

# Écologie Microbienne de la Grotte de Lascaux

Claude Alabouvette et  
Cesáreo Sáiz Jiménez  
(coordinateurs)





# ÉCOLOGIE MICROBIENNE DE LA GROTTÉ DE LASCAUX

Coordonné par

Claude Alabouvette and Cesáreo Sáiz-Jiménez



Projet financé par le Ministère de la Culture et de la  
Communication via la Direction Régionale de l'Action Culturelle  
d'Aquitaine



Edité par  
Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla  
(IRNAS-CSIC)  
Espagne

Juin, 2011

Tous droits réservés. La totalité ou une partie de ce livre ne peut être reproduite ou transcrite par tout moyen, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, l'enregistrement, magnétique ou tout stockage de l'information et de système de récupération sans permission écrite de IRNAS-CSIC.

Écologie Microbienne de la Grotte de Lascaux

© des textes, les Coordinateurs: Claude Alabouvette et Cesareo Saiz-Jimenez

© de l'édition, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología  
de Sevilla, IRNAS-CSIC, Espagne

Edité par: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología  
de Sevilla, IRNAS-CSIC, Espagne, Juin 2011

Couverture et mise en page: Miguel Angel Rogerio  
Photo de couverture: Grande Vache Noire, N. Aujoulat ©Ministère de la Culture  
et de la Communication, France

I.S.B.N.: 978-84-694-7852-3

Impreso en España – Imprimé en Espagne – Printed in Spain

## RAPPORT FINAL DU PROJET

### “ÉCOLOGIE MICROBIENNE DE LA GROTTTE DE LASCAUX”

**Juin 2011**

Ce rapport présente les principaux résultats acquis, au cours des deux dernières années, dans le cadre du projet de recherches « Ecologie Microbienne de la Grotte de Lascaux ». Ces recherches ont été conduites par l'équipe du « Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas » de Séville, dirigée par le Prof. Dr. Cesáreo Sáiz-Jiménez, en collaboration avec l'équipe de recherche INRA dirigée par le Dr. Claude Alabouvette. Le travail a été financé par le Ministère de la Culture et de la Communication via la Direction Régionale de l'Action Culturelle d'Aquitaine.

La liste des chercheurs ayant collaboré à ce projet est présentée ci-dessous :

Pedro M. Martín-Sánchez (IRNAS-CSIC, Spain)  
Fabiola Bastian (INRA-Dijon, France)  
Alena Nováková (ISB, České Budejovice, Czech Republic)  
Estefanía Porca Belío (IRNAS-CSIC, Spain)  
Valme Jurado Lobo (IRNAS-CSIC, Spain)  
Santiago Sánchez-Cortés (IEM-CSIC, Spain)  
Eduardo López-Tobar (IEM-CSIC, Spain)  
Angela García-Sánchez (IRNAS-CSIC, Spain)  
Concepción Ariza (Facultad de Farmacia, Sevilla, Spain)  
Mariona Hernández-Mariné (Facultad de Farmacia, Barcelona, Spain)  
Claude Alabouvette (INRA-Dijon, France)  
Cesáreo Sáiz-Jiménez (IRNAS-CSIC, Spain)



# Plan du rapport

Chapitre	Page
1. INTRODUCTION	1
2. IDENTIFICATION DES ESPECES MICROBIENNES ET CARACTERISATION DES COMMUNAUTES METABOLIQUEMENT ACTIVES	5
2.1 Identification des souches d' <i>Ochroconis</i> isolées de la grotte de Lascaux	5
2.1.1 <i>Caractérisation morphologique</i>	8
2.1.2 <i>Caractérisation moléculaire</i>	10
2.1.3 <i>Caractérisation biochimique et physiologique</i>	17
2.1.3.1 <i>Température optimale de croissance</i>	17
2.1.3.2 <i>Résistance au chlorure de benzalconium</i>	17
2.1.3.3 <i>Profils d'acides gras</i>	18
2.2 Distribution d' <i>Ochroconis</i> spp. dans la grotte de Lascaux	21
2.2.1 <i>Mise au point d'une méthode de détection et quantification d'Ochroconis sp. 1 par PCR en temps réel</i>	21
2.2.2 <i>Application de la technique développée : distribution d'Ochroconis sp. 1 dans la grotte de Lascaux</i>	25
2.3 Étude des besoins nutritionnels d' <i>Ochroconis</i> spp.	32
2.4 Capacité d' <i>Ochroconis</i> sp. à métaboliser des produits de dégradation du chlorure de benzalconium	35
2.5 Rôle des biocides dans la mélanisation des microorganismes	41
2.6 Etude de communautés fongiques associées aux taches noires de la grotte de Lascaux	43
2.6.1 <i>Caractérisation moléculaire</i>	43
2.6.1.1 <i>Electrophorèse en gel de gradient dénaturant (DGGE)</i>	43
2.6.1.2 <i>Identification des communautés fongiques par la technique (DGGE)</i>	44
2.6.1.3 <i>Identification des champignons métaboliquement actifs par la technique DGGE</i>	48
2.6.1.4 <i>Construction de génothèques</i>	49
2.6.2 <i>Isolement des champignons</i>	52
2.7 Etude des protozoaires de la grotte de Lascaux	60
3. ÉTUDE DE LA NATURE BIOCHIMIQUE DES TACHES NOIRES (MÉLANINE)	65
3.1 Extraction de mélanine d' <i>Ochroconis</i> spp.	65
3.2 Spectroscopie Raman de surface améliorée (Surface enhanced Raman spectroscopy SERS)	66
3.3 Test d'inhibition de synthèse de mélanine	68
3.4 Analyse des acides gras	70
4. RÔLE DES COLLEMBOLS DANS LA DISPERSION DES TACHES NOIRES DANS LA GROTTTE DE LASCAUX	71
5. ÉTUDE MICROSCOPIQUE DES TACHES NOIRES DE LA GROTTTE DE LASCAUX	77
6. DETERMINATION DU NIVEAU DE CONTAMINATION AERIENNE DANS LA GROTTTE DE LASCAUX	91
6.1 Dénombrement des bactéries et des champignons présents dans l'air de la grotte	92
6.2. Identification des bactéries et des champignons présents dans l'air de la grotte	94
6.2.1. <i>Identification des bactéries</i>	94
6.2.2. <i>Identification des champignons</i>	95
6.2.3 <i>Evolution des populations fongiques au cours du temps</i>	95
6.3. Caractérisation moléculaire des communautés fongiques de l'air de la grotte	102
7. RÉSUMÉ DES PRINCIPAUX RÉSULTATS ET CONCLUSIONS	105
8. PERSPECTIVES DE RECHERCHE DANS LA GROTTTE DE LASCAUX	109
9. REMERCIEMENTS	111
10. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	113



# 1. Introduction

Les microorganismes sont présents dans tous les habitats de la biosphère, y compris dans les habitats souterrains. Ces habitats souterrains sont caractérisés par l'absence de lumière, une quantité limitée voire l'absence de nutriments organiques, une température relativement constante et une grande surface de minéraux.

La bibliographie traitant des communautés microbiennes des grottes n'est pas très abondante et limitée à un petit nombre de grottes. Plus rares encore sont les travaux qui présentent une étude complète de l'ensemble des microorganismes d'une grotte, incluant l'identification des espèces les plus fréquentes et les plus abondantes, et l'étude du rôle de ces communautés dans les processus biogéochimiques. La plus part des articles sont consacrés à des aspects spécifiques comme l'existence de champignons (Rutherford et Huang, 1994), de bactéries (Schabereiter-Gurtner et al. 2002) ou de cyanobactéries et d'algues dans des grottes présentant des ouvertures exposées au soleil (Abdelahad et Bazzichelli, 1988 ; Aboal et al. 1994 ; Hernandez Marine et Canals, 1994).

De nombreux résultats publiés sont contradictoires. Quelques publications indiquent que les microorganismes chimio-autotrophes sont, dans les grottes, les producteurs primaires (Peck, 1986), d'autres publications indiquent au contraire que ces microorganismes chimio- autotrophes ont un rôle insignifiant dans l'écosystème de la grotte (Caumartin, 1963), ou encore que cinq types différents de bactéries chimio-autotrophes supportent de grandes populations de bactéries hétérotrophes et de champignons (Cunningham et al. 1995). Sarbu et al. (1996) considèrent que le carbone organique de la Grotte Mobile (Roumanie) est d'origine chimio-autotrophe (*Thiobacillus thioparus* et *Thiosphaera* sp.) à la différence du carbone organique d'autres grottes qui est constitué de matière organique d'origine végétale provenant de l'extérieur de la grotte. Langecker et al. (1996) arrivent à la même conclusion pour la Grotte des Sardinias, au Mexique, qui ne dépend pas des apports externes. Holmes et al. (2001), après avoir étudié les biofilms aquatiques de la grotte de Nullarbor, en Australie, suggèrent que les biofilms représentent des communautés chimio-autotrophes qui dépendent de l'oxydation des nitrites.

Chelius et Moore (2004) dans une étude sur la Wind Cave, aux USA, ont identifié trois types des communautés microbiennes : des communautés de surface, des communautés souterraines naturelles et des communautés souterraines liées à l'anthropisation du milieu. Ce travail n'est basé que sur l'étude des sédiments, constitués de substrats de remplissage anciens qui ont été modifiés par l'homme, mais ne prend pas en considération les murs et le plafond. Ces communautés sont similaires à celles décrites dans d'autres grottes et les scientifiques n'ont pas identifié une communauté spécifique de la Wind Cave, à l'exception d'une communauté d'*Archaea* que les auteurs considèrent spécifique des milieux souterrains. Cette communauté est similaire à une autre communauté identifiée dans la Grotte d'Altamira (Gonzalez et al. 2005). Chelius et Moore (2004) considèrent que les communautés utilisent la matière végétale décomposée, qui est transportée dans la grotte par les eaux d'infiltration. Ainsi, il a été montré que la grotte d'Altamira (Espagne) reçoit, par infiltration des eaux de surface, des apports de matières organiques et de bactéries provenant du sol agricole de surface (Saiz-Jimenez et Hermosin, 1999 ; Laiz et al. 1999).

Cet écosystème se complique encore lorsque la grotte est fortement altérée par des visites touristiques et des aménagements réalisés pour faciliter ces visites (Lefèvre, 1974). L'écosystème subit un énorme apport de matière organique qui engendre des invasions microbiennes et les communautés microbiennes autochtones de la grotte sont alors remplacées par d'autres communautés.

Cette revue bibliographique montre que les communautés microbiennes présentes dans différentes grottes sont le reflet des caractéristiques de chaque écosystème dans lequel les substrats, les niveaux de matière organique et les conditions climatiques sont différentes. En conséquence, les communautés microbiennes forment des biofilms différents selon la grotte considérée (Wimpenny et al. 2000). Il convient donc d'aborder l'étude des écosystèmes souterrains de manière globale, en prenant en considération l'ensemble des variables et non de façon fragmentaire en ne ciblant qu'un aspect particulier.

Lorsque nous avons initié ce travail, la microbiologie et l'écologie de la grotte de Lascaux étaient de « grandes inconnues » de la littérature scientifique. Les seuls travaux intéressants et facilement accessibles aux scientifiques étaient les travaux de Lefèvre (1974) qui présentent les effets de la maladie verte et ceux de Dupont et al. (2007) qui ont identifié les souches de *Fusarium solani* isolées de la grotte en 2001. Nous n'avions aucune vision globale des différents problèmes rencontrés par la grotte.

Les résultats des recherches récentes, concernant certains aspects particuliers, constituent autant de pièces d'un grand puzzle qu'il convient maintenant de reconstituer. Les résultats présentés dans ce rapport sont une première contribution à cette vision globale, mais il faut bien être conscient des limites de ce travail effectué sur une période de temps très limitée, alors que des années de recherche seront nécessaires pour proposer une analyse globale des mécanismes en jeu dans la grotte.

La connaissance des événements passés et de leurs causes doit fournir des pistes pour comprendre les interactions entre les différents paramètres de l'écosystème et permettre d'aborder la conservation de la grotte sur des bases scientifiquement établies.

Le principal objectif de ce projet était d'étudier l'écologie et les processus de succession microbienne qui se produisent dans la grotte. La grotte constitue un écosystème dynamique, les populations microbiennes évoluent avec le temps et nous avons pu constater à l'échelle de ces derniers 24 mois, que les profils microbiens sont en train de changer. Au cours des dix dernières années, nous avons assisté à l'invasion par *Fusarium solani* puis à celle des taches noires et actuellement nous observons une évolution au sein des communautés fongiques associées aux taches noires. Celles-ci ont révélé en 2007, la présence d'une nouvelle espèce de champignon, *Ochroconis lascauxensis*, apparemment originale à Lascaux, et actuellement nous constatons l'apparition de levures noires et d'autres champignons mélanisés. La cause de cette évolution complexe et de cette succession de microorganismes au sein des communautés formant les taches noires est vraisemblablement l'utilisation de biocides dont les résidus constituent une source de carbone et d'azote utilisable par beaucoup de microorganismes.



## 2. Identification des espèces microbiennes et caractérisation des communautés métaboliquement actives

Lors d'un travail précédent, nous avons réalisé des prélèvements au cours de la période avril 2006 – janvier 2007, afin d'identifier les principales espèces fongiques présentes dans la grotte de Lascaux (Bastian et al. 2009c). Une nouvelle série de prélèvements a été réalisée au cours de la période août 2007 – février 2011 afin de suivre l'évolution des populations fongiques. L'identification a été réalisée à la fois à partir des colonies mises en culture et à partir de l'ADN directement extrait des échantillons prélevés à la surface des parois.

### 2.1 Identification des souches d'*Ochroconis* isolées de la grotte de Lascaux

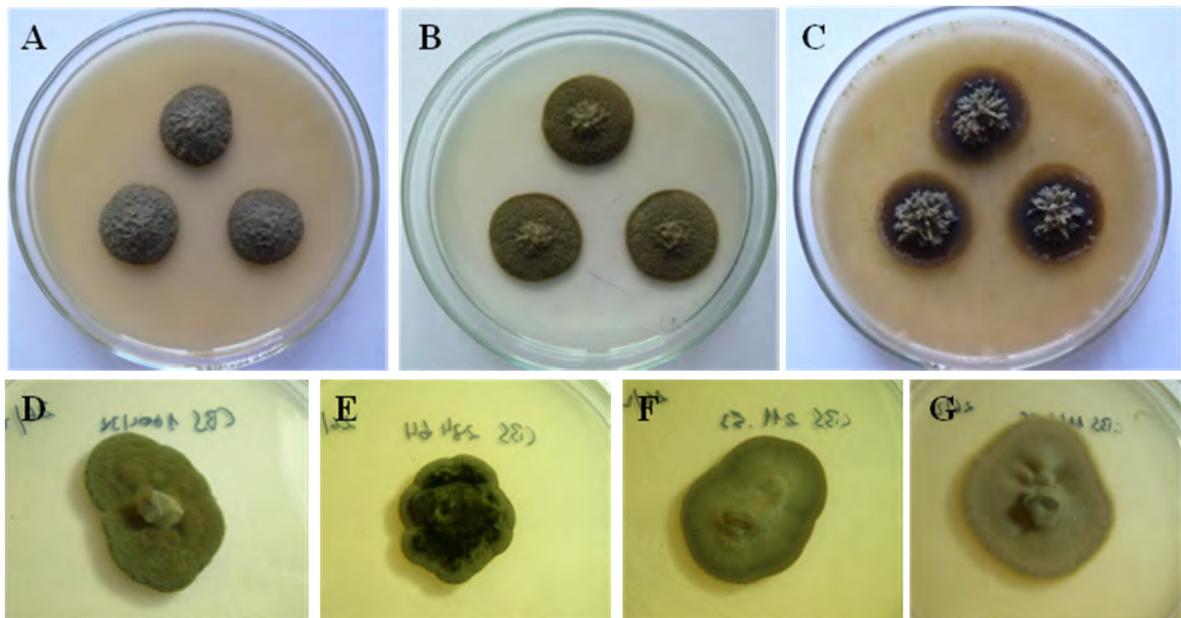
Afin de préciser l'identification des 29 souches d'*Ochroconis* provenant de la grotte de Lascaux (Tableau 1), ces souches ont été caractérisées au niveau morphologique et au niveau moléculaire. Cinq souches de référence appartenant à différentes espèces des genres *Scolecobasidium* et *Ochroconis* (Tableau 2), provenant de la collection internationale du Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) ont été incluses dans cette étude. Ce sont quatre souches de référence des espèces *O. tshawytschae*, *O. constricta*, *O. humicola* et *S. terreum* choisies en fonction des données bibliographiques disponibles et une souche de l'espèce *O. anellii* isolée d'une grotte italienne, où elle est à l'origine de taches noires sur des stalactites (Graniti, 1962). L'espèce *O. gallopava* a été exclue de cette étude car elle est potentiellement pathogène pour l'homme. Ces 5 souches de référence montrent sur le milieu de culture à l'extrait de malt (MEA) une morphologie similaire, avec cependant de petites différences de couleur, texture et vitesse de croissance (Figure 1).

**Tableau 1. Souches d'*Ochroconis* isolées de la grotte de Lascaux**

Référence souches	Lieu de prélèvement de l'échantillon	Date du prélèvement
LX CH2	Voute de l'abside, mur gauche. Colonie grise proche du cerf	23/8/2007_INRA
LX CH3	Voute de l'abside, mur gauche. Colonie grise proche du cerf	23/8/2007_INRA
LX CH7	Voute de l'abside, mur gauche. Autre colonie	23/8/2007_INRA
LX CH8	Voute de l'abside, mur gauche. Autre colonie	23/8/2007_INRA
LX CH9	Voute de l'abside, mur gauche. Colonie grise proche du cerf, se décolle facilement	23/8/2007_INRA
LX CH13	Passage à gauche, proche secteur 3. Tache panthère en croissance	23/8/2007_INRA
LX CH15	Passage à gauche, proche secteur 3. Tache nouvelle, avec des petits points noirs	23/8/2007_INRA
LX CH16	Passage à gauche, proche secteur 3. Restes de champignons anciens dans la ligne sédimentaire	23/8/2007_INRA
LX CH24	Salle des Taureaux, plan incliné, au fond à gauche du Passage. Tache humide sans coloration particulière	23/8/2007_INRA
LX CH40	Salle des Taureaux, plan incliné à droite. Petite colonie ronde et blanche	23/8/2007_INRA
LX 7.2	Passage, banquette droite. Colonie rose-violet sur argile	9/4/2008_INRA
LX CH50	Diverticule axial côté droit	9/7/2008_INRA
LX A1	Passage à gauche, zone A noir intense sans fissure, avant le nettoyage	26/8/2008_INRA
LX A3	Passage à gauche, zone A noir intense sans fissure, avant le nettoyage	26/8/2008_INRA
LX B1	Passage à gauche, zone B noir intense sans fissure, avant le nettoyage	26/8/2008_INRA
LX B2	Passage à gauche, zone B noir intense sans fissure, avant le nettoyage	26/8/2008_INRA
LX B4	Passage à gauche, zone B noir intense sans fissure, avant le nettoyage	26/8/2008_INRA
LX C1	Passage à gauche, zone C très colonisée, avant le nettoyage	26/8/2008_INRA
LX D1	Passage à droite, zone D zone non évolutive, avant le nettoyage	26/8/2008_INRA
LX CC3	Passage à gauche, zone C très colonisée. Traitement : nettoyage profond plus biocide	7/10/2008_INRA
LX DDD1	Passage à droite, zone D zone non évolutive. Traitement : nettoyage profond	5/11/2008_INRA
LX CCCC2	Passage à gauche, zone C très colonisée. Traitement : nettoyage profond plus biocide	12/2/2009_INRA
LX PDA	« <i>Ulocladium</i> sp. » Souche déterminée par le LRMH	2008_LRMH
LX 7G-2	Puits du sorcier. Echantillon d'air (SAS)	16/2/2010_INRA/CSIC
LX 21T-2	Entrée du Passage. Echantillon d'air (SAS)	16/2/2010_INRA/CSIC
LX 40LL-6	Salle des Taureaux. Echantillon d'air (SAS)	16/2/2010_INRA/CSIC
LX 101R-6	Passage à droite. Tache noire sur argile	17/2/2010_CSIC
LX 101R-7	Passage à droite. Tache noire sur argile	17/2/2010_CSIC
LX 107X-8	Abside à gauche de l'escalier. Tache vert-jaune	17/2/2010_CSIC

**Tableau 2.** Souches de référence d'*Ochroconis* / *Scolecobasidium* spp. provenant de la collection du Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)

Souches	<i>Ochroconis</i> spp. / <i>Scolecobasidium</i> spp.	Origine	Autres details
CBS 100438 <sup>T</sup>	<i>O. tshawytschae</i>	Poisson, origine inconnue	Isolé par M.S. Doty. Identifié par G.S. de Hoog. ATCC9915
CBS 284.64 <sup>T</sup>	<i>O. anellii</i>	Taches noires sur des stalactites. Grotte de Castellana, Bari, Italie	Isotype <i>S. anellii</i> A. Graniti, 1964
CBS 211.53 <sup>T</sup>	<i>O. constricta</i>	Sol. Ancastar, Ontario, Canada	Type <i>Heterosporium terrestre</i> R.G. Atkinson, 1952. ATCC11419
CBS 116655 <sup>T</sup>	<i>O. humicola</i>	Tourbe. Guelph, Ontario, Canada	Type <i>S. humicola</i> G.L. Barron, 1960
CBS 536.69	<i>S. terreum</i>	Sol de forêt. Ontario, Canada	Isolé et identifié par G.L. Barron, 1962 MUCL15054/OAC10212



**Figure 1.** A-C : Colonies de la souche LX A3 d'*Ochroconis* provenant de la grotte de Lascaux après 15 jours de culture sur milieu gélosé à : **A** l'extrait de malt (MEA), **B** l'extrait de pomme de terre glucose (PDA) et **C** jus de 8 légumes (V8A). **D-G** : Colonies des souches de référence, après 1 mois de culture sur MEA : **D** : *O. tshawytschae*, **E** : *O. anellii*, **F** : *O. constricta* et **G** : *O. humicola*.

