MYCO	6	32	0	0	1	8	0	0	0	0	23	13
D3soil	3	14	1	33	1	14	1	4	1	50	24	13
D5D6AIN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	13
D5D6AOUT	1	6	0	0	0	0	1	5	0	0	21	12
D6MYCO	5	33	1	25	0	0	1	5	0	0	20	11
D5D6soil	6	27	1	33	2	17	1	4	0	0	25	14
SOMMES et moyennes pourcentages	19	16	4	16	5	6	5	3	1	6	180	100

Annexe 2 : Effectifs des souches présentant des halos sur boîtes de Petri pour les différents milieux fonctionnels

	Xylopyranosidase		Phosphatase		Glucuronidase		Glucopyranosidase		N-Actétyl-glucosaminidase		Cellobiosidase	
	M	dS	M	dS	M	dS	M	dS	M	dS	M	dS
D3AIN	48	23	1921	793	3	1	243	112	139	53	31	20
D3AOUT	29	18	1634	652	58	56	489	360	105	47	22	14
D3MYCO	41	18	3114	1172	1	1	93	50	23	8	38	29
D3AS	15	9	2559	1552	400	399	153	116	194	110	12	6
D6AIN	214	99	1137	330	3	1	727	310	987	354	105	72
D6AOUT	30	22	1846	673	7	4	93	52	944	905	23	9
D6MYCO	17	11	3726	2524	285	230	58	28	84	49	50	16
D6AS	106	57	3140	1079	2	1	174	65	245	94	56	9
AIN	127	50	1545	441	3	1	475	162	545	181	67	36
AOUT	30	14	1743	464	32	27	286	178	534	463	23	8
MYCO	29	11	3420	1373	143	116	76	28	54	25	44	17
AS	67	30	2815	898	185	183	190	68	253	77	36	6
D3	36	9	2245	528	115	99	263	100	137	38	26	9
D6	95	31	2421	637	63	49	270	86	579	250	59	19

Annexe 3 : Moyennes et déviations standard obtenues par compartiment et par enzyme

Activité		Khi2	Kruskal-Wallis
Xylosidase	Origine+stade	0,008	0,137
	Origine	0.002	0,433
	Stade	0.192	0,663
Phosphatase	Origine+stade	< 0,0001	0,276
	Origine	< 0.0001	0,268
	Stade	0.062	0,133
Glucuronidase	Origine+stade		0,086
	Origine		0,263
	Stade		0,094
Glucopyranosidase	Origine+stade	0,100	0,048
	Origine	0.040	0,153
	Stade	0.152	0,014
N-Acétyl-Glucosaminidase	Origine+stade	< 0.0001	0,004
	Origine	0.005	0,002
	Stade	0.341	0,977
Cellobiohydrolase	Origine+stade	0,371	0,002
	Origine	0.800	0,110
	Stade	0.204	0,002

Annexe 4 : P-Values obtenues avec les tests de Khi2

Résumé

La truffe noire du Périgord *Tuber melanosporum* est un champignon ascomycète ectomycorhizien hypogé passant au cours de son développement d'une forme ouverte en contact avec le sol à une forme fermée, conduisant à une potentielle spécialisation des communautés ascocarpiques. Cela en fait un bon modèle pour étudier les communautés bactériennes associées à l'ascocarpe ou aux mycorhizes. La caractérisation fonctionnelle d'une collection de souches bactériennes isolées à partir de l'ascocarpe, de mycorhizes et du sol environnant à deux stades de développement illustre bien qu'une structuration taxonomique et fonctionnelle opère. Les compartiments de la truffe apparaissent enrichis en souches bactériennes avec de forts potentiels enzymatiques comparativement au sol environnant. Tous les tests fonctionnels utilisés n'ont pas permis de conclure quant au rôle des communautés bactériennes. Néanmoins, les résultats obtenus suggèrent un rôle potentiel dans la maturation de la truffe.

The black truffle *Tuber melanosporum* is a hypogeous ectomycorrhizal ascomycete fungus which evolved during its development from an open form, in contact with the ground, to a closed one, allowing to a potential specialization of the ascocarp. This is why it is a good model for studying bacterial communities associated with ascocarpe or mycorrhizae. Functional characterization of bacterial strains isolated from the ascocarp, mycorrhizae and the surrounding bulk soil at two stages of development illustrates a taxonomic and functional structuration. The truffle compartments appeared enriched in bacterial strains with high enzymatic potential compared to those of the surrounding soil. Although the functional tests used here did not allow to conclude about the role of bacterial communities. Nevertheless, the results suggest a potential role in the maturation of the truffle.