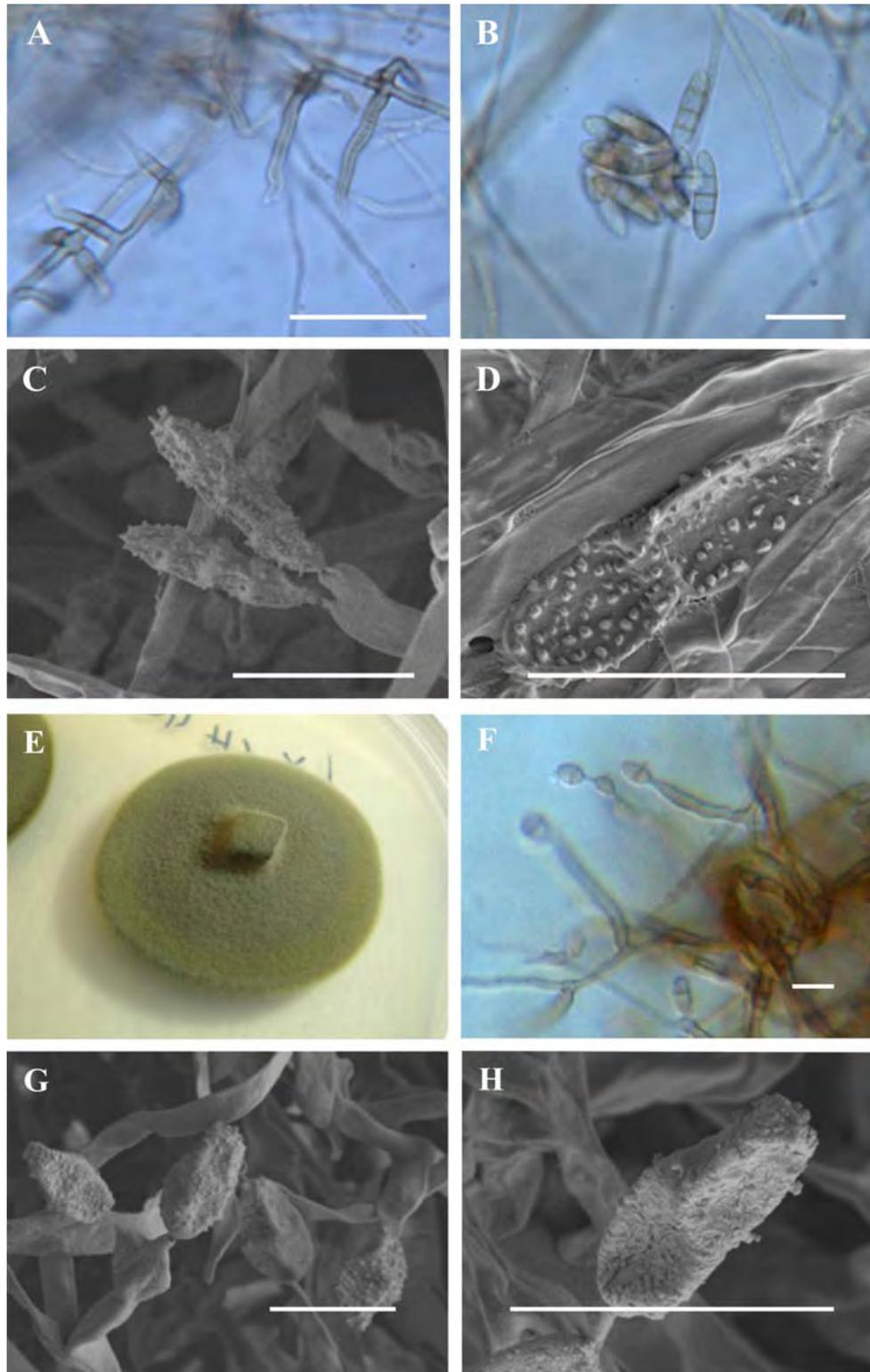
### 2.1.1 Caractérisation morphologique

Toutes les souches isolées de la grotte de Lascaux forment des colonies de caractéristiques morphologiques similaires (Figure 1). Sur le milieu gélosé à l'extrait de malt (MEA) les colonies sont rases, elles présentent une surface veloutée ou cotonneuse. Les colonies sur PDA sont de couleur vert-olive avec la partie centrale surélevée et sur le milieu V8A, elles sont de couleur gris à vert-olive avec une surface plus cotonneuse. Sur tous les milieux de culture, les colonies se développent lentement et atteignent un diamètre identique.

L'identification morphologique nécessite une observation microscopique précise du mycélium et des structures de reproduction. Les genres *Scolecobasidium* et *Ochroconis* ne présentent que des structures appartenant à la reproduction asexuée : des cellules sporogènes et des conidies. La classification de ce genre est basée principalement sur de toutes petites différences de forme et taille de ces structures. Ces observations ont été principalement réalisées par Alena Nováková, mycologue à l'Institut de Biologie du Sol (République Tchèque) spécialiste de ce groupe de champignons.

Toutes les souches isolées de la grotte de Lascaux se caractérisent par une sporulation rare, ce qui a rendu ces études particulièrement difficiles. Toutes les souches, à l'exception de la souche LX CH40, montrent des caractéristiques microscopiques similaires (Figure 2 A-D). Les hyphes, sub-hyalines, sont de couleur marron clair. Les conidiophores droits, de forme cylindrique, sont formés d'une ou de plusieurs cellules, de couleur olive clair, de taille comprise entre 12,6-14,4 x 1,8-2,25  $\mu\text{m}$ . Les conidies sont produites à la partie supérieure du conidiospore. Elles sont de forme cylindrique et présentent 2 à 3 cloisons et une base légèrement apiculée. Elles sont de couleur vert olive clair, présentent une surface verruqueuse et leurs dimensions sont comprises entre 10,2-12,6 x 2,8-4,2  $\mu\text{m}$ . Il n'a pas été observé de chlamydospores. Ces caractéristiques morphologiques permettent d'identifier ces souches comme appartenant au genre *Ochroconis* (de Hoogh et von Arx, 1973 ; de Hoogh, 1985). Morphologiquement, les espèces les plus proches décrites dans la bibliographie, sont *O. tshawytschae* (Doty et Slater) Kirilenko et Al-Achmed 1977, et *O. anellii* (Graniti) de Hoog et von Arx 1973. Par contre ces espèces présentent des conidies plus longues. Les conidies d'*O. tshawytschae* possèdent généralement 3 cloisons et les conidies de *O. anellii* sont plus larges que celles produites par les souches isolées de Lascaux.

L'isolat LX CH40 présente des caractéristiques particulières qui permettent de le différencier des autres souches isolées de la grotte de Lascaux. Les conidiophores sont droits ou courbés, généralement simples mais quelques uns sont ramifiés. Les conidies présentent de 1 à 4 cloisons, mais le plus souvent, seulement 1 ou 2 cloisons et mesurent. 7,8 x 2,4  $\mu\text{m}$ . Elles présentent une surface rugueuse reconnaissable en microscopie électronique à balayage (Figure 2 E-H).



**Figure 2.** Structures microscopiques d'*Ochroconis* spp. isolé de Lascaux. *Ochroconis* sp. 1 (la plus répandue): cellules conidiogènes (A) et conidies (B, C et D). *Ochroconis* sp. 2 (LX CH40): colonie après 1 mois de culture sur MEA (E), cellules conidiogènes (F) et conidies (F, G et H). Barre d'échelle 10  $\mu$ m.

Les caractéristiques microscopiques des isolats de la grotte de Lascaux permettent de conclure que nous sommes en présence de deux nouvelles espèces du genre *Ochroconis*. Une première espèce, la plus répandue (28 des 29 souches isolées) est bien représentée au sein des taches noires. Nous proposons provisoirement de la décrire comme une nouvelle espèce, *Ochroconis lascauxensis*, que nous désignons dans ce rapport « *Ochroconis* sp. 1 ».

La seconde espèce n'est représentée que par un seul isolat (LX CH40) obtenu en 2007 à partir d'un échantillon prélevé dans la Salle des Taureaux. Dans ce rapport nous le désignerons « *Ochroconis* sp. 2 » et nous proposons provisoirement de la décrire comme une nouvelle espèce, *Ochroconis anomala*.

Les études taxonomiques nécessaires pour proposer à la communauté scientifique la description de ces souches comme représentatives de deux nouvelles espèces d'*Ochroconis* sont en cours et permettront la rédaction de publications qui seront soumises à la critique des taxonomistes.

### **2.1.2 Caractérisation moléculaire**

Deux régions variables du génome d'*Ochroconis* sp. ont été étudiées : les régions inter-géniques de l'ADN ribosomique (ITS) et la sous-unité 2 de l'ARN polymérase B (RPB2). Les amorces ITS1/ITS4 (White, 1990) ont été utilisées pour amplifier une séquence de 600 bp, qui comprend les régions ITS1, 5.8S et ITS2. Les amorces fRPB2-5F/fRPB2-7CR (Liu, 1999) ont été utilisées pour amplifier une séquence de 1000 bp qui inclut les motifs des aminoacides 5-7 de l'ARN polymérase B.

Les produits purifiés des réactions de PCR ont été séquencés dans les deux sens par l'entreprise Secugen, Madrid, Espagne. Les séquences obtenues ont été alignées grâce au logiciel Bioedit 7.0 pour finalement obtenir une séquence consensus pour chacun des gènes étudiés. Les séquences obtenues ont ensuite été comparées aux séquences déposées dans la banque de données GenBank en utilisant le logiciel BLAST du "National Center for Biotechnology Information" (NCBI).

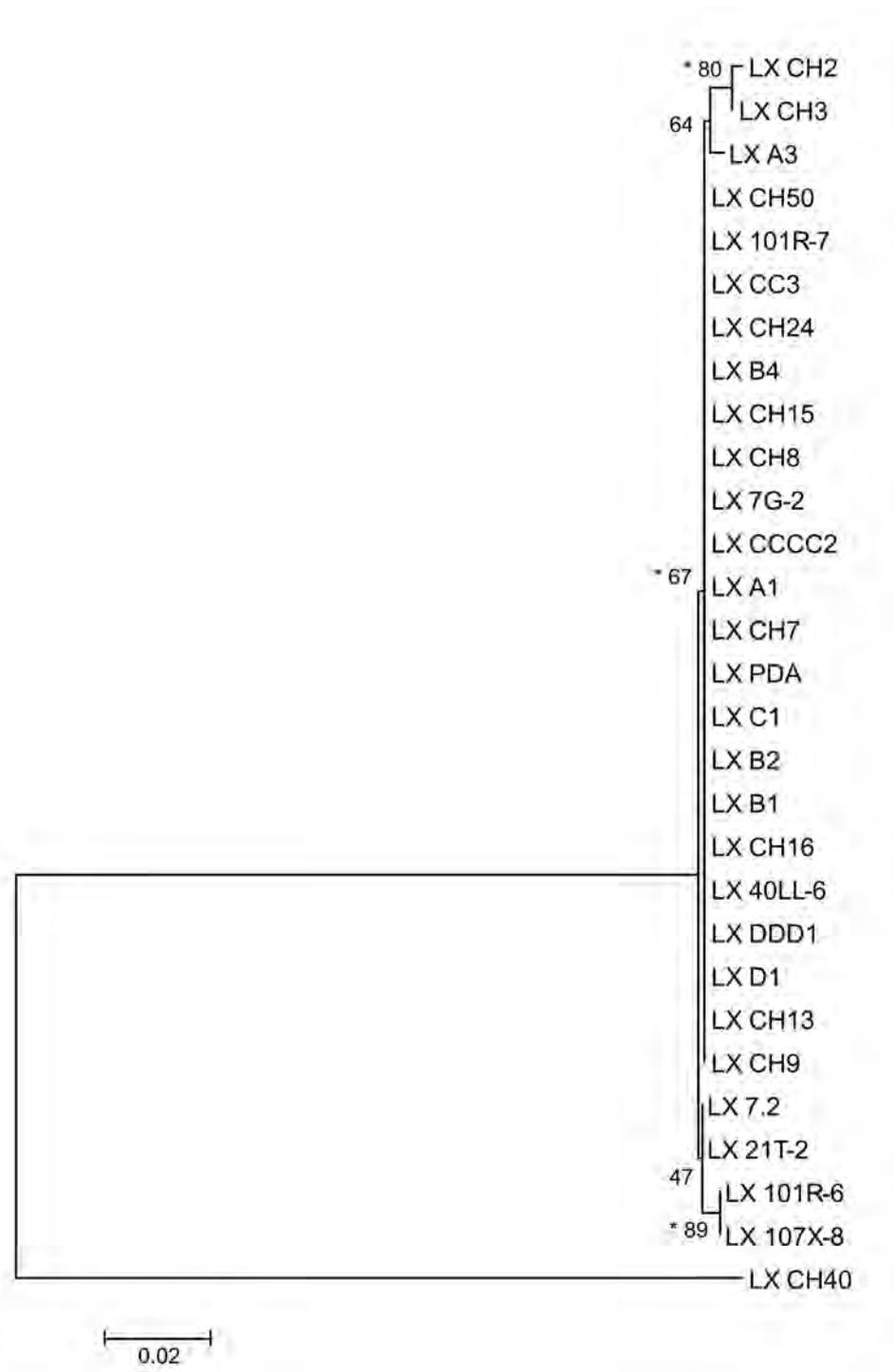
Les relations phylogénétiques entre les isolats étudiés ont ensuite été étudiées grâce aux logiciels (Bioedit 7.0 et Mega 4). Ces résultats ont permis d'améliorer l'identification des souches analysées, d'établir leurs relations phylogénétiques avec les espèces de référence et d'apprécier la variabilité qui affecte la population présente dans la grotte de Lascaux.

Les séquences ITS et RPB2 de 28 des 29 souches d'*Ochroconis* sp. 1 isolées de la grotte de Lascaux sont identiques et présentent le plus fort pourcentage d'homologie avec la séquence de l'espèce *S. tshawytschae* (83% d'homologie pour la séquence ITS, avec 88% de couverture d'alignement) et la séquence de l'espèce *S. variable* (85% d'homologie pour la séquence RPB2). Les espèces *S. tshawytschae* et *S. variable* constituent une seule et même espèce.

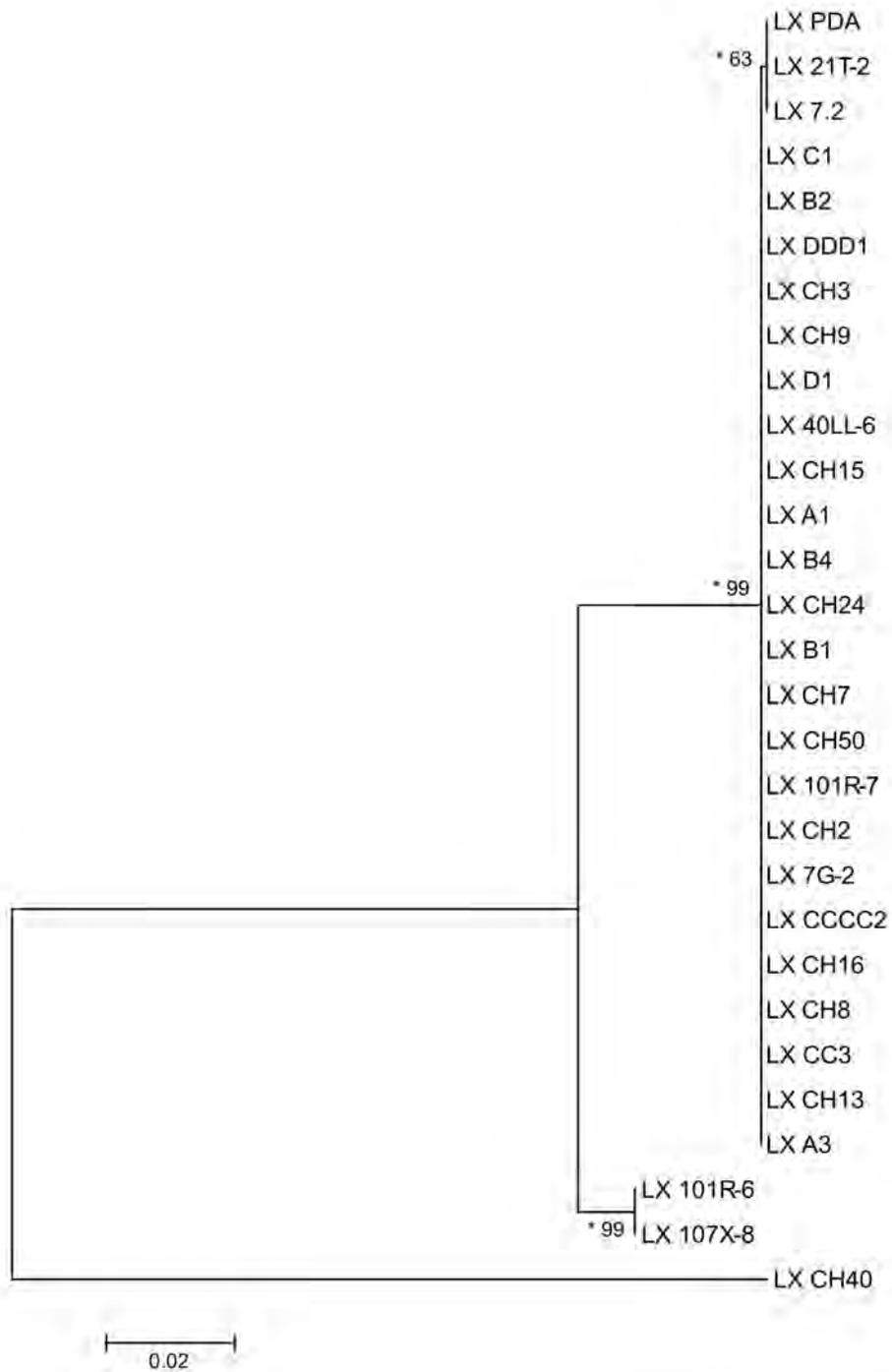
Il faut remarquer que les pourcentages d'homologie obtenus sont assez faibles (83-85%), raison pour laquelle il n'est pas possible de conclure que les souches isolées de la grotte appartiennent à l'espèce *S. tshawytschae*. Les séquences des souches de Lascaux pourraient appartenir à une autre espèce d'*Ochroconis* dont les séquences n'ont pas encore été déposées dans GenBank. En effet, cette base de données ne comprend, pour l'instant, que les séquences ITS et RPB2 de 6 espèces d'*Ochroconis*. Il est donc possible que les souches isolées de Lascaux appartiennent à une nouvelle espèce d'*Ochroconis* non encore décrite.

La souche LX CH40 est, quant à elle, totalement différente des autres. Le résultat du BLAST de la séquence RPB2 présente un fort pourcentage d'homologie (85%) avec la séquence de *S. variable* mais la séquence ITS ne s'aligne avec aucune des séquences de *Ochroconis* ou *Scolecobasidium* présentes dans GenBank, et les pourcentages de couverture sont inférieurs à 54%. Il est permis de conclure que cette souche appartient à une espèce d'*Ochroconis* différente des espèces déposées dans GenBank.

La variabilité génétique de la population d'*Ochroconis* spp. de la grotte de Lascaux (29 souches étudiées) est démontrée dans les arbres phylogénétiques construits avec les séquences correspondant aux régions ITS et RPB2 (Figures 3 et 4). Ces arbres confirment clairement que la souche LX CH40 est différente de toutes les autres souches et qu'elle appartient vraisemblablement à une espèce différente. Les autres souches peuvent être groupées dans un taxon homogène ; les séquences ITS ne présentant que 1 à 4 différences.



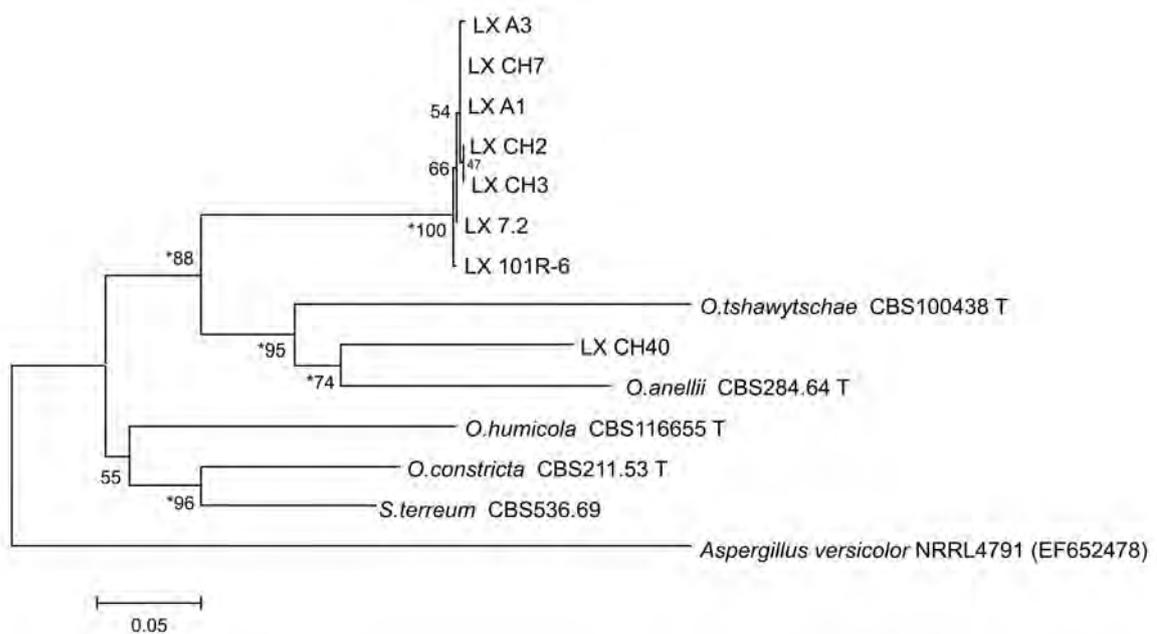
**Figure 3.** Relations phylogénétiques entre les isolats d'*Ochroconis* spp. provenant de Lascaux. Analyse basée sur l'alignement multiple de la région ITS1-5.8S-ITS2, réalisée en comparant 624 nucléotides. L'arbre a été établi par la méthode de neighbour-joining utilisant 1.000 répliques. Les astérisques indiquent les nœuds de l'arbre, obtenus en utilisant l'algorithme d'Evolution Minimale et Parcimonie Maximale UPGMA. La barre représente 0.02 changement de nucléotides par position.



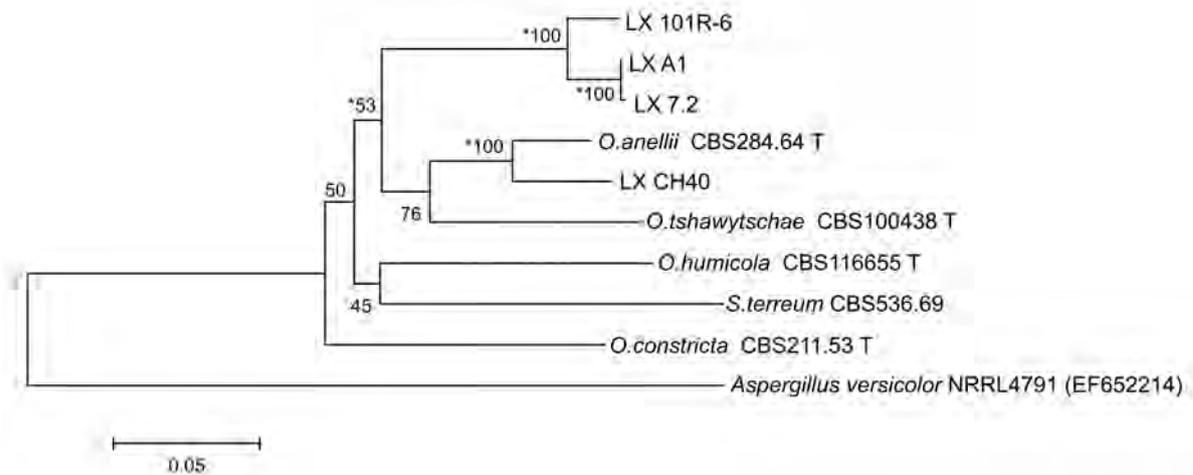
**Figure 4.** Relations phylogénétiques entre les isolats d'*Ochroconis* spp. provenant de Lascaux. Analyse basée sur l'alignement multiple de la région RPB2 réalisé en comparant 1.003 nucléotides. L'arbre a été établi par la méthode de neighbour-joining utilisant 1.000 répliques. Les astérisques indiquent les nœuds de l'arbre, obtenus en utilisant l'algorithme d'Evolution Minimale et Parcimonie Maximale UPGMA. La barre représente 0.02 changement de nucléotides par position.

Des analyses phylogénétiques ont également été réalisées pour comparer les isolats de Lascaux avec les 5 espèces de référence. Pour faciliter l'interprétation des résultats nous n'avons pris en considération, pour chaque marqueur, que les séquences présentant des différences. Les arbres phylogénétiques qui en résultent sont présentés dans les Figures 5, 6 et 7. Les Tableaux 3 à 5 présentent les matrices d'homologie des quatre séquences alignées : LX A1 (représentant 28 isolats de Lascaux), LX CH40 (l'isolat de Lascaux différent des 28 autres isolats), CBS100438, souche de référence de *O. tshawytschae* et CBS 284.64, souche de référence de *O. anellii*.

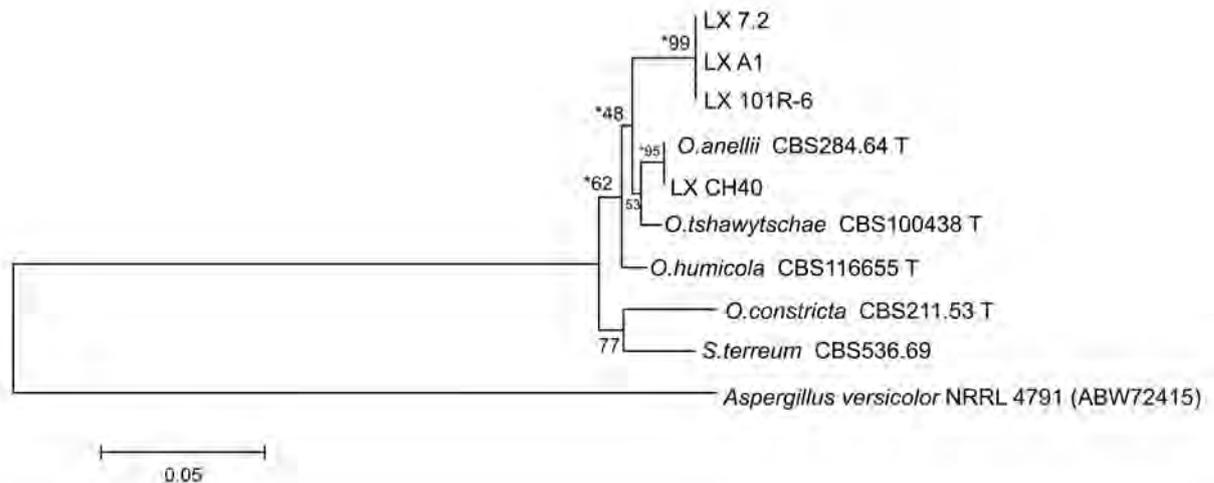
Comparées aux 5 espèces de référence étudiées, les souches isolées de Lascaux, sont proches des espèces *O. tshawytschae* et *O. anellii* avec lesquelles elles forment un clade homogène dans les trois arbres présentés.



**Figure 5.** Relations phylogénétiques entre les isolats d'*Ochroconis* spp. provenant de Lascaux et les isolats de référence (CBS). Analyse basée sur l'alignement multiple de la région ITS, réalisé en comparant 680 nucléotides. L'arbre a été établi par la méthode de neighbour-joining utilisant 1.000 répliques. Les astérisques indiquent nœuds de l'arbre, obtenus en utilisant l'algorithme d'Evolution Minimale et Parcimonie Maximale UPGMA. La barre représente 0.05 changement de nucléotides par position.



**Figure 6.** Relations phylogénétiques entre les isolats d'*Ochroconis* spp. provenant de Lascaux et les isolats de référence (CBS). Analyse basée sur l'alignement multiple de la région RPB2, réalisé en comparant 704 nucléotides. L'arbre a été établi par la méthode de neighbour-joining utilisant 1.000 répliques. Les astérisques indiquent les nœuds de l'arbre, obtenus en utilisant l'algorithme d'Evolution Minimale et Parcimonie Maximale. UPGMA. La barre représente 0.02 changement de nucléotides par position.



**Figure 7.** Relations phylogénétiques entre les isolats d'*Ochroconis* spp. provenant de Lascaux et les isolats de référence (CBS). Analyse basée sur l'alignement multiple des séquences des aminoacides de la région RPB2, réalisé en comparant 234 aminoacides. L'arbre a été établi par la méthode de neighbour-joining utilisant 1.000 répliques. Les astérisques indiquent les nœuds de l'arbre, obtenus en utilisant l'algorithme d'Evolution Minimale et Parcimonie Maximale UPGMA La barre représente 0.05 changement d'aminoacides par position.

**Tableau 3.** Matrice d'identité (%) des séquences nucléotidiques de la région ITS alignée

	LX A1* (579 pb)	LX CH40 (706 pb)	CBS 100438 ( <i>O.</i> <i>tshawytschae</i> ) (702 pb)	CBS 284.64 ( <i>O.</i> <i>anellii</i> ) (644 pb)
LX A1	-	61.5	62.6	69.6
LX CH40	-	-	67.4	64.4
CBS 100438	-	-	-	60.5
CBS 284.64	-	-	-	-

\* Chiffres basés sur la comparaison des séquences de différente longueur

**Tableau 4.** Matrice d'identité (%) des séquences nucléotidiques de la région RPB2 alignée

	LX A1*	LX CH40	CBS 100438 ( <i>O.</i> <i>tshawytschae</i> )	CBS 284.64 ( <i>O.</i> <i>anellii</i> )
LX A1	-	84.5	85.9	85.2
LX CH40	-	-	88.3	94.7
CBS 100438	-	-	-	89.4
CBS 284.64	-	-	-	-

\* Chiffres basés sur la comparaison des séquences de longueur identique (763 pb)

**Tableau 5.** Matrice d'identité (%) des séquences des aminoacides de la région RPB2

	LX A1*	LX CH40	CBS 100438 ( <i>O.</i> <i>tshawytschae</i> )	CBS 284.64 ( <i>O.</i> <i>anellii</i> )
LX A1	-	96.8	96.4	96.8
LX CH40	-	-	98	100
CBS 100438	-	-	-	98
CBS 284.64	-	-	-	-

\* chiffres basés sur la comparaison des séquences de longueur identique (254 aa)

Sur la base de l'homologie des séquences ITS, tous les isolats de la grotte, à l'exception de LX CH40, forment un clade indépendant. Les faibles pourcentages d'homologie (Tableaux 3 et 4) entre les séquences nucléotidiques de LX A1 et l'espèce type *O. tshawytschae* (62.6 % pour ITS et 85.9% pour RPB2), suggèrent que les isolats de Lascaux appartiennent à une nouvelle espèce d'*Ochroconis*.

L'isolat LX CH40 montre une plus forte homologie avec l'espèce type *O. anellii*, en particulier pour le marqueur RPB2, avec 94.7% d'homologie pour la séquence complète et 100% d'homologie pour les aminoacides (Tableaux 4 et 5). Par contre, la séquence ITS de cet isolat LX CH40 ne présentant que 64.4% d'homologie (Tableau 3) avec l'espèce type *O. anellii*. Il faut donc conclure que cette souche appartient à une nouvelle espèce.

Cette interprétation de nos résultats doit être confirmée par d'autres approches mettant en œuvre d'autres méthodes d'analyse.

### **2.1.3 Caractérisation biochimique et physiologique**

#### **2.1.3.1 Température optimale de croissance**

En plus des études morphologiques et moléculaires présentées ci-dessus, l'influence de la température sur la vitesse de croissance d'*Ochroconis* a été étudiée. Deux isolats de Lascaux (LX A1 et LX CH16) ont été transplantés et incubés pendant un mois à différentes températures : 5 °C, 13 °C (moyenne de température de la grotte de Lascaux), 22 °C, 30 °C et 35 °C.

La température optimale de croissance pour les isolats est de 22°C (Figure 8) avec un taux de croissance de 38.5±1.5 mm/mois (LX A1) et 39.7±0.2 (LX CH16). Pour les températures inférieures, les taux de croissance diminuent et ne dépassent pas quelques mm/mois à 5 °C. Aucun des isolats n'a été capable de se développer aux températures de 30 et 35 °C.

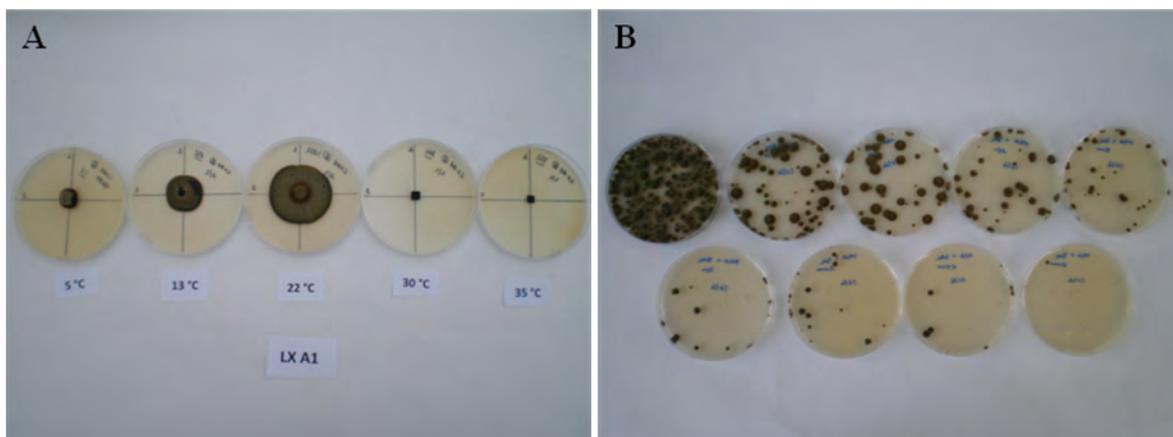
#### **2.1.3.2 Résistance au chlorure de benzalconium**

Pour évaluer la tolérance au chlorure de benzalconium (BC) de ces mêmes isolats, 100 µL d'une suspension de mycélium ont été ensemencés dans des boîtes de Petri contenant le milieu MEA enrichi de concentrations croissantes (0, 50, 100, 250, 500, 750, 1.000, 2.500, 5.000, 7.500, 10.000 et 12.500 mg/L) de BC (Sigma) composé essentiellement de C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>Cl, mais contenant aussi des homologues C<sub>14</sub> et C<sub>16</sub>. La croissance a été mesurée après 10 jours d'incubation à 22 °C.

Les résultats sont identiques pour les deux isolats étudiés : toutes les concentrations de BC inhibent la croissance (Figure 8). L'inhibition de croissance est de 50% pour les concentrations de 50 et 100 mg/L, de 75% pour les concentrations de 250 et 500 mg/L, 90% pour les concentrations de 750 et 1000 mg/L, 95% pour la concentration de 2.500 mg/L, 99% pour la concentration de 5.000 mg/L et une inhibition de croissance totale est observée pour les concentrations égales et supérieures à 7.500 mg/L.

Les derniers traitements biocides dans la grotte ont été réalisés avec une solution de Devor Mousse à 5%. Ce produit présente une concentration de BC comprise entre 5.000 et 12.500 mg/L, concentrations qui ne permettent pas la croissance d'*Ochroconis* dans les conditions de laboratoire. Cependant dans la grotte d'autres facteurs tels que la présence de bactéries capables de dégrader le BC doivent être pris en compte. Des souches de *Pseudomonas* spp. résistantes à de fortes concentrations de BC ont été décrites (Bastian et al. 2009a). De plus, du fait des phénomènes d'absorption par les minéraux, la concentration effective de BC, agissant sur les microorganismes, peut être différente de la concentration de BC appliquée à la

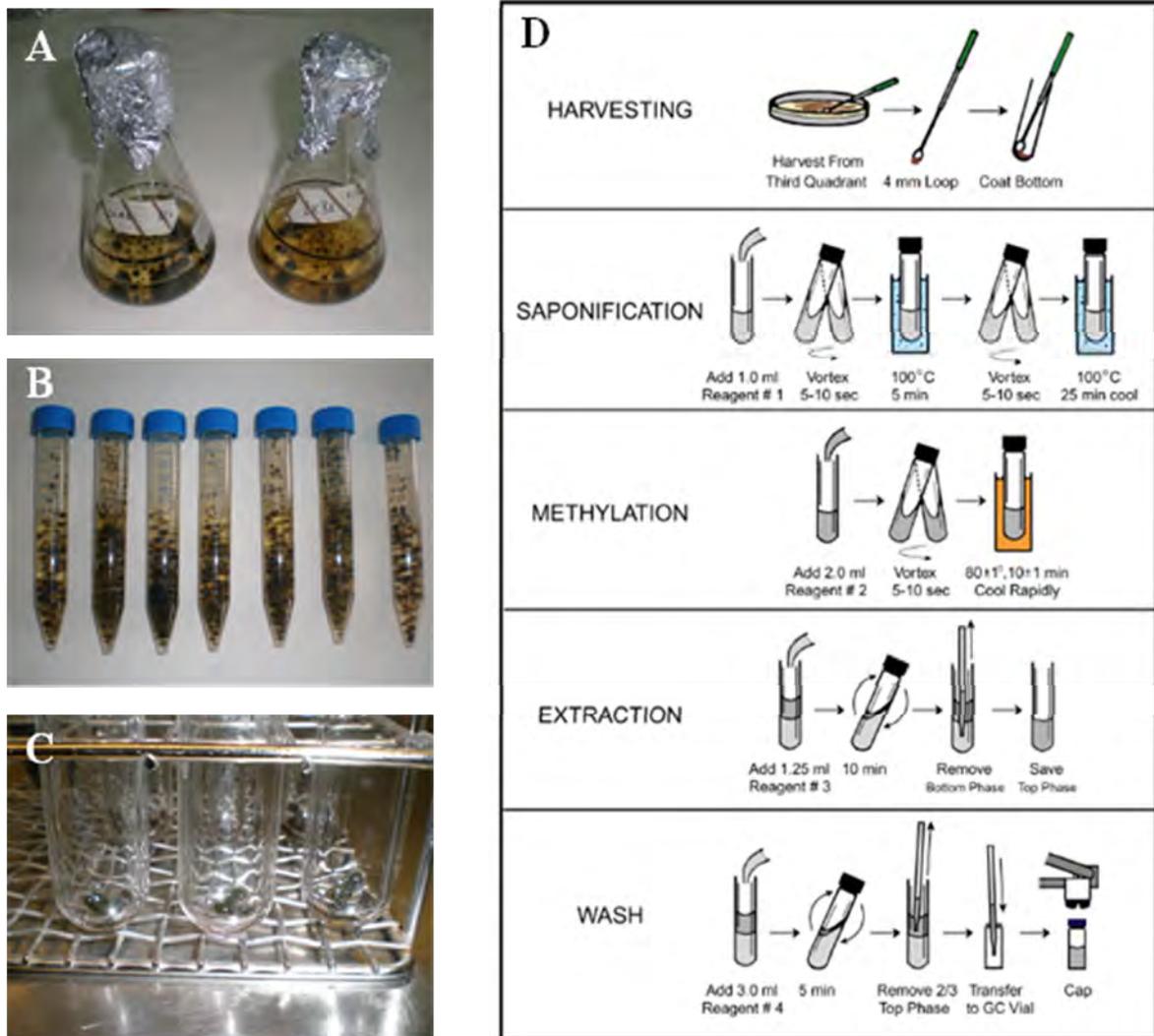
surface de la roche. Enfin, il a été démontré que les microorganismes constituant des biofilms, comme c'est le cas en surface de la roche, sont plus résistants aux biocides que les microorganismes en culture pure.



**Figure 8.** **A** Essai de croissance, à différentes températures, de l'isolat LX A1 cultivé sur MEA pendant 1 mois. **B** Essai de tolérance au chlorure de benzalconium de l'isolat LX CH16 cultivé pendant 10 jours sur milieu MEA enrichi avec des quantités croissantes de BC (0, 50, 100, 250, 500, 750, 1.000, 2.500 et 5.000 mg/L).

### 2.1.3.3 Profils d'acides gras

Le profil d'acides gras de plusieurs isolats d'*Ochroconis* de Lascaux et des cinq espèces de référence a été caractérisé. L'analyse a été réalisée avec le système d'identification MIDI (Newark, Delaware, USA) suivant les instructions du fabricant. Les champignons ont été cultivés dans un milieu à l'extrait de malt (ME) pendant 7 à 10 jours, jusqu'à obtention d'agrégats mycéliens volumineux. La biomasse fongique est centrifugée et lavée deux fois avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace de milieu de culture. Des aliquotes de plus ou moins 50 mg de mycélium (4-5 agrégats) sont placés dans des tubes de verre et soumis au protocole d'extraction des acides gras (Figure 9).



**Figure 9.** Caractérisation des acides gras des isolats d'*Ochroconis* spp. **A** culture pendant 7 à 10 jours en milieu liquide à l'extrait de malt (ME). **B** mycélium lavé avec de l'eau distillé stérile, **C** récolte de biomasse pour extraction, **D** protocole d'extraction des acides gras pour identification MIDI.

Les échantillons sont analysés avec un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard 6890. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6 et la Figure 10. Tous les isolats étudiés présentent les 4 mêmes types d'acides gras principaux. Cependant ces 4 types sont présents dans des proportions variables qui semblent être caractéristiques de l'espèce considérée.

**Tableau 6.** Profil des acides gras principaux des souches d'*Ochroconis* spp. isolées de Lascaux

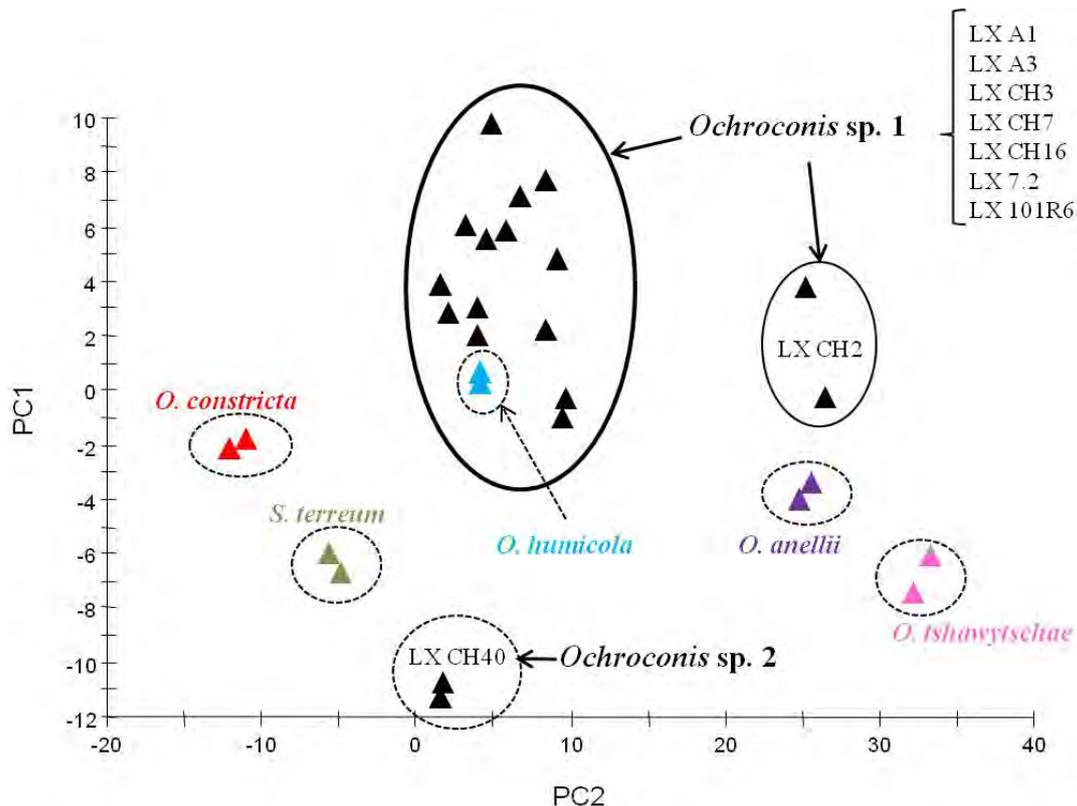
Acides Gras	Pourcentages Moyens (%)*								
	LX A1	LX A3	LX CH2	LX CH3	LX CH7	LX 7.2	LX CH16	LX 101R6	LX CH40
18:0 <i>ante</i> / 18:2 w6,9c	39.18	36.52	52.22	35.41	33.15	31.23	37.15	34.66	33.94
16:0	25.88	33.02	23.41	30.3	34.19	31.84	30.04	30.98	23.14
18:1 w9c	25.15	19.92	16.15	23.52	21.74	25.84	21.59	25.60	34.94
18:0	7.36	9.23	6.76	9.43	9.57	10.02	10.08	6.14	5.26
18:3 w6c (6,9,12)			1.44						

\* Moyenne de 3 répétitions ; ne sont indiquées que les valeurs supérieures à 1%

**Tableau 6** (suite). Profil des acides gras principaux des souches de référence d'*Ochroconis* et *Scolecobasidium*

Acides Gras	Pourcentages Moyens (%)*				
	<i>O. tshawytschae</i> CBS 100.438	<i>O. anellii</i> CBS 284.64	<i>O. constricta</i> CBS 211.54	<i>O. humicola</i> CBS 116655	<i>S. terreum</i> CBS 536.69
18:0 <i>ante</i> / 18:2 w6,9c	56.39	53.10	20.78	35.03	28.63
16:0	13.79	19.79	32.24	29.44	30.18
18:1 w9c	18.42	20.54	36.17	26.43	35.97
18:0	8.40	6.24	8.74	4.98	
18:3 w6c (6,9,12)	3.50				
16:1 w7c / 15 <i>iso</i> 2OH				1.13	2.37
18:1 w7c					1.44

\*Moyenne de 3 répétitions ; ne sont indiquées que les valeurs supérieures à 1%



**Figure 10.** Analyse en composantes principales des profils d'acides gras des isolats d'*Ochroconis* spp. Chaque isolat a fait l'objet de deux analyses.

Comme le démontre l'analyse en composantes principales (Figure 10), 7 des 9 isolats de la grotte de Lascaux présentent un profil d'acides gras similaire, différent de celui de 4 des 5 espèces de référence. Les souches LX CH2 et LX CH40 présentent un profil différent des autres souches. Dans le cas particulier de LX CH40, ce résultat conforte l'idée que cet isolat appartient à une nouvelle espèce.

## 2.2 Distribution d'*Ochroconis* sp. 1 dans la grotte de Lascaux

### 2.2.1 Mise au point d'une méthode de détection et quantification d'*Ochroconis* sp. 1 par PCR en temps réel

Ayant établi que l'espèce *Ochroconis* sp. 1 est majoritairement isolée des taches noires de la grotte, il était intéressant de disposer d'une méthode rapide permettant de détecter et de quantifier la présence de cette espèce à partir de différents échantillons de la grotte et d'étudier sa distribution dans la grotte.

La technique de PCR quantitative en temps réel permet d'atteindre ces objectifs. Elle a été développée en utilisant un thermocycleur iCycler IQ (Biorad) et le réactif SsoFast EvaGreen Supermix (Biorad) dont le composant EvaGreen, émet une fluorescence à 530 nm en présence d'une double chaîne d'ADN. Il convient de

déterminer le Ct (Cycle threshold) correspondant au nombre de cycles à partir duquel la fluorescence de l'amplifiât commence à se distinguer du bruit de fond. Les programmes «Fast PCR» sont utilisés, suivant les instructions du producteur de l'enzyme utilisée. A la fin du programme de PCR, les produits d'amplification sont soumis à une augmentation progressive de la température jusqu'à complète dénaturation de l'ADN. La mesure de fluorescence à différentes températures génère une courbe de dissociation (*melting curve*) permettant de vérifier la spécificité de l'amplifiât.

Dans un premier temps, pour les isolats de Lascaux, 6 paires d'amorces spécifiques ont été dessinées (Tableau 7) à partir d'alignements multiples réalisés à partir des séquences des deux régions étudiées précédemment (ITS et RPB2). Ces régions bien conservées dans ces isolats présentent des différences avec les séquences des espèces proches provenant de GenBank. Le programme Clone Manager a été utilisé pour évaluer le potentiel de ces régions pour le dessin des amorces. Les températures optimales d'hybridation pour les cycles de PCR sont 61 °C pour les amorces ITS, et 58 °C pour les amorces de RPB2.

**Tableau 7.** Amorces dessinées pour la détection spécifique d'*Ochroconis* sp.1 isolé de la grotte de Lascaux.

Nom	Séquence (5'-3')	Amorce	Combinaison	Amplifiât
SLX1F	TCTTCAGGTTTCGGCGGAAGC	ITS	SLX1R	158 pb
SLX1R	TCGTTGCCAGAGCCAAGAGA	ITS		
SLX2F	CTTGGCTCTGGCAACGATGA	ITS	SLX2R	254 pb
SLX2R	GTACGAGCGATGACCGAAGT	ITS		
SLX3F	CCGCCGGTCGTATTCTCAA	ITS	SLX3R	354 pb
SLX3R	CAGAGCCGTACGAGCGATGA	ITS		
376F	ATGCGTGGTATGGAGATGCT	RPB2	493R	118 pb
493R	TGTTGTGCAGTCTCGTAGGA	RPB2		
151F	CGATACACCTTCGCTTCAAC	RPB2	391R	241 pb
391R	TCTCCATACCACGCATAGTC	RPB2		
347F	CGGGTGAACCTATCATTGAG	RPB2	493R	147 pb

La spécificité des amorces a été évaluée par PCR en temps réel de l'ADN extrait des cultures pures des différents champignons. Les amorces ont été choisies selon différents critères : affinité taxonomique avec *Ochroconis*, espèces les plus abondantes dans la grotte de Lascaux et autres espèces fréquentes dans d'autres grottes. Les résultats de ces analyses sont présentés dans le Tableau 8.

**Tableau 8.** Evaluation par PCR en temps réel de la spécificité des amorces, analyse de l'ADN de champignons en culture pure.

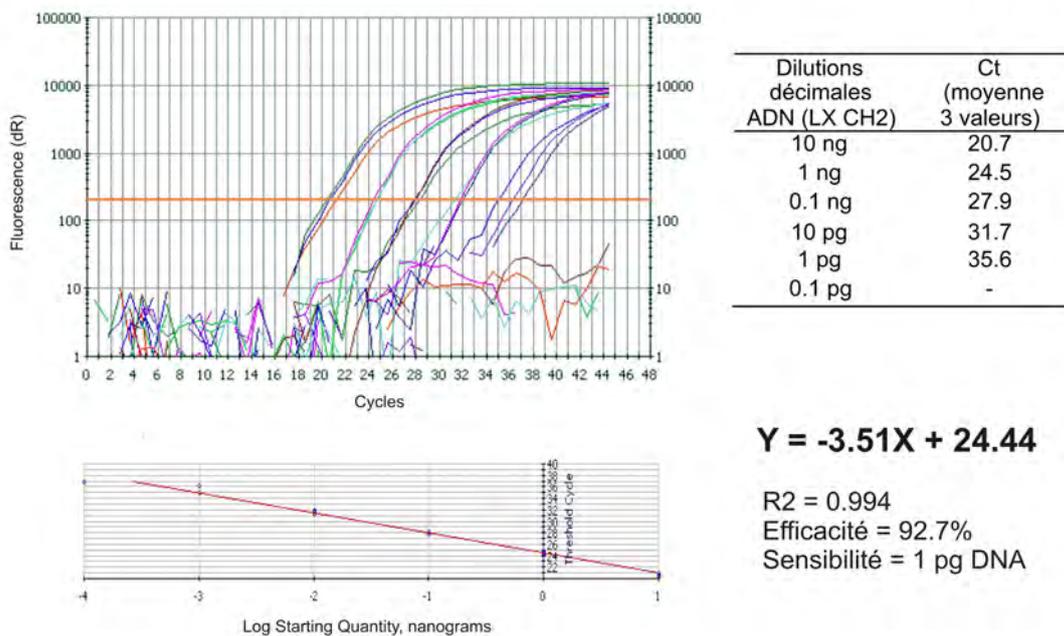
ADN fongique (10 ng)	Valeur de Ct					
	SLX1F SLX1R	SLX2F SLX2R	SLX3F SLX3R	376F 493R	151F 391R	347F 493R
LX CH2 <i>S. Lascaux</i> 10 ng	18.3	15.4	15.5	21	20	20.8
LX CH2 <i>S. Lascaux</i> 1ng	22.3	19.3	19.6	25.2	23.9	25
LX CH2 <i>S. Lascaux</i> 0.1ng	26.9	23.8	23.8	29	27.7	28.8
CBS 100438 <i>O. tshawytschae</i>	30.4*	-	38.1*	30.1*	35.4	34.9
CBS 284.64 <i>O. anellii</i>	34.3*	33.9	27.8*	27.8	-	-
CBS 211.53 <i>O. constricta</i>	36.7*	36.2*	36.1	37.5*	-	35.7
CBS 116655 <i>O. humicola</i>	33.2	30.8	31.7	-	23.4	
CMF 1005 <i>O. humicola</i>	36.3*	30.9*	36.4	25.2	-	-
CMF 1161 <i>O. constricta</i>	37.9*	31.0*	-	25.3	-	-
CMF 3049 <i>Geosmithia namyslowski</i>	34.4	31.8	33.6	36.8*	38.0*	-
CMF 3052 <i>Geosmithia putterilli</i>	33.9	33.9	33.9	33.0*	38.6*	-
CMF 1445 <i>Tolyposcladium</i> sp.	31.1	28.6	26.5*	29.0*	37.9*	-
CMF 1467 <i>Engyodontium album</i>	32.9	26.1*	31.5	33.8	33.5*	-
CMF 1597 <i>Geomyces pannorum</i>	36.2*	34.4	34.1*	38.0*	-	-
LX TR <i>Geomyces pannorum</i>	35.0	31.7	31.9	34.4*	-	-
LX PR4-2 <i>Geomyces pannorum</i>	34.3	30.8	30.0	34.9	-	-
LX ST <i>Cladosporium</i> sp.	33.8	31.5	32.8	36.0	35.2	-
CI 16P2 <i>Cladosporium</i> sp.	34.2	29.6	33.2	31.0*	-	-
CI J9 <i>Aspergillus ustus</i>	32.6	29.1	29.2	-	37.0*	-
CI 4D1 <i>Pochonia chlamydosporia</i>	35.6*	32.7	33.5	32.8	-	-
CI P3 <i>Isaria farinosa</i>	37.8	31.9	32.6	28.7*	-	-
CI 33G3 <i>Doratomyces microsporus</i>	-	37.1	35.2	36.4	37.3*	-
CI 66N1 <i>Penicillium comune</i>	-	35.8	-	35.7	38.2*	-
IBT1H1 <i>Fusarium solani</i>	33.1	35.8	38.4	34.6	-	-
CI 0303091 <i>Mucor circinelloides</i>	-	36.6	34.7	37.2	-	-

\* Valeur de Ct indiquant des amplicons aspécifiques.

Trois couples d'amorces amplifiant des régions ITS (SLX1F/R, SLX2F/R et SLX3F/R) présentent des réactions croisées fréquentes avec d'autres espèces fongiques, même si ces signaux apparaissent beaucoup plus tard (CT>26) que pour *Ochroconis* sp. 1 (Ct=

15.4-18.3). Le couple 376F/493R présente aussi beaucoup des réactions croisées (Ct>25), mais dans ce cas les réactions croisées sont dues à des amplifiats interspécifiques signalés par (\*). Les meilleurs résultats sont obtenus avec les amorces 151F/391R et 347F/493R, qui amplifient la région RPB2. Le couple 151F/391R présente des réactions croisées uniquement avec *O. tshawytschae*, *O. humicola* et *Cladosporium* sp., mais d'autres champignons produisent des amplifiats aspécifiques. Le couple d'amorces 347F/493R donne uniquement une réaction croisée avec *O. tshawytschae* et *O. constricta*, et seulement dans des cycles très tardifs (Ct= 34.9 y 35.7) alors que les mêmes quantités d'ADN (10 ng) d'*Ochroconis* des souches de Lascaux donnent un signal avec un Ct de 20.8. Ces résultats conduisent à choisir ce dernier couple d'amorces pour le développement final de la technique, le nombre de cycles étant limité à 33 pour éliminer la possibilité de réactions croisées.

Pour la quantification d'*Ochroconis* sp. 1 à partir d'échantillons de l'environnement, une droite de référence a été obtenue avec les amorces 347F/493R. La Figure 11 montre la corrélation entre les logarithmes des dilutions décimales de l'ADN, extrait d'une culture pure de l'isolat LX CH2 (*Ochroconis* sp. 1) et les valeurs de Ct obtenues. On observe un bon ajustement linéaire ( $R^2=0.994$ ), avec une efficacité de PCR élevée (92.7%), et une sensibilité d'un pg d'ADN avec une valeur moyenne de Ct=35.6. Si on réduit le nombre de cycles à 33, on observe une certaine perte de sensibilité (10 pg ADN).



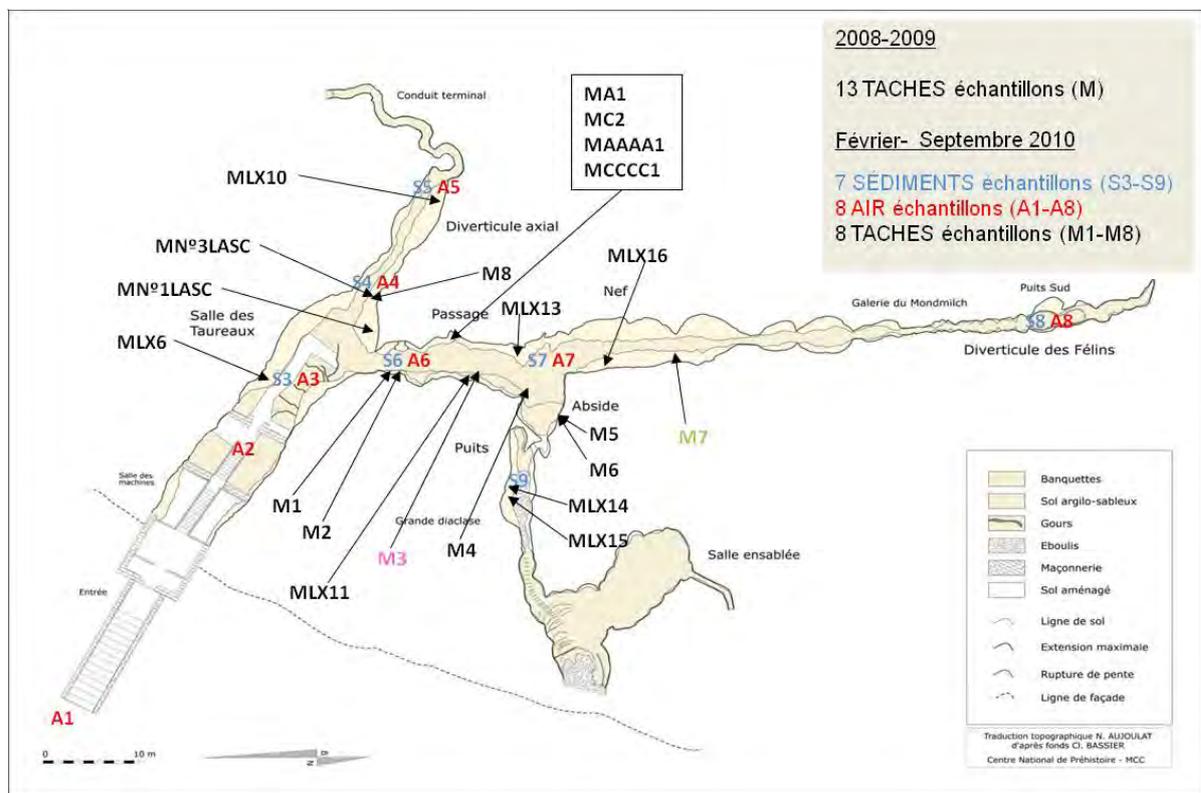
**Figure 11.** Régression linéaire entre les logarithmes de la concentration d'ADN de l'isolat LX CH2 (*Ochroconis* sp. 1) et les valeurs de Ct obtenues avec les amorces 347F/493R

### 2.2.2 Application de la technique développée : distribution d'*Ochroconis* sp. 1 dans la grotte de Lascaux

La technique de PCR en temps réel est appliquée sur des échantillons de nature différente, récoltés dans la grotte à différentes dates

- (i) 13 échantillons prélevés au cours des années 2008-2009, dans différents secteurs et présentant des caractéristiques différentes (Figure 12 et Tableau 9),
- (ii) des échantillons prélevés dans différents secteurs de la grotte en février et septembre 2010 et représentatifs de différents types de taches (8 échantillons), de sol (7) et d'air (8) de différentes parties de la grotte.

La localisation des points d'échantillonnage est indiquée dans la Figure 12. Les caractéristiques des taches sont présentées dans le Tableau 9 et la Figure 13.



**Figure 12.** Localisation des échantillons de taches, sédiments et air, prélevés dans la grotte de Lascaux et utilisés pour la quantification d'*Ochroconis* sp. 1 par PCR en temps réel.

**Tableau 9.** Description des taches à partir desquelles des échantillons ont été prélevés en 2008 et 2009

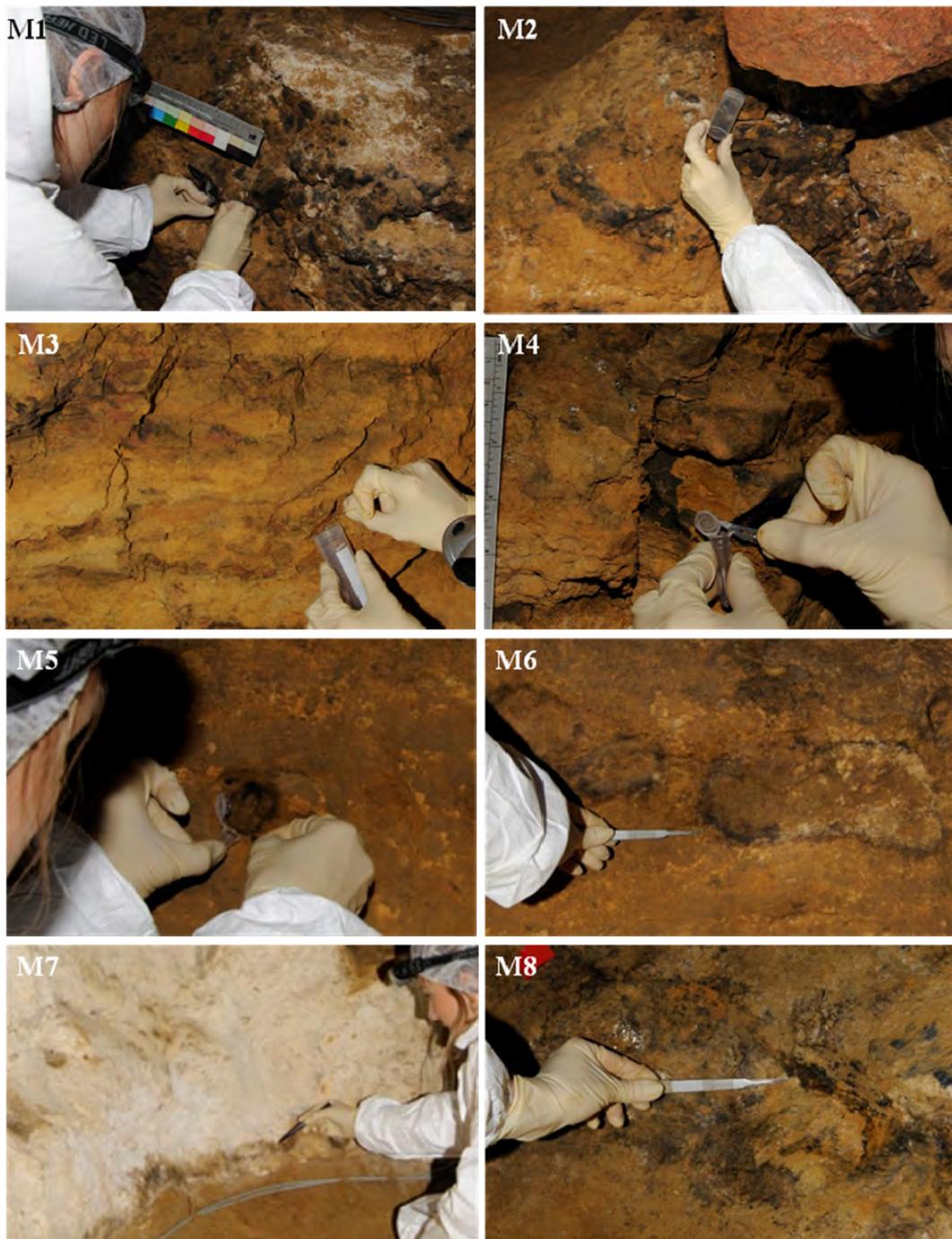
Echantillon	Caractéristiques des taches	Localisation	Date
M-A1	Tache noire, avant nettoyage	Passage à gauche, zone noire intense sans fissure (Zone A)	26/08/2008
M-C2	Tache noire, avant nettoyage	Passage à gauche, zone très colonisée (Zone C)	26/08/2008
M-N°1LASC	Tache noire, surface humide	Salle des Taureaux, plan incliné droit	07/10/2008
M-N°3 LASC	Tache noire, surface très humide	Salle des Taureaux, plan incliné droit	07/10/2008
M-AAAA1	Résidu (après nettoyage superficiel et biocide)	Passage à gauche, zone noire intense sans fissure (Zone A)	17/02/2009
M-CCCC1	Résidu (après nettoyage approfondi et biocide)	Passage à gauche, zone très colonisée (Zone C)	12/02/2009
M-LX6	Tache noire avec collemboles	Salle des Taureaux, à droite, proche de la grande écaille	20/10/2009
M-LX10	Tache noire avec collemboles	Diverticule axial, au fond à droite, au niveau du sol, proximité du cheval renversé	20/10/2009
M-LX11	Tache noire -rose	Passage, au début à droite, à la base de la banquette	20/10/2009
M-LX13	"Crottes épaisses" dans argile mélanisé	Passage, au fond à gauche	20/10/2009
M-LX14	Tache noire -rose	Sous la trappe du Puits de Sorcière, à droite et au fond	20/10/2009
M-LX15	Tache noire, plate et humide	Sous la trappe du Puits de Sorcier, à droite et au fond	20/10/2009
M-LX16	Tache noire sèche	Nef, coté droit en bas des cerfs	20/10/2009

**Tableau 10.** Description des taches à partir desquelles des échantillons ont été prélevés en février et septembre 2010 dans la grotte de Lascaux.

Echantillon	Caractéristiques des taches	Localisation
M1	Tache noire non évolutive, présence de collemboles	Passage, sur la banquette droite
M2	Tache noire, absence de collemboles	Passage, sur la banquette droite
M3	Tache rose-violette	Passage, sur la banquette droite
M4	Tache noire	Passage-Abside, sur la banquette droite, zone d'étude par le Synchrotron Soleil
M5	Tache noire présence abondante de collemboles	Abside haut sur paroi gauche
M6	Tache noire circulaire avec un halo humide, réapparue après nettoyage	Abside haut sur paroi gauche
M7	Tache jaune-vert, présence de collemboles	Nef, sur banquette droite
M8	Tache noire dans zone très humide	Salle des Taureaux-Diverticule axial, prélevée dans zone PR3

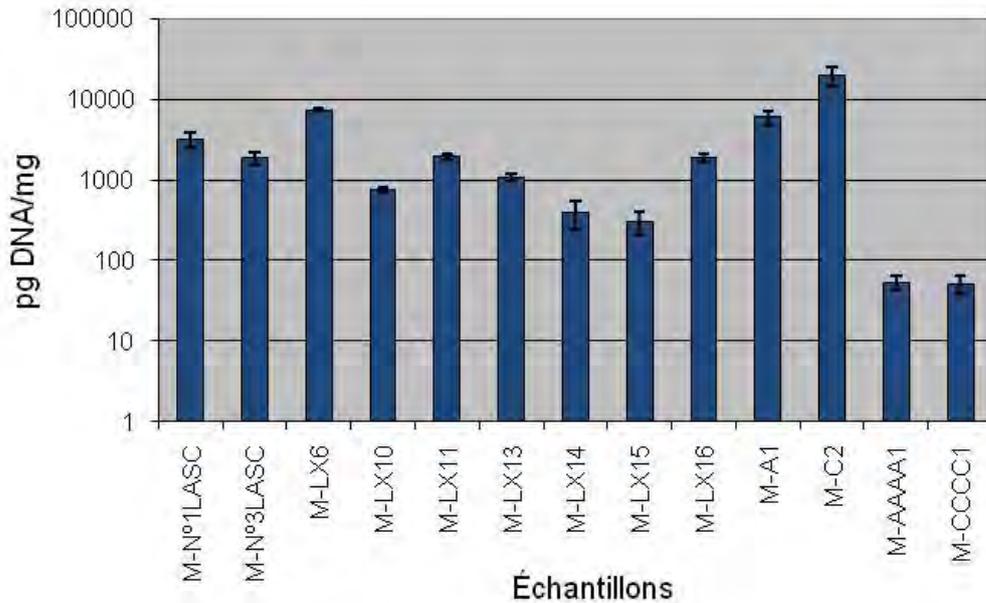
Les échantillons de sol et de taches (entre 100-500 mg) sont prélevés avec une lame stérile et placés dans des tubes « eppendorf » de 1,5 ml. Les échantillons d'air ont été prélevés avec l'appareil Coriolis (Bertin Technologies, France). A raison de 300 L/min ce sont 3 m<sup>3</sup> d'air (10 min) qui traversent une solution de Triton X à 0.005% afin de piéger les microorganismes. Les échantillons destinées aux analyses moléculaires sont maintenus au froid jusqu'à l'arrivée au laboratoire, où ils sont conservés à -80 °C jusqu'à ce qu'ils soient analysés. L'extraction de l'ADN des échantillons est réalisée avec le kit FastDNA SPIN Kit for Soil (MPbio), selon les instructions du fabricant. Pour les échantillons d'air, l'extraction de DNA est réalisée à partir des filtrats recueillis sur des membranes Millipore de diamètre 0.22 µm à travers lesquelles les suspensions (dans le Triton) sont filtrées.

L'analyse des échantillons est réalisée par PRC en temps réel avec les amorces spécifiques 347F/493R, comme indiqué plus haut. Pour chaque échantillon, l'analyse est dupliquée. La quantification est réalisée en reportant les valeurs moyennes sur la droite étalon ; elle est exprimée en pg d'ADN d'*Ochroconis* sp. 1/mg d'échantillon.



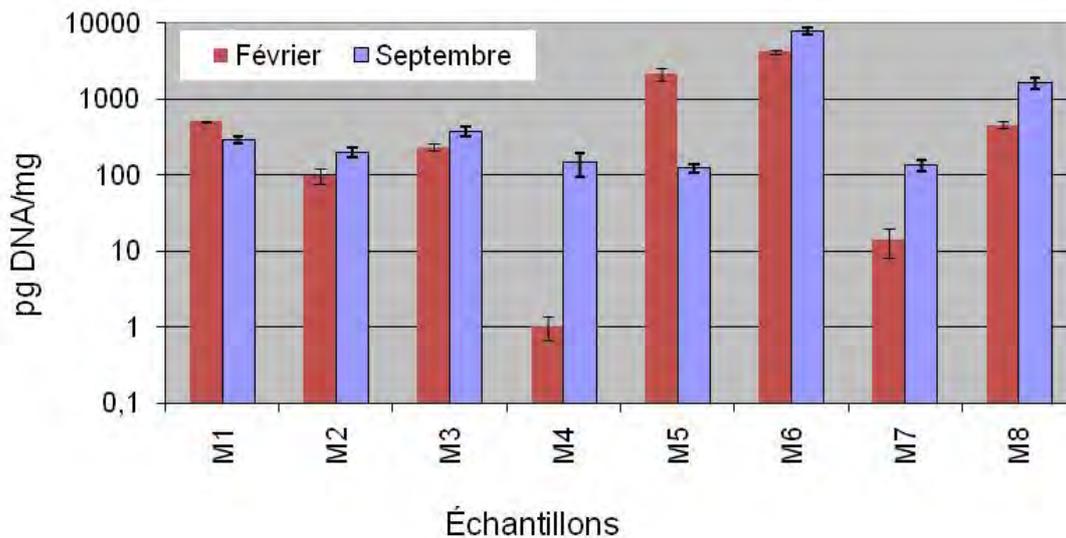
**Figure 13.** Détail des zones de récolte des échantillons des taches (M1-M8).

Les résultats de cette analyse quantitative sont présentés dans les Figures 14 et 15. *Ochroconis* sp. 1 est détecté dans tous les échantillons analysés.



**Figure 14.** Quantification d'*Ochroconis* sp. 1 dans les échantillons de taches noires prélevés dans la grotte de Lascaux en 2008 et 2009.

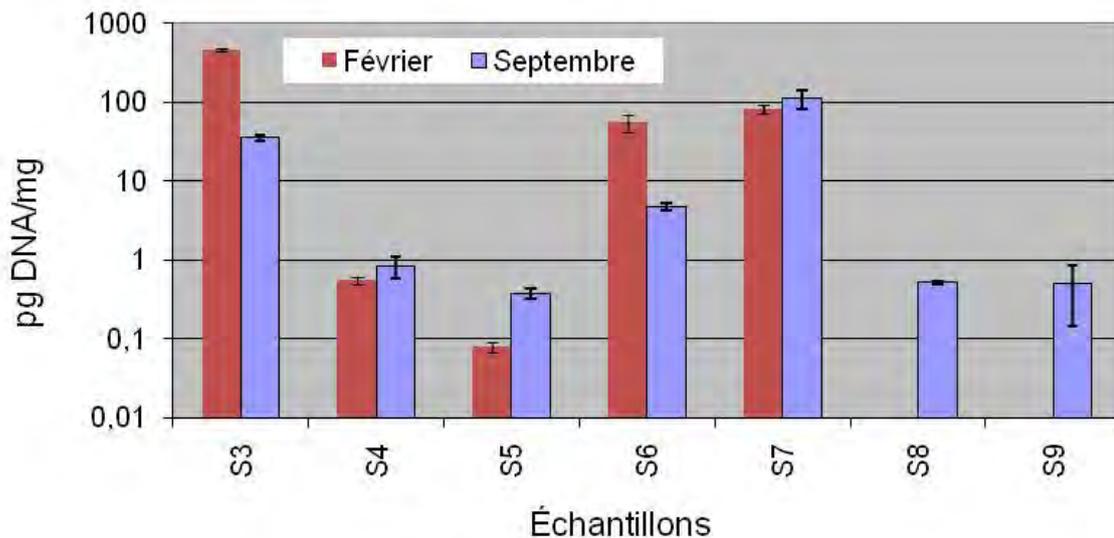
Dans les échantillons récoltés en 2008 et 2009, les niveaux d'ADN oscillent entre 100 pg/mg et 10 ng/mg. Les concentrations maximales se trouvent dans les échantillons M-LX6 (7,4 ng/mg), M-A1 (6,05 ng/mg) et M-C2 (19,6 ng/mg). Ces deux derniers échantillons correspondent à des taches noires présentes dans les zones A et C du Passage avant nettoyage et traitement biocide. Des échantillons prélevés aux mêmes endroits, mais 6 mois après les interventions de nettoyage et de traitement (M-AAAA1 et M-CCCC2) révèlent encore la présence d'*Ochroconis* sp. 1, mais les quantités d'ADN sont faibles, proches du seuil de détection (54,1 pg/mg et 51,4 pg/mg, respectivement).



**Figure 15.** Quantification d'*Ochroconis* sp. 1 dans les échantillons des taches prélevés dans la grotte de Lascaux en 2010.

Dans les échantillons prélevés en 2010, les niveaux détectés sont un peu inférieurs à ceux détectés en 2008-2009. Ils oscillent entre 10 pg/mg et 1 ng/mg. La quantité maximale détectée (7,9 ng/mg) correspond à l'échantillon M6, récolté en septembre, dans l'Abside. La quantité minimale (1 pg/mg) correspond à l'échantillon M4 récolté, en février, au fond du passage. Si on compare les mesures de février et septembre, on peut conclure que les niveaux d'*Ochroconis* sp. 1 sont relativement stables. Mais dans la plus part des cas, la quantité d'ADN détectée en septembre est supérieure à celle détectée en février ; cette augmentation est particulièrement nette pour l'échantillon M4.

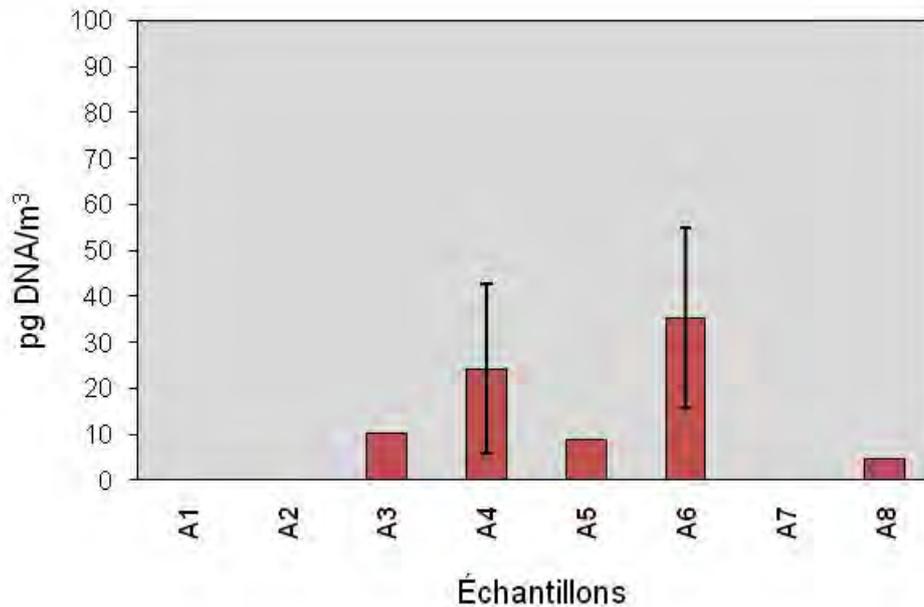
La quantification de l'ADN total et de l'ADN d'*Ochroconis* sp. 1 permet de calculer le pourcentage d'ADN d'*Ochroconis* sp. 1 au sein de l'ADN total et ainsi d'estimer l'abondance de ce champignon au sein des communautés microbiennes de l'échantillon. Dans la plus part des taches étudiées le pourcentage d'ADN d'*Ochroconis* sp. 1 se situe entre 0,1% et 3%. Mais il peut atteindre des valeurs supérieures comme par exemple dans les échantillons M-LX 6 (9,8 %) et M-C2 (7,5 %).



**Figure 16.** Quantification d'*Ochroconis* sp. 1 dans les échantillons de sédiment prélevés dans la grotte de Lascaux dans 2010.

Les résultats des analyses réalisées à partir des échantillons de sédiments sont présentés dans la Figure 16. Cinq des 7 échantillons prélevés en février révèlent la présence d'*Ochroconis* sp. 1 qui est particulièrement abondant dans des échantillons prélevés dans la Salle des Taureaux (S3), le Passage (S6) et l'Abside (S7). Ces résultats sont en concordance avec la distribution des principales taches noires dans la grotte. En septembre, tous les échantillons révèlent la présence d'*Ochroconis* sp. 1 qui présente la même distribution qu'en février, mais avec une extension dans des zones plus lointaines Cabinet des Félines (S8) et Puits du Sorcier (S9).

En conclusion, la distribution d'*Ochroconis* sp. 1 dans la grotte est généralisée, mais les niveaux détectés dans les sédiments sont en général moins importants (entre 0,1 pg/mg et 0,1 ng/mg) que dans les taches noires.



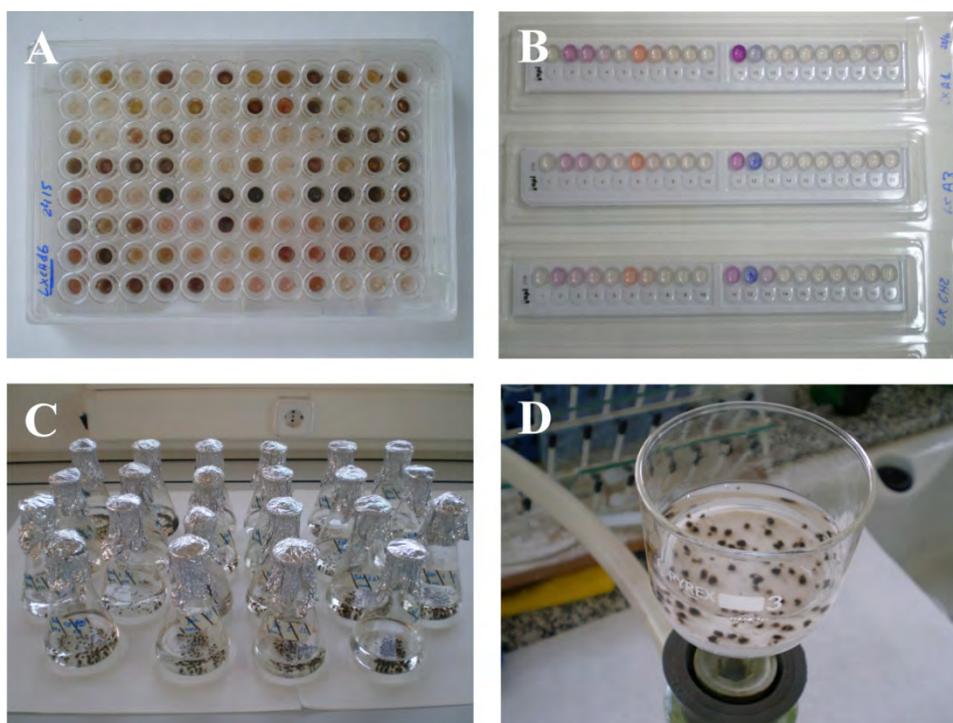
**Figure 17.** Quantification d'*Ochroconis* sp. 1 dans les échantillons d'air prélevés dans la grotte de Lascaux en septembre 2010.

La détection d'*Ochroconis* sp. 1 dans les échantillons d'air prélevés, en septembre sont présentés dans la Figure 17. *Ochroconis* sp. 1 a été détecté à partir de 5 des 8 échantillons analysés. Ce résultat indique que les spores de ce champignon sont dispersées par l'air. La quantité moyenne d'ADN d'*Ochroconis* sp. 1 est plus abondante dans le Passage (A6 ; 35,3 pg/m<sup>3</sup>) et dans le Diverticule Axial (A4 ; 24,3 pg/m<sup>3</sup>). Ces deux zones présentent des taches noires, qui sont plus abondants dans le Passage. Les échantillons de la Salle des Taureaux (A3) et du fond du Diverticule Axial (A5) sont proches des points A4 et A6, mais présentent des quantités inférieures d'ADN d'*Ochroconis* sp. 1. Les très faibles quantités détectées, entre 4 et 10 pg/m<sup>3</sup>, dans les échantillons A3, A5 et A8 (Puits du Sorcier), démontrent la grande sensibilité de la technique, qui permet de détecter même de faibles densités de conidies dans l'air. L'absence d'*Ochroconis* sp. 1 à l'extérieur (A1) de la grotte et dans les SAS (SAS2 ; A2), suggèrent que les spores présentes dans l'air de la grotte ne viennent pas de l'extérieur. Au contraire, tous les résultats indiquent que les spores proviennent des taches noires qui sont abondantes dans le Passage et présentes dans la Salle des Taureaux et le Diverticule Axial.

### 2.3 Etude des besoins nutritionnels d'*Ochroconis* spp.

Le système Biolog (FF-MicroPlate, Fig. 18 A) a été employé pour déterminer les sources de carbone qu'*Ochroconis* spp. peut utiliser. Ces plaques permettent de déterminer la capacité du champignon à métaboliser 95 sources différentes de carbone (De la Cruz et al. 2006).

Les souches étudiées sont : 4 souches isolées de la grotte de Lascaux et représentatives de l'espèce *Ochroconis* sp. 1 (LX A1, LX CH7, LX 7.2 et LX 101R6), mais aussi la souche LX CH40 d'*Ochroconis* sp. 2, et les cinq souches de référence provenant de la collection CBS (*O. tshawytschae*, *O. anellii*, *O. constricta*, *O. humicola* et *S. terreum*).



**Figure 18.** Méthodes employées pour la caractérisation des besoins nutritionnels d'*Ochroconis* spp. **A.** Système Biolog pour déterminer la capacité à utiliser 95 sources de carbone. **B.** système Api Zym pour l'évaluation de l'activité enzymatique. **C** et **D.** Essais de différents produits comme sources de carbone et azote.

Les plaques Biolog sont inoculées selon les instructions du fabricant, en ajoutant à chaque puits 100  $\mu$ L d'une suspension du mycélium du champignon à évaluer. Les plaques sont incubées, dans l'obscurité, à 22 °C pendant 10 jours. Quand les sources de carbone sont métabolisées, un pigment rouge-orangé est produit ; il est mesuré à 490 nm. De plus, la croissance du champignon augmente la turbidité et par conséquent l'absorbance. Des mesures d'absorbance à 490 et 750 nm sont réalisées 3, 6 et 10 jours après l'ensemencement. Pour interpréter ces résultats une gamme étalon est établie à 490 nm : 0-1, réaction négative ou douteuse ; 1-2, réaction positive ; et >2, réaction positive intense.

Les quatre souches d'*Ochroconis* sp. 1 montrent une capacité similaire à utiliser ces sources de carbone sauf pour le L-fucose. Toutes sont capables d'assimiler une grande variété des sources de carbone, 66 des 95 sources testées donnent des réactions positives (Tableau 11).

**Tableau 11.** Liste des molécules utilisées comme source de carbone par *Ochroconis* sp.

Monosaccharides et dérivés	Disaccharides	Tri- et polysaccharides	Glucosides	Acides	Acides aminés	Autres
D-Galactose	Turanose	D-Raffinose	Salicin	$\gamma$ -Amino-butyric acid	L-Alanine	Tween 80
$\alpha$ -D-Glucose	Maltose	Maltotriose	Amygdalin	Quinic acid	L-Asparagine	
L-Rhamnose	D-Trehalose	D-Melezitose	Arbutin	Fumaric acid	L-Phenylalanine	
D-Ribose	D-Melibiose	Stachyose		L-Malic acid	L-Glutamic acid	
D-Xylose	Palatinose	Dextrin		Succinic acid	L-Aspartic acid	
D-Mannose	Sucrose			D-Malic acid	L-Proline	
D-Fructose	D-Cellobiose			$\alpha$ -Keto-glutaric acid	L-Ornithine	
L-Arabinose	Gentiobiose			$\beta$ -Hydroxy-butyric acid	L-Alanyl-glycine	
$\alpha$ -D-Lactose				Sebacic acid	Putrescine	
L-Fucose				L-Lactic acid	Glycyl-L-glutamic acid	
D-Arabinose				Succinamic acid	L-Serine	
Glucose-1-phosphate				Bromosuccinic acid	Alaninamide	
$\beta$ -Methyl-D-glucoside				D-Glucuronic acid	L-Pyroglutamic acid	
				D-Saccharic acid		
				p-Hydroxyphenyl-acetic acid		

Les souches de référence des espèces d'*Ochroconis* and *Scolecobasidium* montrent un comportement similaire, elles peuvent toutes utiliser 49 des molécules proposées. Les 46 autres sources de carbone sont métabolisées ou non selon l'espèce considérée (Tableau 12).

L'espèce majoritaire isolée de la grotte de Lascaux (*Ochroconis* sp. 1) se différencie des autres par sa capacité à métaboliser l'acide D-glucuronique ; et l'autre espèce de Lascaux (*Ochroconis* sp. 2, LX CH40) est, avec la souche LX 101R6 appartenant à l'espèce *Ochroconis* sp. 1, la seule capable d'assimiler l'acide  $\gamma$ -hydroxybutyrique et le L-fucose. Les deux espèces de Lascaux (*Ochroconis* sp. 1 et sp. 2) et *O. tshawytschae* ont en commun la capacité d'utiliser le sucre D-arabinose et l'acide sébacique. Les espèces *O. constricta* et *S. terreum* sont les seules capables de métaboliser les composants : acide D-gluconique,  $\alpha$ -methyl D-galactosidase, L-thréonine, 2-aminoetanol et putrescine. L'espèce *O. anellii* est l'espèce qui utilise le moins grand nombre de sources de carbone (55 sur 95), 8 des sources de carbone utilisées par les autres espèces ne le sont pas par *O. anellii*.

**Tableau 12.** Sources de carbone métabolisées par les différentes espèces d'*Ochroconis* et *Scolecobasidium*.

Source de Carbone	<i>Ochroconis</i> sp. 1*	<i>Ochroconis</i> sp. 2	<i>O. tshawytschae</i> CBS 100438	<i>O. anellii</i> CBS 284.64	<i>O. constricta</i> CBS 211.53	<i>O. humicola</i> CBS 116655	<i>S. terreum</i> CBS 536.69
Adonitol	+	+	+	-	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	-
D-Arabinose	+	+	+	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	-	+	+	+
D-Arabitol	+	+	+	+	+	-	+
Arbutin	+	+	+	-	+	+	+
i-Erythritol	-	-	-	+	+	-	-
L-Fucose	**+	+	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	-	+	+	+
D-Gluconic acid	-	-	-	-	+	-	+
D-Glucuronic acid	+	-	-	-	-	-	-
A-D-Lactose	+	+	+	-	+	+	+
Lactulose	-	-	-	-	+	+	-
D-Melibiose	+	+	+	-	+	-	+
$\alpha$ -Methyl-D-galactosidase	-	-	-	-	+	-	+
$\beta$ -Methyl-D-galactosidase	-	-	-	-	+	-	-
$\beta$ -Methyl-D-glucoside	+	+	+	+	+	+	-
D-Raffinose	+	+	+	+	+	-	+
L-Rhamnose	+	+	+	-	+	+	+
D-Ribose	+	+	-	+	+	-	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	-
Sedoheptulosen	-	-	-	-	+	-	-
Stachyose	+	+	+	+	+	-	+
D-Tagotose	-	-	-	-	-	-	+
$\gamma$ -Amino-butyric acid	+	+	-	-	+	+	+
Bromosuccinic acid	+	+	-	+	+	+	+
Fumaric acid	+	+	+	+	+	-	+
$\gamma$ -Hydroxy-butyric acid	-	+	-	-	-	-	-

Les zones ombragées soulignent les différences de comportement de certaines souches par rapport à l'ensemble des souches.

\*Résultat identique pour les quatre souches : LX A1, LX CH7, LX 7.2 et LX 101R6

\*\*Resultat positif uniquement pour la souche LX 101R6

**Tableau 12** (suite). Sources de carbone métabolisées par les différentes espèces d'*Ochroconis* et *Scolecobasidium*.

Source de Carbone	<i>Ochroconis</i> sp. 1*	<i>Ochroconis</i> sp. 2	<i>O. tshawytschae</i> CBS100438	<i>O. anellii</i> CBS284.64	<i>O. constricta</i> CBS211.53	<i>O. humicola</i> CBS116655	<i>S. terreum</i> CBS536.69
p-Hydroxyphenyl-acetic acid	+	+	-	-	+	+	+
D-Lactic acid methyl ester	-	-	-	-	-	-	+
L-Lactic acid	+	+	-	+	+	+	+
D-Malic acid	+	+	+	-	+	-	+
Quinic acid	+	+	+	-	+	+	+
D-Saccharic acid	+	+	+	+	+	-	-
Sebacic acid	+	+	+	-	-	-	-
Succinamic acid	+	-	-	-	+	-	+
N-Acetyl-L-glutamic acid	-	-	-	-	+	+	+
Alaninamide	+	+	-	-	+	+	+
L-Alanyl-glycine	+	+	+	+	+	-	+
Glycyl-L-glutamic acid	+	+	+	+	+	-	-
L-Ornithine	+	+	-	+	+	+	+
L-Pyroglutamic acid	+	+	+	-	+	+	+
L-Threonine	-	-	-	-	+	-	+
2-Amino ethanol	-	-	-	-	+	-	+
Putrescine	+	-	-	-	+	-	+
Uridine	-	-	-	-	+	-	-

Les zones ombragées soulignent les différences de comportement de certaines souches par rapport à l'ensemble des souches.

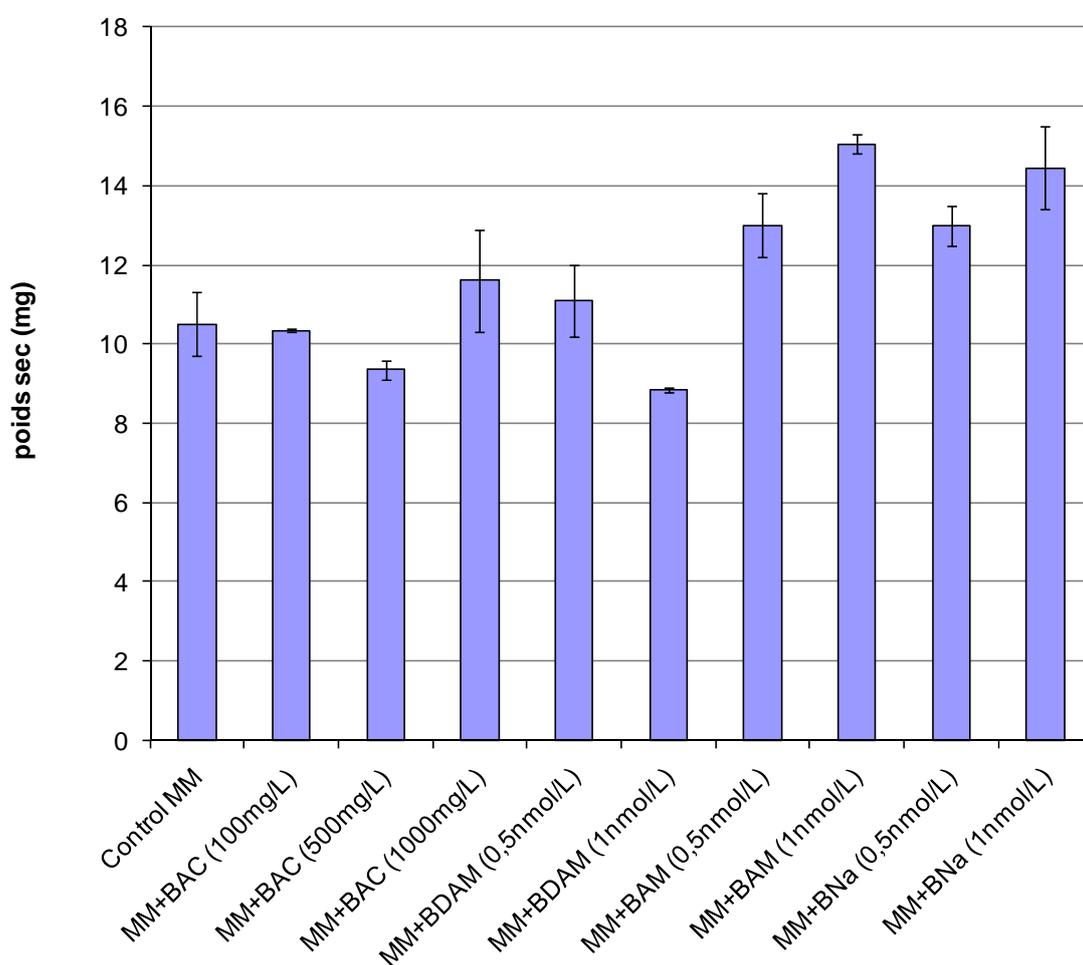
\*Resultat identique pour les quatre souches : LX A1, LX CH7, LX 7.2 et LX 101R6

## 2.4 Capacité d'*Ochroconis* sp. 1 à métaboliser des produits de dégradation du chlorure de benzalconium

La capacité d'*Ochroconis* sp. 1 (souche LX CH16) à utiliser quelques uns des produits dérivés de la dégradation du chlorure de benzalconium (BAC) comme source de carbone a été éprouvée dans une expérience complémentaire. Les produits de dégradation testés sont ceux décrits par Patraucham et Oriol (2003) : benzyldiméthylamine (BDAM), benzylamine (BAM) et acide benzoïque (BA) ; cette dernière molécule, non soluble, a été remplacée par le benzoate de sodium (BNa) soluble dans l'eau.

Le champignon est cultivé dans un milieu Czapek liquide sans saccharose (CZ), dans lequel sont apportées les molécules à éprouver (Figure 18 C et D). Les produits étudiés sont : le BAC aux concentrations de 100, 500 et 1.000 mg/L qui inhibent 50 à 90% de la croissance d'*Ochroconis* sp. 1 (Patraucham et Oriel, 2003) dans le milieu MEA, et ses produits de dégradation BDAM, BAM et BNa aux concentrations de 0,5-1 mmol/L.

Toutes les fioles sont inoculées avec 5 ml d'une suspension homogène de mycélium du champignon dans de l'eau stérile (1 mg de poids sec), après des lavages successifs pour éliminer toute trace de milieu. Les fioles sont incubées sous agitation continue (150 rpm) à 22 °C pendant un mois. La biomasse est récupérée par filtration (Figure 18 D), puis séchée et pesée de manière à calculer l'augmentation de la biomasse en fonction du traitement (Figure 19).

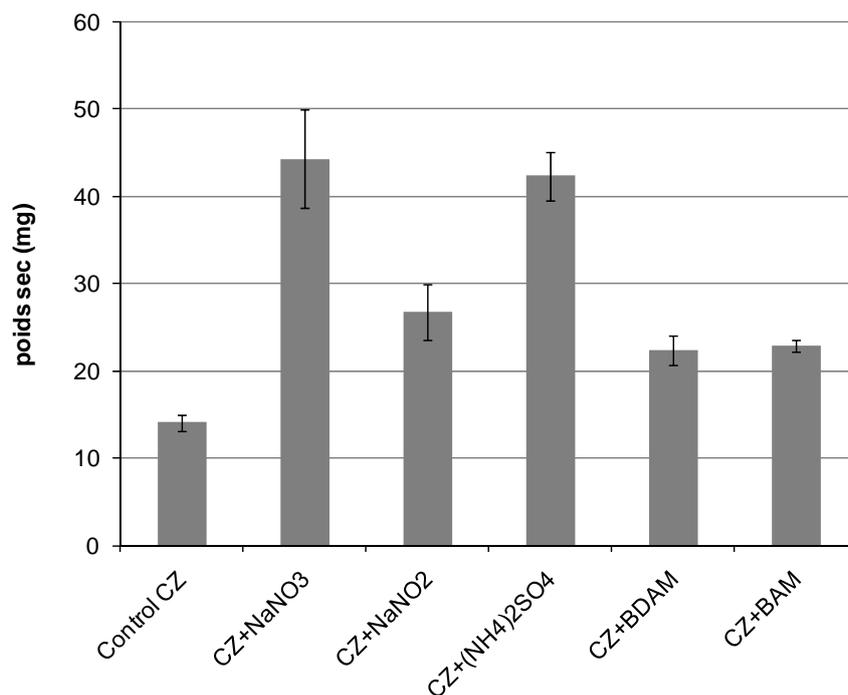


**Figure 19.** Evaluation de différentes molécules utilisées comme source de carbone pour la croissance d'*Ochroconis* sp. La biomasse est exprimée en mg de poids sec. Le milieu CZ, ne contient pas de source ce carbone (saccharose). BAC, chlorure de benzalconium ; BDAM, Benzylidiméthylamine; BAM, Benzylamine; et BNa, Benzoate de sodium.

Comme le montre la Figure 19, les différents traitements contenant BAC et BDAM ne montrent pas de différence significative de biomasse par rapport au témoin lequel montre une croissance de  $10,5 \pm 1.08$  mg à partir des réserves accumulées dans le mycélium inoculé. Mais en présence des produits BAM et BNa la biomasse est légèrement supérieure au témoin. Dans le milieu enrichi en saccharose, la biomasse est de  $87,25 \pm 1.05$  mg (résultats non montrés), la croissance détectée avec les produits BAM et BNa (13-15 mg) est donc très faible. Mais il faut prendre en compte le fait que la concentration des produits apportés au milieu est très faible (approximativement 50-100  $\mu\text{L/L}$  de produit pur) en comparaison à la concentration forte de saccharose apportée au témoin (30g/L). Il aurait fallu apporter des concentrations de BDAM, BAM et BNa 200 fois supérieures (approximativement 16, 17 et 30  $\text{mL/L}$ , respectivement) pour apporter la même quantité de carbone qu'avec le saccharose (12.6 g/L de carbone). Il n'est pas possible d'éprouver ces concentrations car, à ces niveaux de concentration, les produits sont insolubles. Les résultats obtenus avec les faibles concentrations, permettent toute fois de démontrer qu'*Ochroconis* sp. 1 est capable d'utiliser la benzylamine (BAM) et l'acide benzoïque (BA) comme source de carbone.

Pour déterminer les sources d'azote assimilables par *Ochroconis* sp. 1 une autre manipulation a été mise en place suivant le même protocole. La souche LX CH16 a été cultivée dans le milieu Czapek liquide, sans source d'azote (CZ), dans lequel les molécules à tester ont été apportées. Différents sources d'azote sont comparées : nitrate ( $\text{NaNO}_3$ ), nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) et ammonium [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ], ainsi que différents produits de la dégradation du BAC : la BDAM et la BAM. La concentration des produits a été calculée de manière à apporter la même quantité d'azote (0.32 g/L d'azote). Les résultats sont présentés dans la Figure 20.

Comme le montrent les résultats, les molécules étudiées sont utilisées comme source d'azote par *Ochroconis* sp. 1. Les sources de nitrate ( $\text{NaNO}_3$ ) et ammonium [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] sont assimilées avec le plus d'efficacité, alors que le nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) permet une croissance similaire à celle des produits de dégradation du BAC : BDAM et BAM, la biomasse produite est le double de celle observée dans le témoin sans azote.



**Figure 20.** Evaluation de différentes molécules comme sources d'azote pour *Ochroconis* sp.1. La biomasse est exprimée en mg de poids sec. CZ, est le milieu Czapek sans azote ; BDAM : Benzyl diméthylamine et BAM : Benzylamine.

La grotte de Lascaux a été soumise à des traitements successifs avec des biocides, intensifs au cours de la période 2001-2004 lorsque des solutions de chlorure de benzalconium ont été appliquées, parfois en mélange avec des antibiotiques comme la streptomycine et la polymyxine. Des traitements avec le chlorure de benzalconium ont également été pratiqués en janvier 2008.

Il est connu que les bactéries gram négatives sont moins sensibles au chlorure de benzalconium que les bactéries gram positives ; les espèces du genre *Pseudomonas* sont capables de survivre à de fortes concentrations de chlorure de benzalconium (Nagai et al. 1996). Lors de travaux précédents (Bastian et al. 2009a), deux espèces de *Pseudomonas* (*P. brenneri* et *P. chlororaphis*) capables de se développer à des concentrations élevées de Devor Mousse (5 ml/L), équivalent à 5.000 – 12.500 mg/L de chlorure de benzalconium, ont été isolées de la grotte de Lascaux. Récemment, une autre espèce de *Pseudomonas* capable de se développer à la concentration maximale (12.500 mg/L) de chlorure de benzalconium a été isolée des échantillons de taches noires prélevés en février 2010 dans le Passage. L'analyse du gène ribosomique 16S montre que cette espèce présente 100% d'identité nucléotidique avec les séquences de *P. poae*, *P. fluorescens* et *P. reactans*.

Plusieurs auteurs ont montré que des souches de *Pseudomonas* sont capables de dégrader différents types d'ammonium quaternaire (Kroon et al. 1994 ; van Ginkel et al. 1992 ; Nishiyama et al. 2000). Sur la base de nos résultats et de ceux de la

littérature, il est permis de conclure que les fortes concentrations de chlorure de benzalconium auxquelles la grotte a été soumise pendant plusieurs années a entraîné une sélection des espèces de *Pseudomonas* résistantes, qui sont capables de dégrader ces composants et de générer des produits de dégradation : benzyldiméthylamine, benzylméthylamine, benzylamine, benzaldéhyde et l'acide benzoïque (Patrauchan et Oriel, 2003). Ces produits de dégradation sont susceptibles d'être utilisés par les champignons et les bactéries comme source de carbone et d'azote, comme démontré par Chelius et al. (2009) dans la grotte Wind (Dakota, USA). Nos résultats démontrent que les trois produits de dégradation testés (BDAM, BAM et BNa) apportent carbone et azote assimilables par *Ochroconis* sp. 1.

De plus la présence de différentes enzymes, chez *Ochroconis*, a été caractérisée par le système Api Zym, méthode semi quantitative permettant d'évaluer 19 activités enzymatiques (Figure 18 B) (de la Cruz et al. 2006). Ont été ainsi évaluées les huit souches d'*Ochroconis* sp. 1, l'espèce la plus répandue dans la grotte (LX A1, LX A3, LX CH2, LX CH3, LX CH7, LX CH16, LX 7.2 et LX 101R6), la souche LX CH40 de *Ochroconis* sp. 2, et les cinq souches de référence (*O. tshawytschae*, *O. anellii*, *O. constricta*, *O. humicola* et *S. terreum*). Les galeries Api Zym ont été utilisées selon les instructions du fabricant avec cependant quelques modifications. Dans chaque puits sont ajoutés 65 µL d'une suspension mycélienne du champignon à évaluer. Les galeries sont incubés à 30°C à l'obscurité pendant 4h. Une goutte des réactifs ZYMA et ZYMB est ajoutée. Après 10 minutes d'incubation sous lumière blanche, une réaction colorimétrique se développe. Selon l'intensité de la réaction colorée, les résultats sont exprimés sur une échelle de 0 à 4 (Tableau 13) qui correspond à une mesure semi-quantitative de la quantité de substrat hydrolysé : (0) <20nmol, (1) 20-40 nmol, (2) 40-80 nmol et (4) >80 nmol.

**Tableau 13.** Activités enzymatiques détectées chez *Ochroconis* spp., résultats obtenus avec le système Api Zym et exprimés en quantité de substrat hydrolysé\*

Enzymes **	Souches de référence				
	<i>O. tshawytschae</i> CBS 100438	<i>O. anellii</i> CBS 284.64	<i>O. constricta</i> CBS 211.53	<i>O. humicola</i> CBS 116655	<i>S. terreum</i> CBS 536.69
Phosphatase alcaline	1	2	2	3	1
Estérase (C4)	1	1	1	1	1
Estérase lipase (C8)	0	0	0	1	1
Leucine arilamidase	1	2	3	3	2
Phosphatase acide	2	4	4	4	4
Naphtol-AS-BI-phosphohidrolasa	2	2	2	2	2
$\alpha$ -Galactosidase	0	0	0	0	0
$\beta$ -Galactosidase	0	0	0	0	1
B-Glucosidase	0	0	0	0	1
N-Acetil- $\beta$ -glucosaminidase	0	0	0	2	0
$\alpha$ -Mannosidase	0	0	0	1	1

Enzymes **	Souches isolés de la grotte de Lascaux								
	LX A1	LX A3	LX CH2	LX CH3	LX CH7	LX CH16	LX 7.2	LX 101R6	LX CH40
Phosphatase alcaline	2	2	2	1	2	2	2	3	1
Estérase (C4)	2	2	1	1	1	1	1	1	1
Estérase lipase (C8)	0	1	0	0	1	0	1	0	0
Leucine arilamidase	2	2	2	2	2	1	2	1	2
Phosphatase acide	3	2	2	2	3	3	3	3	4
Naphtol-AS-BI-phosphohidrolasa	2	3	3	2	2	2	2	2	3
$\alpha$ -Galactosidase	0	0	1	1	2	0	2	3	0
$\beta$ -Galactosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\beta$ -Glucosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil- $\beta$ -glucosaminidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ -Mannosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* La quantité de substrat hydrolysé est corrélée avec la production des enzymes. Pas de substrat hydrolysé (0), < 20 nmol (1), 20-40 nmol (2), 40-80 nmol (3), (4) > 80 nmol.

\*\* Parmi les 19 enzymes testées, les résultats ne montrent que celles pour lesquelles une réaction positive a été enregistrée avec une ou plusieurs souches analysées. Les enzymes suivantes ne sont synthétisées par aucune des souches : lipase (C4), valine arylamidase, cystine arilamidase, trypsine,  $\alpha$ -quimotrypsine,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase, et  $\alpha$ -fucosidase.

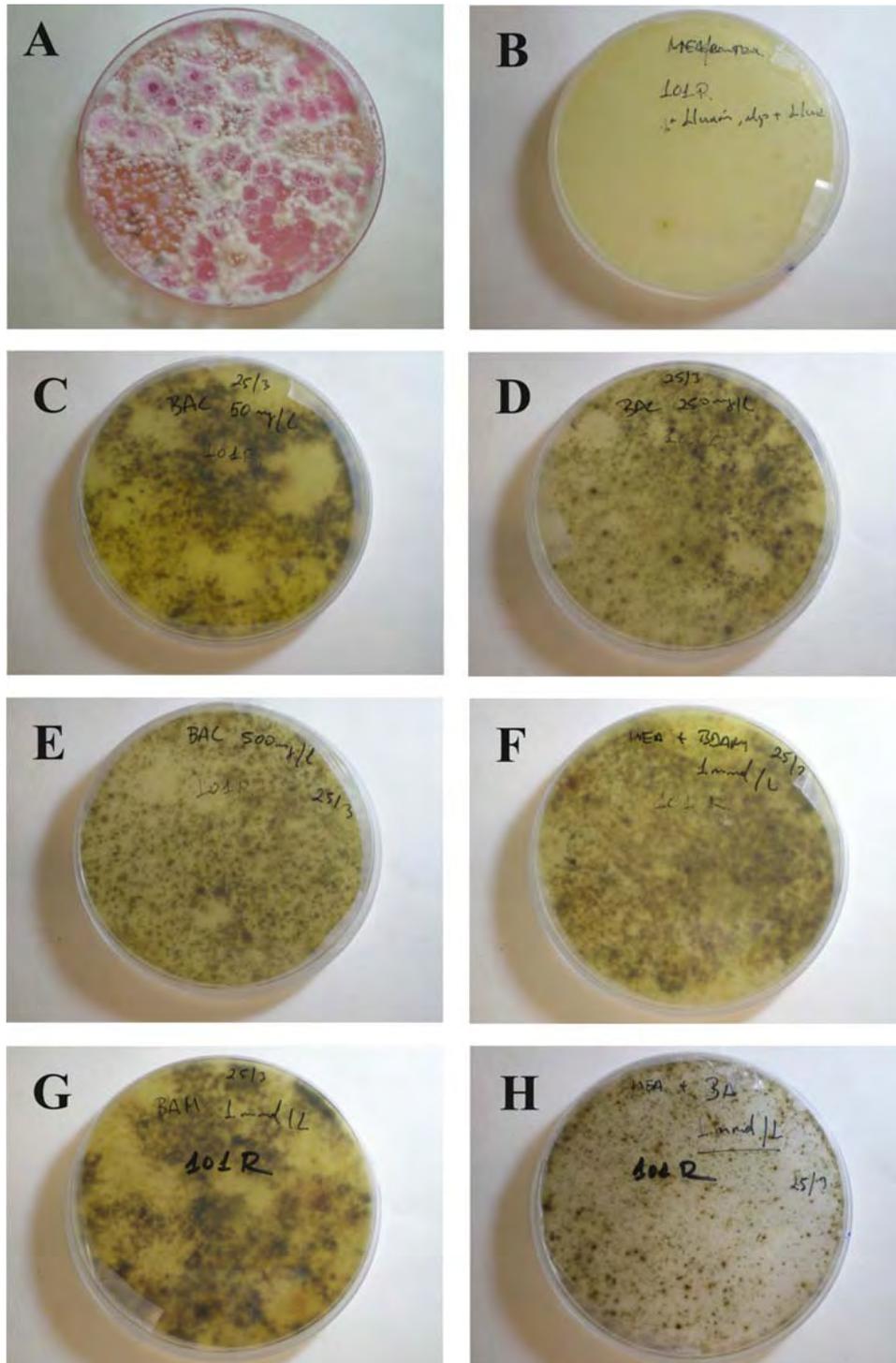
Toutes les souches d'*Ochroconis* spp. produisent cinq des 19 enzymes testées : phosphatase alcaline, estérase (C4), leucine arylamidase, phosphatase acide et naphtol-AS-BI-phosphohydrolyase. En plus, quelques souches isolées de la grotte

possèdent une activité estérase lipase (C8) et  $\alpha$ -galactosidase. Les activités enzymatiques des souches de la grotte sont assez homogènes et montrent uniquement de légères différences dans la quantité de substrat hydrolysé. Les souches *O. humicola* et *S. terreum* possèdent des activités enzymatiques que les différencient des autres espèces.

## 2.5 Rôle des biocides dans la mélanisation des microorganismes

Une observation réalisée au cours de ce travail, nous a permis de montrer indirectement le rôle des biocides dans la formation de mélanine. Une suspension réalisée à partir d'une tache noire (M2) récoltée dans le Passage en février 2010 a servi à ensemercer différents milieux de culture, sans biocides ou enrichis avec les produits de dégradation du chlorure de benzalconium. Après un mois d'incubation à 22°C les champignons cultivés sur milieu enrichi avec chlorure de benzalconium, benzyldiméthylamine, benzylamine et acide benzoïque (Figure 21 C-H), montraient une mélanisation importante alors que les champignons cultivés en absence de ces composants ne présentaient pas de mélanine (Figure 21 A, B).

Dans la littérature les études portant sur les processus de mélanisation chez les microorganismes sont très anciennes. Hardisson et Pochon (1966) et Thompson (1989) décrivent la production de mélanine par *Azotobacter chroococcum* en présence de benzoate sodique. Les résultats préliminaires que nous avons acquis suggèrent que la prolifération des taches noires et des microorganismes capables de les produire sont directement en relation avec la présence des produits de dégradation du chlorure de benzalconium, qui favorise la croissance de ces microorganismes producteurs de mélanine et/ou induit le processus de mélanisation.



**Figure 21.** Boîtes de Petri inoculées avec une suspension de la tache noire (M2) après un mois d'incubation à 22 °C. Milieux de culture : DRBCA (A), MEA (B), et MEA additionné de : chlorure de benzalconium 50 mg/L (C), 250 mg/L (D) et 500 mg/L (E). Benzyldiméthylamine, 1 mmol/L (F); Benzylamine, 1 mmol/L (G); acide benzoïque, 1 mmol/L (H).

## 2.6 Etude des communautés fongiques associées aux taches noires de la Grotte de Lascaux

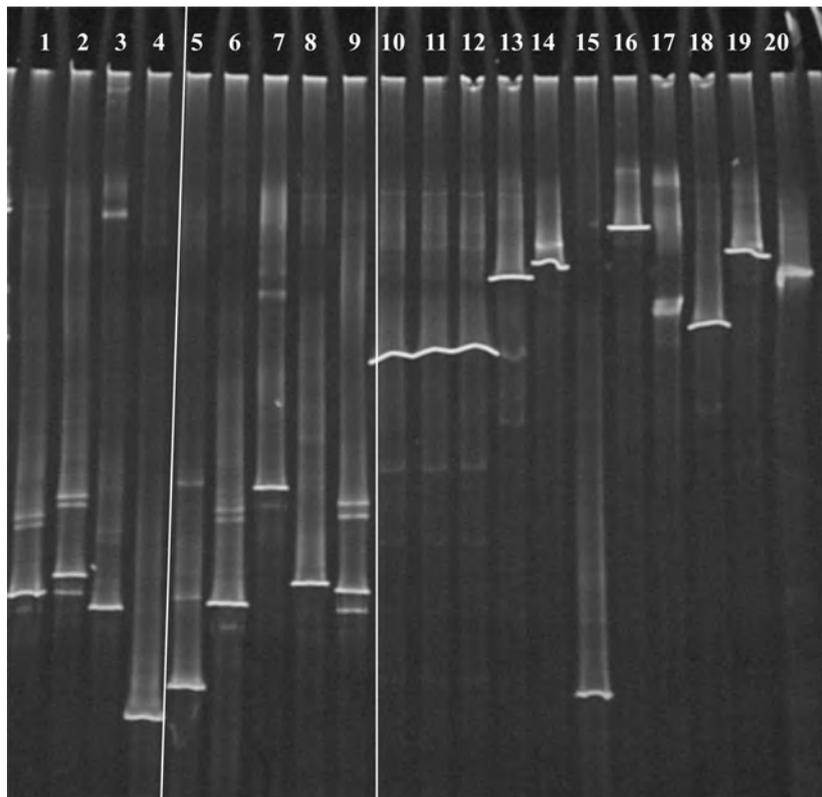
### 2.6.1 Caractérisation moléculaire

#### 2.6.1.1 Electrophorèse en gel de gradient dénaturant (DGGE)

La technique de l'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE) a été largement utilisée pour caractériser les communautés de bactéries et de champignons dans des échantillons naturels d'origine diverse. Cette technique est particulièrement utile dans l'étude de la flore des grottes en raison de la faible diversité attendue de ces environnements oligotrophes. Récemment, Jurado et al. (2010) ont appliqué cette technique pour surveiller les communautés responsables d'une invasion de champignons dans la grotte Castañar de Ibor, Cáceres, Espagne.

L'extraction de l'ADN fongique est effectuée comme décrit plus haut. L'ADN de la séquence ribosomique intergénique est amplifié par PCR en utilisant les amorces ITS1 et ITS4 (White et al. 1990). Cette région, de longueur variable selon l'espèce de champignon, compte environ 500 à 600 pb. Pour l'analyse DGGE une seconde amplification est réalisée avec les amorces ITS1-GC (contenant une queue GC-riche à son extrémité 5') et ITS2. Ces amorces amplifient une région d'environ 200 pb, qui est ensuite analysée par DGGE. Des gels d'acrylamide présentant un gradient 25-45% ont été utilisés et l'électrophorèse a été poursuivie pendant 16h à 100V.

Cette technique a d'abord été appliquée à différents isolats fongiques, en culture pure, afin d'établir le profil de migration caractéristique des champignons de la grotte de Lascaux. Un gel représentatif est présenté Figure 22. Les différents isolats d'*Ochroconis* sp. 1 de la grotte de Lascaux montrent un profil caractéristique de 3 ou 4 bandes, avec de faibles différences de migration. La souche LX CH40 d'*Ochroconis* sp. 2, présente un profil différent des autres souches. Certaines souches de référence (*O. anellii* et *O. terreum*) montrent un profil proche de celui des souches de Lascaux. Ce motif apparaît dans la zone intermédiaire du gel, sans chevauchement des bandes produites par d'autres champignons isolés de la grotte. Nous avons utilisé diverses combinaisons de ces champignons comme marqueurs dans les analyses DGGE ultérieures.

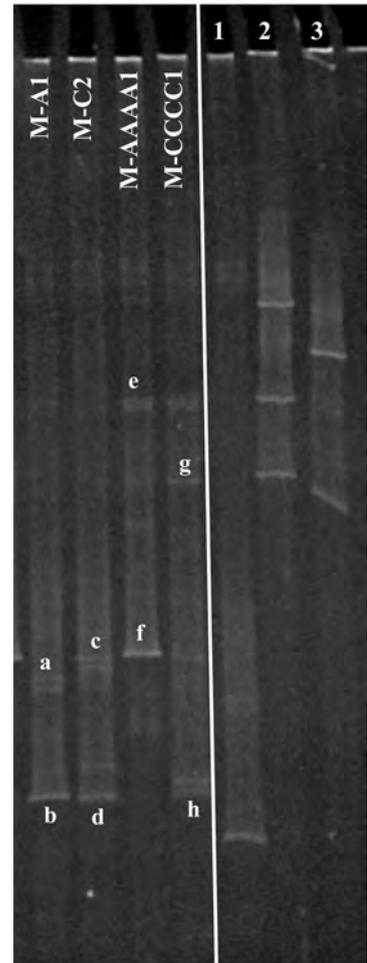


**Figure 22.** Profils DGGE de champignons en culture pure. Souches d'*Ochroconis* spp. provenant de la grotte de Lascaux : LX A1 (1), LX CH2 (2), LX 101R6 (3) et LX CH40 (4). Souches de référence d'*Ochroconis* et *Scolecobasidium* spp. : *O. tshawytschae* (5), *O. anellii* (6), *O. constricta* (7), *O. humicola* (8) et *S. terreum* (9). Autres souches isolées des taches de la grotte de Lascaux : *Cladosporium* spp. (10-12), *Geomyces pannorum* (13), *Gliomastix murorum* (14), *Acremonium nepalense* (15), *Exophiala* sp. (16), *Mortierella* sp. (17), *Penicillium* sp. (18), *Cosmospora* sp. (19) et *Alternaria* sp. (20).

Après avoir obtenu les profils des échantillons naturels, certaines bandes ont été séquencées pour tenter d'identifier les champignons correspondant. Pour ce faire, les bandes découpées à partir du gel, ont été purifiées en utilisant QIAEX II Gel Extraction Kit (Quiagen), puis amplifiées avec les amorces universelles ITS1 et ITS2 (White et al. 1990). Les produits de PCR purifiés ont été envoyés pour séquençage à l'entreprise Secugen, Madrid, Espagne. Pour identifier les espèces fongiques, les séquences obtenues ont été comparées aux séquences déposées dans GenBank en utilisant l'algorithme BLAST de NCBI.

#### 2.6.1.2 Identification des communautés fongiques par la technique (DGGE)

Deux échantillons de taches noires (M-M-A1 et C2, Tableau 9) récoltés dans le Passage en août 2008 et deux échantillons de sédiments (M- AAAA1 et M-CCCC1) prélevés dans les mêmes zones en Février 2009, après les interventions de nettoyage mécanique et d'application de biocides ont été analysés selon la méthode décrite ci-dessus. Les résultats sont présentés dans la Figure 23.



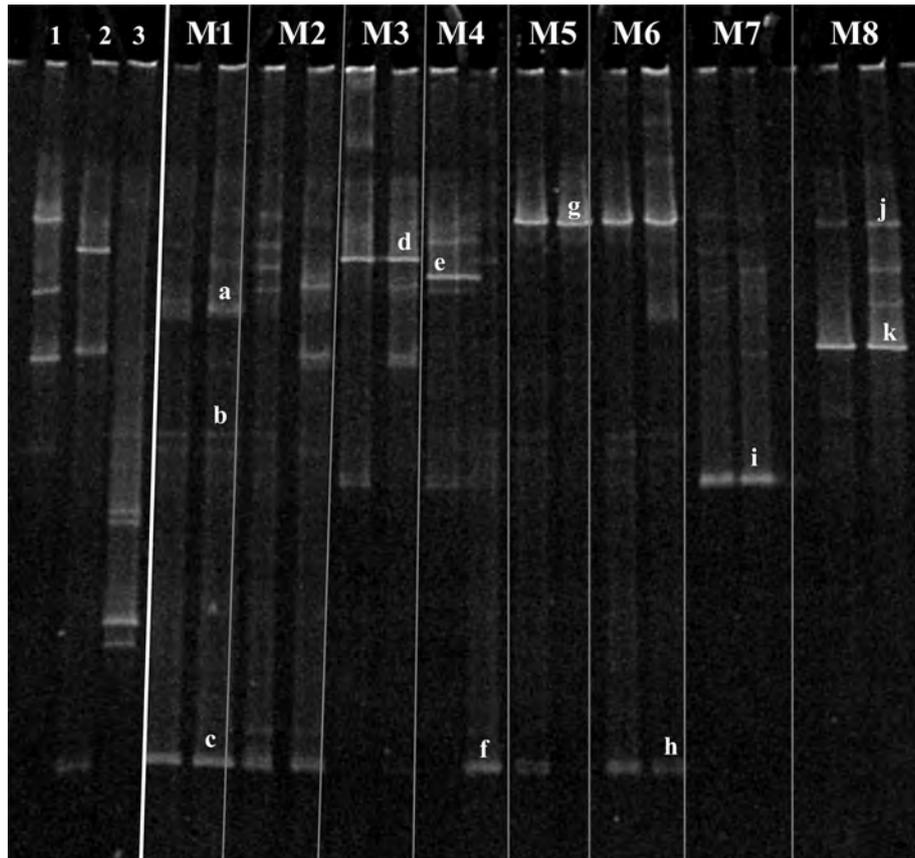
**Figure 23.** Profils DGGE des taches noires (M-A1 et M-C2) et des sédiments (M-AAAA1 et M-CCCC1). Marqueurs : *Ochroconis* sp. 1 (1); *Exophiala* sp. *G. pannorum* et *Cladosporium* sp. (2); *Cosmospora* sp. et *Penicillium* sp. (3). Bandes identifiées : *Ochroconis* sp. 1 (a, b, c et d); *Alternaria* sp. (e); *Gymnascella* sp. (f); *Cladosporium* sp. (g) et *Aspergillus* sp. (h).

Dans les échantillons des taches, avant traitement, le champignon le plus représenté est *Ochroconis* sp. 1. Ceci est démontré par les profils de bandes obtenus qui sont caractéristiques de cette espèce. De plus, ce résultat a été confirmé par séquençage des quatre bandes (a, b, c, d) découpées dans le gel. Après les traitements ces bandes ne sont pas détectées dans l'échantillon M-AAAA1. L'échantillon M-CCCC1 continue à présenter un profil semblable à celui d'*Ochroconis* sp. 1, mais une des bandes (h) correspond à *Aspergillus* sp.

Ces résultats sont cohérents avec la quantification effectuée par PCR en temps réel (Figure 14), où *Ochroconis* sp. 1 est également détecté après les traitements, mais à des niveaux inférieurs à ceux détectés avant traitement. Les champignons majoritaires dans ces échantillons sont bien différenciés, et appartiennent aux genres *Alternaria*, *Gymnascella*, *Cladosporium* et *Aspergillus*. Après nettoyage et application de biocide, les sédiments sont rapidement colonisés par des champignons présents dans l'air de la grotte.

Les profils DGGE des échantillons de taches récoltés en février et septembre 2010 sont présentés dans le Tableau 14. En plus des taches de couleur noir, une tache de couleur violet (M3) et de couleur vert-jaune (M7) ont été prélevées. Les résultats

(Figure 24), montrent que les profils des bandes des prélèvements de février et septembre sont très similaires. Les populations de champignons de chaque zone de prélèvements apparaissent stables au cours de l'année. Il n'y a pas de bandes caractéristiques d'*Ochroconis* sp. 1 dans aucun des échantillons analysés. Cependant, dans tous les échantillons l'ADN de ce champignon a été détecté (Figure 15), mais les concentrations très faibles sont indétectables par la technique DGGE parce qu'en dessous de la limite de sensibilité de la méthode (5%).



**Figure 24.** Profils DGGE des échantillons des taches (M1-M8), récoltés en février (gauche) et septembre (droite) de 2010. Marqueurs : *Exophiala* sp., *G. pannorum* et *Cladosporium* sp. (1) ; *Cosmospora* sp., *Penicillium* sp. et *Acremonium nepalense* (2) ; *Ochroconis* sp. (LXA1) (3). Bandes identifiées : *Geomyces* sp. (a), *Acremonium nepalense* (b, c, f, h), levures noires : *Exophiala*, *Capronia* ou *Cladophialophora* (d, g, j) ; *Gliomastix murorum* (e) ; *Bullera* sp. (i) et *Chytridiomycete* sp. (k).

Cinq (M1, M2, M4, M5, M6) des 6 échantillons de taches noires présentent un profil caractéristique composé par une double bande (b) dans la région intermédiaire et une bande (c, f, h) dans la zone inférieure. Après séquençage ces champignons ont été identifiés comme *Acremonium nepalense*, résultat qui coïncide avec des identifications réalisées antérieurement. Dans les six échantillons de taches noires

(M1, M2, M4, M5, M6 et M8) se trouvent des bandes localisées dans la région supérieure du gel (g, j). Ces bandes sont identifiées comme appartenant à des levures noires identifiées comme *Exophiala* ou *Cladophialophora*. Dans la tache violette (M3) la bande principale (d) montre également une grande similitude avec les profils de ces levures et avec *Capronia* (état holomorphe d'*Exophiala*).

Les échantillons de la tache vert-jaune (M7) récoltés dans la Nef à deux périodes de l'année montrent la même bande majoritaire (i). Sa séquence est très similaire à celle de *Bullera* sp., une levure de couleur jaune pâle ou crème qui se trouve fréquemment dans l'air et sur les feuilles des plantes.

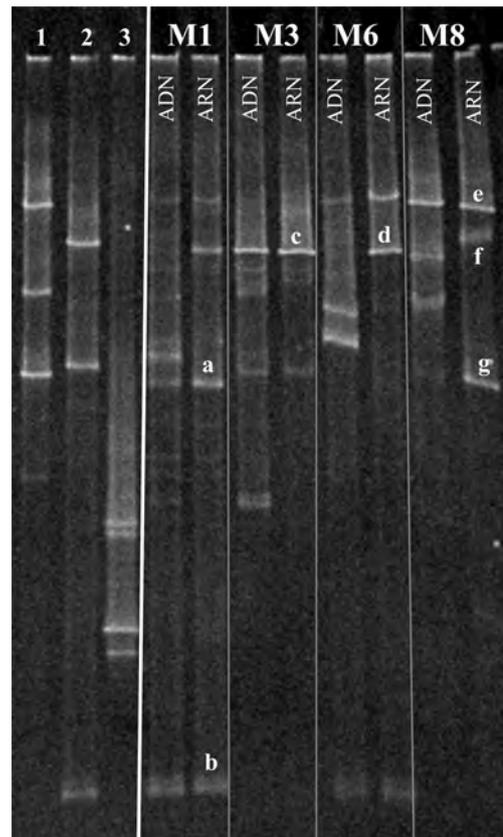
Le terme «Levure noire» désigne un groupe de champignons assez hétérogène du point de vue taxonomique et phylogénétique, mais ayant en commun des parois cellulaires mélanisées et la formation de cellules filles par bourgeonnement multilatéraux ou polaires. Les cellules filles peuvent être encapsulées dans une matrice de polymères extracellulaires. La plupart des levures noires présentent en outre une croissance mycélienne et peuvent donner naissance à des conidies, à partir de phialides simples ou à collerettes, de phialides annelées, ou de cellules conidiogènes indifférenciées. Les conidies peuvent être non cloisonnées ou présenter jusqu'à trois cloisons transversales (Sterflinger, 2006).

Les levures noires peuvent coloniser des environnements extrêmes caractérisés par des conditions oligotrophes, des températures élevées, des radiations UV, des stress osmotiques et des combinaisons de ces différentes conditions. L'influence combinée de ces facteurs de stress exerce une forte pression de sélection sur la communauté microbienne. En conséquence il est rare d'identifier des levures noires au sein de populations microbiennes complexes. Elles sont présentes de manière isolée ou spatialement associées entre elles dans des habitats très spéciaux où règnent les conditions de stress qui les favorisent. Les conditions environnementales de la grotte de Lascaux, dans laquelle des communautés microbiennes complexes ont été décrites (Bastian et al. 2009 a-c) ne correspondent pas à priori aux conditions de développement de ces levures noires. Il est donc important de mieux décrire l'écologie de la grotte pour identifier les facteurs qui ont permis l'installation de cette population particulière de levures noires.

Différentes levures noires sont décrites comme à l'origine de taches noires dans des monuments de plein air, dans des localités soumises à un fort ensoleillement et une forte sécheresse. Elles appartiennent aux ordres des *Chaetothyriales* : *Exophiala*, *Phialophora*, *Sarcinomyces* et *Coniosporium* (Wollenzien et al. 1995 ; Gorbushina et al. 2002 ; Urzì, 2004, Matsumoto et al. 1987 ; Revankar et Sutton, 2010). Récemment, différentes espèces d'*Acremonium* associées à des taches noires ont été décrites dans des peintures murales au Japon (Kiyuna et al. 2008). Du fait de l'abondance des levures noires et d'*Acremonium nepalense* dans les échantillons récemment analysés, il est nécessaire d'approfondir l'étude de ces microorganismes pour mettre en lumière leur rôle dans la formation des taches noires de la grotte de Lascaux.

### 2.6.1.3 Identification des champignons métaboliquement actifs par la technique DGGE

L'ARN de quatre échantillons récoltés en septembre 2010 a été analysé par la méthode DGGE. Ce sont les échantillons correspondant à trois taches noires présentant des caractéristiques différentes (M1, M6 et M8) et à la tache violette (M3). La purification de l'ARN est réalisée selon le protocole « RNeasy Minielute Cleanup Kit » (Quiagen) et la synthèse de l'ADN complémentaire avec l'enzyme SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Les profils DGGE permettant de comparer les échantillons d'ADN et d'ARN de ces 4 échantillons sont présentés dans la Figure 25.



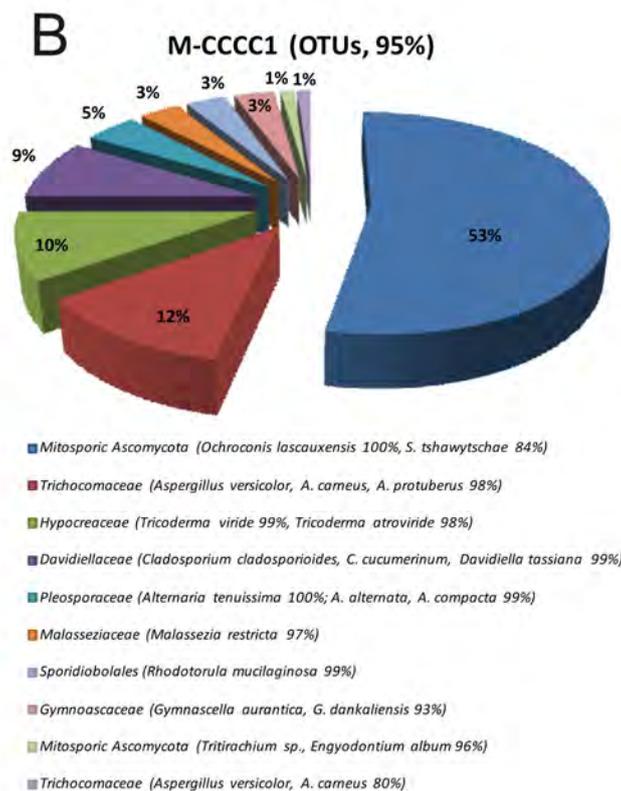
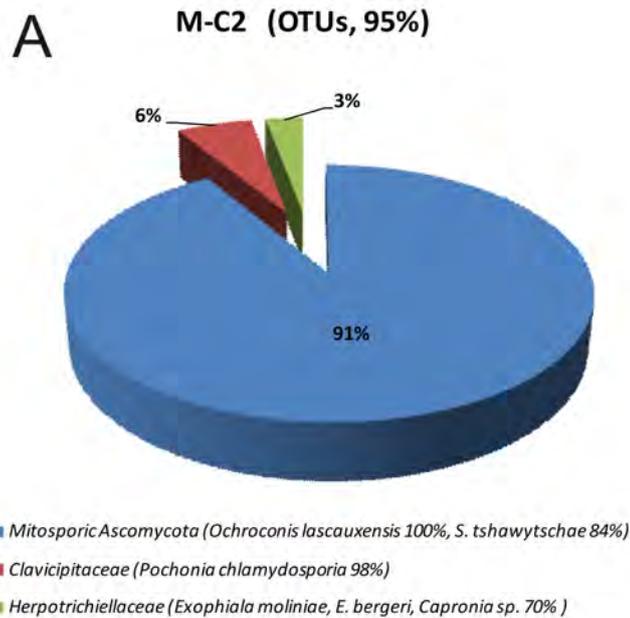
**Figure 25.** Profils DGGE des taches noires (M1, M6 et M8) et violette (M3), récoltées en septembre 2010. Comparaison des profils obtenus à partir d'ADN et ARN (champignons métaboliquement actifs). Marqueurs : *Exophiala* sp., *G. pannorum* et *Cladosporium* sp. (1); *Cosmospora* sp. *Penicillium* sp. et *Acremonium nepalense* (2); *Ochroconis* sp. 1 (LXA1) (3). Bandes identifiées : *Geomyces* sp. (a), *Acremonium nepalense* (b), levures noires *Exophiala*, *Capronia* ou *Cladophialophora* (c,d,e) ; et *Chytridiomycete* spp. (f,g).

L'analyse de l'ADN permet d'identifier les champignons majoritaires, qu'ils soient métaboliquement actifs ou non. L'analyse des ARNs, révèle uniquement les populations de champignons métaboliquement actifs. La Figure 25, montre des profils similaires pour l'analyse de l'ADN ou de l'ARN. Quelques bandes confirment que les échantillons analysés présentent des levures noires métaboliquement actives. Les résultats montrent aussi que les taches noires M1 et M6 présentent des *Acremonium nepalense* métaboliquement actifs.

#### 2.6.1.4 Construction de génothèques

Avec l'objectif d'identifier les principaux champignons qui constituent les communautés présentes dans les taches noires, des génothèques ont été construites à partir des produits de PCR des régions ITS. Pour le clonage et la transformation le vecteur pGEM T-Easy (Promega) et les cellules compétentes d'*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (JM109 High Efficiency Competent Celle, Promeg) ont été utilisées. Après vérification par PCR que les clones obtenus ont intégré l'insert, ils sont envoyés à séquencer à Macrogen (Seoul, Corea). Un total de 100 clones sont analysés par échantillon. Les séquences obtenues sont nettoyées avec le programme on-line SeqTrim ([http://www.scbi.uma.es/cgi-bin/seqtrim/seqtrim\\_login.cgi](http://www.scbi.uma.es/cgi-bin/seqtrim/seqtrim_login.cgi)), et les séquences chimériques sont éliminées avec l'application Chimera Test (<http://www.borealfungi.uaf.edu/>). Les unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) sont établies avec le programme DOTUR, regroupant les séquences présentant une similarité de 95%. Pour identifier chacun des OTUs, la similarité des séquences est analysée, en utilisant l'algorithme BLAST de NCBI.

Les génothèques de deux échantillons analysés par PCR en temps réel et DGGE sont construites. : elles correspondent à (i) un échantillon de tache noire avec la présence d'*Ochroconis* sp. 1 (M-C2), récolté dans le Passage en aout 2008, (ii) un échantillon de sédiment M-CCCC1 récolté dans la même zone six mois après, pour analyser l'effet des traitements de nettoyage et application de biocides sur la communauté fongique. Les génothèques correspondantes sont présentées dans la Figure 26. En concordance avec le profil DGGE de la tache noire M-C2 récolté avant les traitements (A), la diversité fongique est très faible. L'OTU majoritaire (91% des clones) correspond à *Ochroconis* sp. 1 et la séquence des clones est pratiquement identique à celle des isolats de la grotte déjà caractérisés. Deux OTUs minoritaires (3 et 6 % des clones) correspondent à des souches appartenant aux familles *Clavicipitaceae* et *Herpotrichiellaceae*, cette dernière regroupant les principales levures noires.



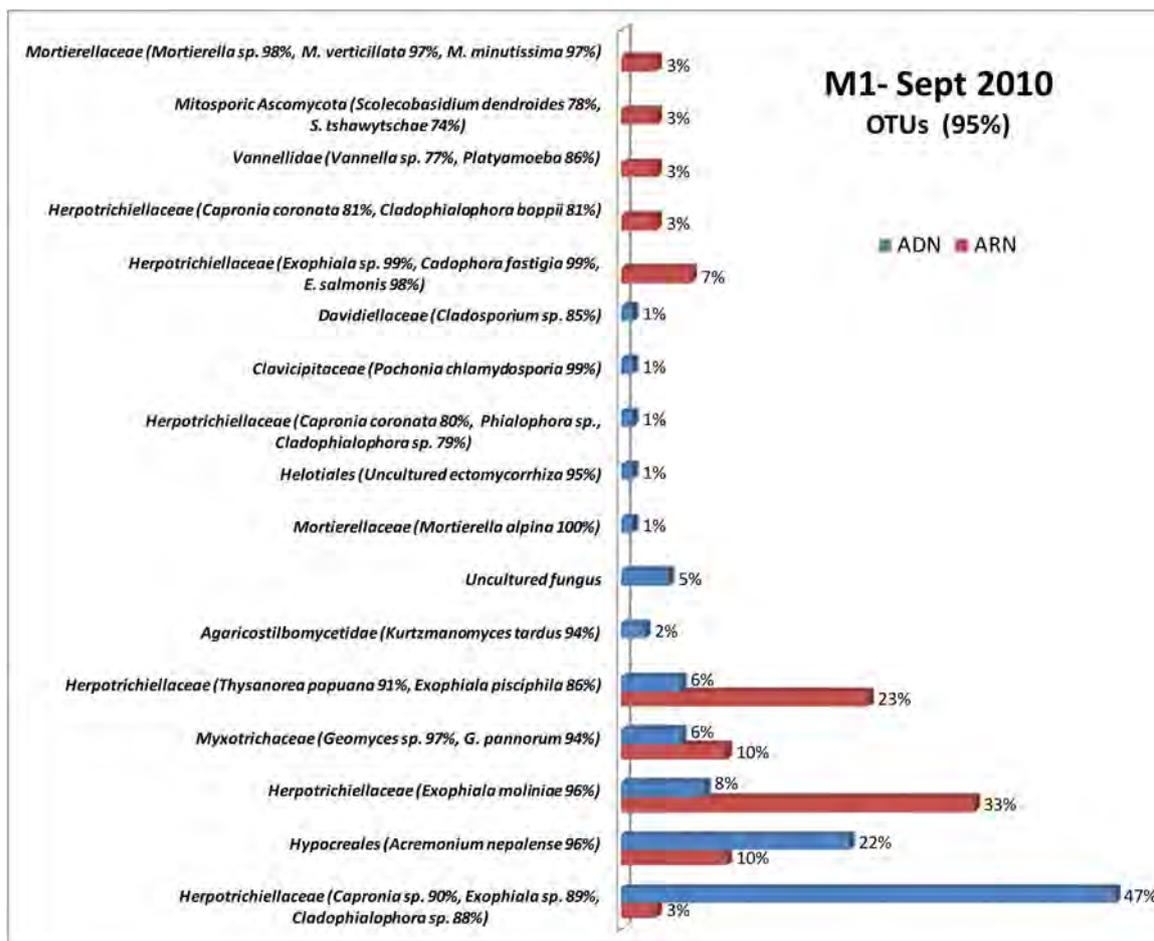
**Figure 26.** Génothèque de l'échantillon de tache noire M-C2 (A), récolté dans le Passage en août 2008. Génothèque du sédiment M-CCCC1 (B), récolté au même endroit en février 2009, après nettoyage mécanique et traitement biocides. Chaque OTU s'identifie taxonomiquement au niveau de la famille ou de l'ordre. Entre parenthèses sont précisées les espèces dont les séquences les plus proches sont déposées dans GenBank.

Après le nettoyage, l'analyse de l'échantillon M-CCCC1 montre que la population d'*Ochroconis* sp. 1 a diminué mais elle est toujours présente, et constitue l'OTU majoritaire (53 % des clones). La diversité fongique augmente considérablement et on peut différencier dix OTUs : sept appartiennent à la division des Ascomycota, avec des représentants de quelques uns des genres les plus fréquents dans l'air : *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Engiodontium* et *Trichoderma* ; et les OTUs *Malasseziaceae* et *Sporidiobolales* qui appartiennent à la division des Basidiomycota. Ces résultats démontrent que le nettoyage et l'application de biocides n'ont pas permis d'éliminer la population dominante d'*Ochroconis* sp. 1. Par contre, ils altèrent drastiquement le microbiota de la zone, et le rende plus favorable à la colonisation par d'autres champignons et bactéries présentes dans l'air de la grotte.

Les ADN et ARN extraits de la tache noire M1, récoltée en septembre 2010 ont été analysés. L'objectif était de déterminer parmi les communautés présentes, les communautés métaboliquement actives dans l'échantillon. Les résultats de ces analyses sont présentés dans la Figure 27.

Pour chacun des extraits (ADN et ARN) 10 OTUs sont obtenus, les cinq OTUs majoritaires au niveau génomique sont également représentés dans l'analyse de l'ARN, ce qui signifie que ces microorganismes sont métaboliquement actifs, bien que la fréquence de chacun des OTUs soit très différente dans l'analyse d'ADN et celle d'ARN. Ainsi, l'OTU majoritaire en ADN représente 45% des clones, mais il est très faiblement représenté dans l'analyse des ARNs ; l'activité métabolique de ce groupe doit être considérée comme peu importante. Au contraire, l'OTU métaboliquement actif (33%) représente uniquement 9% des clones révélés par l'analyse de l'ADN.

Les deux groupes majoritaires (ADN et ARN) appartiennent à la famille des *Herpotrichiellaceae*, et la grande majorité des OTUs de l'échantillon appartient à cette famille (61% pour l'ADN et 69% pour l'ARN). Cette famille regroupe les principaux genres de levures noires : *Exophiala* et son holomorphe *Capronia*, *Phialophora*, *Cladophialophora*, *Thysanorea* et *Cadophora*. Ce résultat souligne l'importance actuelle de ce groupe dans les taches noires de la grotte de Lascaux. Les autres OTUs métaboliquement actifs appartiennent principalement aux *Hypocreales* (*Acremonium nepalense*) et *Myxotrichaceae* (*Geomyces*), qui ont déjà été identifiés dans les profils DGGE de cet échantillon. Les autres groupes minoritaires correspondent aux *Mortierellaceae*, *Vannellidae* (amibes) et à *Scolecobasidium* sp.



**Figure 27.** Génothèque de l'échantillon de la tache noire M1, prélevée en septembre 2010 dans le Passage. Chaque OTU est identifié taxonomiquement au niveau de la famille ou de l'ordre. Les genres et espèces dont les séquences les plus proches sont déposées dans GenBank sont indiqués entre parenthèses

### 2.6.2 Isolement des champignons

Des isollements sont réalisés à partir d'échantillons prélevés le 17 février 2010 (Tableau 10) dans des taches de couleur : noire (M2), rose-violet (M3) et vert-jaune (M7). Les échantillons sont homogénéisés dans une solution stérile de Tween 80 à 0.01% et des dilutions au 1/10ème sont réalisées ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ). 100 µl de chacune des dilutions sont étalés sur un milieu à l'extrait de malt (MEA) additionné de dichloran, rose bengal et chloramphénicol (DRBCA). Les boîtes de Petri sont incubées à 15 °C pendant 2 mois, et sont examinées périodiquement. Les champignons qui se développent sont isolés dès qu'ils sont identifiables. Les isolats des champignons les plus abondants ont été conservés et le séquençage de la région ITS a été réalisé dans le but de les identifier en comparaison avec les séquences déposées dans la banque de données GenBank (Tableau 14).

*Ochroconis* sp. 1 est isolé des trois échantillons de taches analysés, indépendamment de la coloration de la tache. Ce résultat est cohérent avec les

résultats des quantifications réalisées par PCR en temps réel (Figure 15). Les levures noires sont particulièrement abondantes (*Exophiala castellanii* 94%) dans la tache de couleur rose-violet et les isolats de *Cosmospora consors* (97%) dans la tache de couleur vert-jaune.

Les résultats obtenus ont incité à réaliser un échantillonnage complémentaire en février 2011 dans l'objectif de déterminer le champignon le plus abondant, en ciblant les colonies mélanisées de croissance lente qui correspondent à *Ochroconis* spp. et aux différents types de levures noires. Des milieux de culture sélectifs sont utilisés, comme le DRBCA et l'érythritol chloramphénicol agar (ECA) (Wollenzien et al. 1995). Les échantillons ont été prélevés à partir des taches des quatre zones sélectionnées lors des campagnes d'échantillonnage précédentes (M1, M3, M6 et M8 ; Tableau 15 et Figure 13). De plus une tache noire de forme circulaire (M9), située à la base du mur droit de l'Abside est prélevée. Les résultats sont présentés dans le Tableau 15 et Figure 28.

Les échantillons analysés montrent une grande abondance et une grande diversité de champignons et de bactéries (Figure 28, A et B).

**Tableau 14.** Champignons et bactéries isolés des échantillons prélevés sur des taches colorées en février 2010.

Echantillon	Identification des champignons et bactéries <sup>a</sup>
M2. Tache noire	LX 101R1 <i>Mortierella alpina</i> 98%
	LX 101R3 <i>Acremonium nepalense</i> 96%
	LX 101R6 <i>Scolecobasidium tshawytschae</i> 85% <sup>b</sup>
	LX 101R7 <i>Scolecobasidium tshawytschae</i> 83% <sup>b</sup>
	B 101R1 <i>Pseudomonas brenneri</i> (100%)
	B 101R2 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (100%)
M3. Tache violet-rose	B 101R3 <i>Achromobacter</i> sp., <i>Collimonas</i> sp., <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> (99%)
	LX 103T1 <i>Mortierella alpina</i> 98%
	LX 103T3 <i>Geomyces pannorum</i> 99%
	LX 103T4 <i>Gliomastix murorum</i> 99%
	LX 103T5 <i>Exophiala castellanii</i> 94%
	LX 103T6 <i>Scolecobasidium tshawytschae</i> 83% <sup>b</sup>
	B 103T1 <i>Pseudomonas</i> sp. (99%) ( <i>P. fluorescens</i> , <i>P. poae</i> , <i>P. extremorientalis</i> , <i>P. trivialis</i> )
	B 103T2 <i>Rhodococcus</i> sp. (99%) ( <i>R. erythropolis</i> , <i>R. globerulus</i> )
	B 103T4 <i>Pseudomonas</i> sp. (95%) ( <i>P. lurida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. palleroniana</i> )
	B 103T5 <i>Pseudomonas</i> sp. (100%) ( <i>P. fluorescens</i> , <i>P. poae</i> , <i>P. reactans</i> ) <sup>c</sup>
M7. Tache vert-jaune	LX 107X1 <i>Penicillium</i> sp. 100%
	LX 107X4 <i>Cosmospora consors</i> 97%, <i>Volutella ciliata</i> 94%
	LX107X8 <i>Scolecobasidium tshawytschae</i> 83% <sup>b</sup>
	B 107X1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (100%)

<sup>a</sup> Identification basée sur la séquence de la région ITS et comparasson avec les séquences de GenBank.

<sup>b</sup> Cette identification de *Scolecobasidium* dans la base de données, correspond en réalité à *Ochroconis* sp. 1 (100% d'identité).

<sup>c</sup> Cette espèce bactérienne a été aussi isolée de boîtes de Petri enrichies avec de fortes concentrations de chlorure de benzalconium (12.500 mg/L).

Malgré l'utilisation de milieux sélectifs, beaucoup de boîtes sont rapidement colonisées par des bactéries résistantes aux inhibiteurs bactériens utilisés (rose bengale et chloramphénicol). Tous les échantillons analysés présentent les trois types de champignons *Ochroconis* sp. 1, levures noires et *Acremonium nepalense* à l'exception de M9, où il n'y a pas de levures noires. Les colonies d'*Ochroconis* sp. 1 sont spécialement abondantes dans les taches noires M1 (Figure 28, C) et M9. Un isolat de

l'échantillon M1 (LX M1-3), est identique à l'isolat LXCH40 (*Ochroconis* sp. 2) qui présente des caractéristiques différentes des autres isolats. C'est une deuxième souche de *Ochroconis anomala*.

Quatre types différents de levures noires ont été isolés ; *Exophiala castellanii* (94% d'homologie) présent dans les échantillons M3 et M6, est l'espèce fongique principale dans la tache rose-violet (M3) (Figure 28, D et E). *Capronia coronata* (99% d'homologie), est abondant dans l'échantillon M8 (Figure 28, F). Dans l'échantillon M1, une colonie de levure noire a été isolée. Elle a été identifiée comme *Exophiala moniliae* (96% d'homologie) ; elle est identique à un des OTUs métaboliquement actif (9% des clones d'ADN et 33% des clones d'ARN) de cet échantillon. Cette faible proportion de levures parmi les champignons isolés contraste fortement avec les résultats obtenus dans l'analyse de la génothèque de M1, où la plus part des clones appartiennent à la famille *Herpotrichiellaceae* (61% en ADN et 69% en ARN). Ces champignons sont difficiles à cultiver sur les milieux et dans les conditions utilisés. L'échantillon M6 révèle une levure noire similaire à celle de l'échantillon M8, identifiée comme *Chaetothryales* sp. 96% et *Capronia* sp. 90%. Elle est identique aux séquences obtenues représentant l'OTU majoritaire dans la génothèque de M1-ADN (45% des clones), mais représente uniquement 3% des clones obtenus dans l'analyse de l'ARN. Ces résultats démontrent la présence de différentes espèces de levures noires dans les taches de Lascaux. Les isolats obtenus doivent être mieux caractérisés au niveau morphologique afin de confirmer leur identification car les pourcentages de similitude observés laissent à penser qu'il pourrait s'agir de nouvelles espèces.

**Tableau 15.** Champignons isolés des échantillons prélevés sur les taches en février 2011.

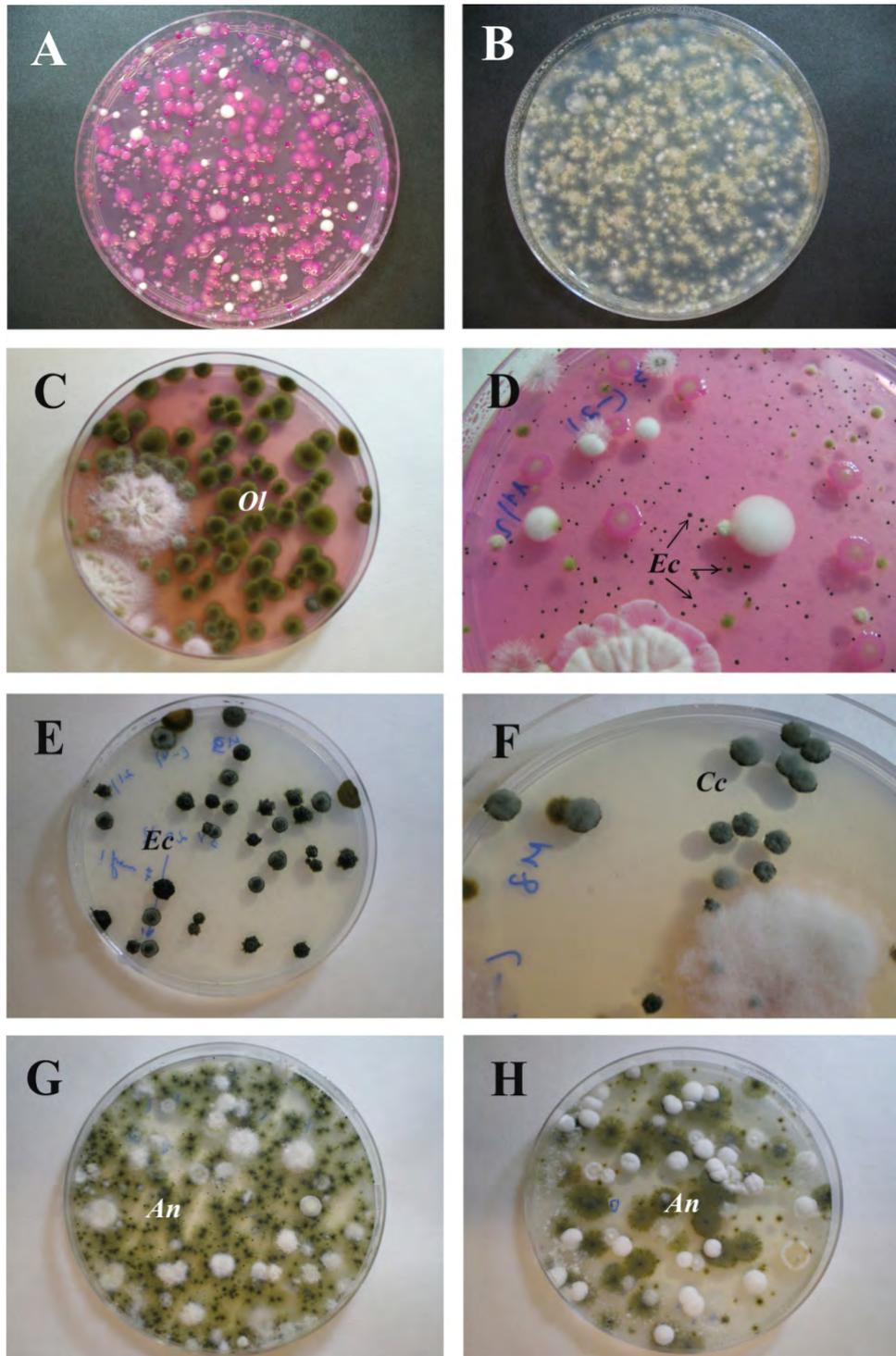
Echantillon	<i>Ochroconis</i> sp. 1 <sup>a</sup>	Levure noire <sup>a</sup>	<i>Acremonium nepalense</i> <sup>a</sup>	Isolats (Identification moléculaire) <sup>b</sup>
M1. Tache noire	+++	+	+++	LX M1-1 <i>Acremonium nepalense</i> 96% LX M1-3 <i>S. dendroides</i> 93% (couverture 37%) <sup>d</sup> LX M1-4 <i>Exophiala moniliae</i> 96%
M3. Tache violet-rose	+	+++	+	LXM3-1 <i>Mortierella alpina</i> 98% LX M3-2 <i>Scolecobasidium tshawytschae</i> 83% <sup>c</sup> LX M3-(3-8) <i>Exophiala castellanii</i> 94%
M6. Tache noire	+	++	+++	LX M6-1 <i>Doratomyces</i> sp. 99% LX M6-2 <i>Isaria farinosa</i> 100% LX M6-3 <i>Scolecobasidium tshawytschae</i> 83% <sup>c</sup> LX M6-(4-9) <i>Exophiala castellanii</i> 94% LX M6-10 <i>Acremonium nepalense</i> 96% LXM6-11 <i>Chaetothryales</i> sp. 96%, <i>Capronia</i> sp. 90%
M8. Tache noire	+	++	+	LX M8-1 <i>Acremonium nepalense</i> 96% LX M8-2 <i>Acremonium furcatum</i> 98% LX M8-(3y4) <i>Fusarium solani</i> 100% LX M8-5 <i>Scolecobasidium tshawytschae</i> 83% <sup>c</sup> LX M8-(6-9) <i>Capronia coronata</i> 99%
M9. Tache noire	++	-	+++	LX M9-1 <i>Acremonium nepalense</i> 96% LX M9-2 <i>Scolecobasidium tshawytschae</i> 83% <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Type de colonies et fréquence d'isolement : absence (-), faible présence (+), abondant (++) très abondant (+++).

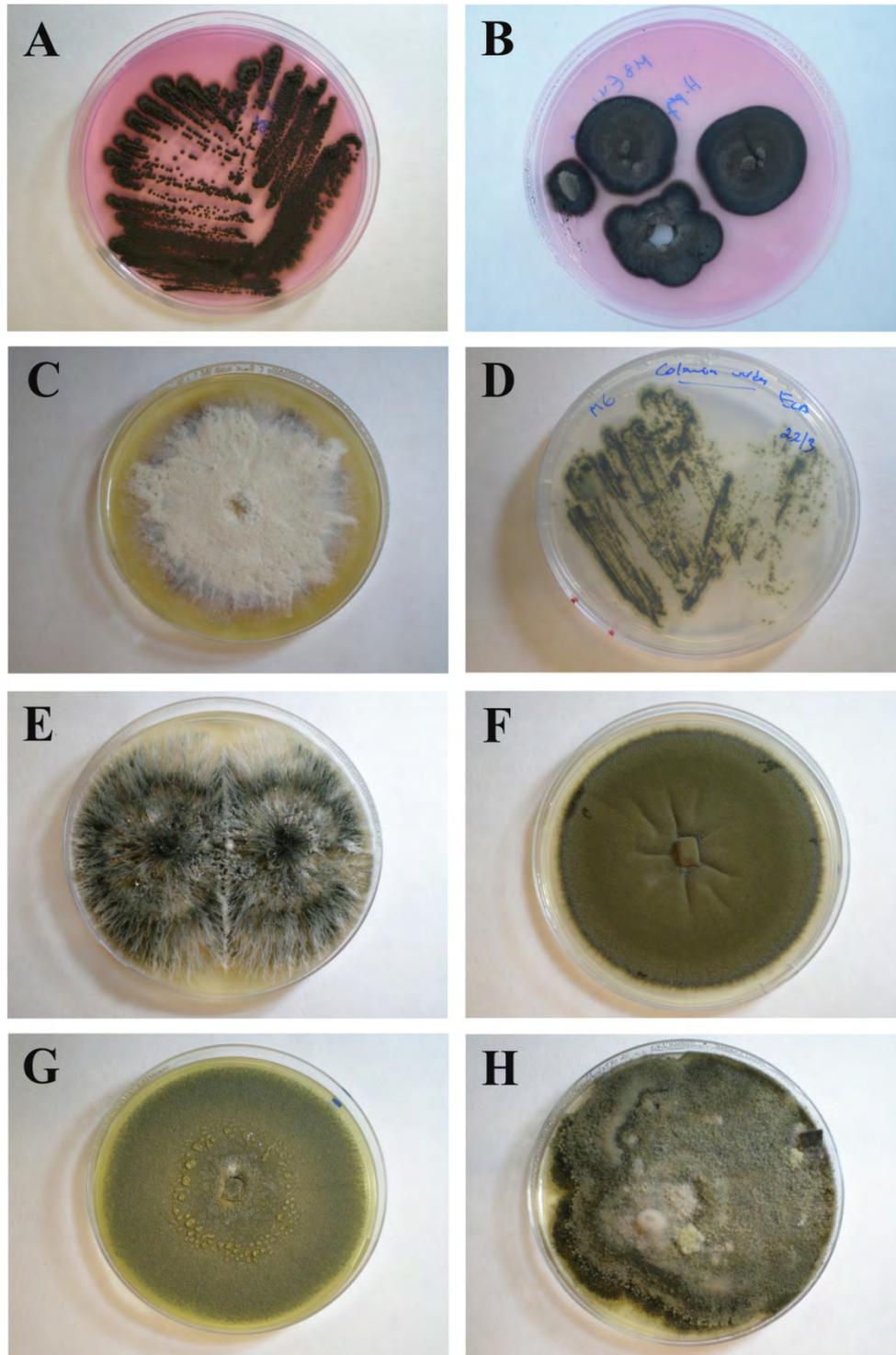
<sup>b</sup> Identification sur la base des séquences de la région ITS

<sup>c</sup> Identification : *Ochroconis* sp. 1 de Lascaux (100% d'identité).

<sup>d</sup> Identification : *Ochroconis* sp 2. de Lascaux (100% d'homologie avec LX CH40).



**Figure 28.** Isolats des échantillons de taches récoltés en février 2011. A: M6 ( $10^{-2}$ ), 10 jours sur DRBCA. B: M9 ( $10^{-1}$ ), 10 jours sur ECA. C: M1 ( $10^{-1}$ ), 45 jours sur DRBCA. D: M3 ( $10^{-2}$ ), 10 jours sur DRBCA. E: M3 et F: M8 ( $10^{-4}$ ), 45 jours sur ECA. G: M6 ( $10^{-2}$ ), 25 jours sur ECA. H: M9 ( $10^{-2}$ ), 60 jours sur ECA. Colonies caractéristiques d'*Ochroconis* sp. 1 de Lascaux (Ol), de levures noires identifiées comme *Exophiala castellanii* 94% (Ec) et *Capronia coronata* 99% (Cc), et *Acremonium nepalense* 96% (An).



**Figure 29.** Aspect des colonies des champignons mélanisés isolés de taches de la grotte de Lascaux à différents dates : levures noires sur DRBCA identifiées comme *Exophiala castellanii* 94% (A) et *Capronia coronata* 99% (B), *Acremonium nepalense* 96% sur MEA (C) et sur ECA (D), *Gliomastix* sp. sur MEA (E), *Cladosporium* sp. sur MEA (F), *Penicillium* sp. sur MEA (G) et *Alternaria* sp. sur MEA (H).

D'autres champignons abondants dans les taches étudiées ont été identifiés moléculairement comme *Acremonium nepalense* (96%). Cette identification a été confirmée par une étude morphologique. Ces champignons sont présents dans tous les échantillons et sont spécialement abondants dans les taches noires M1, M6 et M9 (Figure 28, G et H). Ces champignons ont été isolés de très nombreuses fois à partir de taches noires, mais nous ne leur avons pas prêté attention car, sur les milieux de culture utilisés, ils forment des colonies blanches (milieux MEA et DRBCA). Même les vieilles cultures sur MEA conservent une couleur blanche, ne montrant qu'une très faible mélanisation au revers de la boîte (Figure 29, C). Par contre, sur le milieu ECA, ces champignon forment des colonies mélanisées dès les premiers jours de culture et prennent une couleur vert gris caractéristique (Figure 28, G et H; Figure 29, D). L'abondance de ce champignon dans les taches M1 et M8 concorde avec les profils DGGE de ces échantillons (Figure 25) et avec les génothèques de M1 (Figure 27), dans lesquelles ce champignon représente 23% des clones pour l'ADN et 10% des clones pour l'ARN.

Dans tous les échantillons prélevés dans des taches *Mortierella alpina*, *Fusarium solani*, *Doratomyces* sp. et *Isaria farinosa*, sont isolés de manière récurrente, ils avaient déjà été signalés lors des études précédentes (Bastian et al. 2009 c).

## 2.7 Etude des protozoaires de la grotte de Lascaux

Lors des études précédentes portant sur l'analyse de la flore bactérienne (Bastian et al. 2009b), 45% des 696 clones bactériens obtenus correspondaient à des phylotypes incluant des bactéries pathogènes (Tableau 16). Parmi ceux-ci les genres *Legionella*, *Afipia*, *Aquicella*, etc. correspondent à des bactéries qui parasitent des amibes libres. Ces résultats nous ont incités à rechercher et à identifier les protozoaires présents dans les sédiments prélevés dans les différents compartiments de la grotte.

**Tableau 16.** Phylotypes bactériens les plus représentés dans la grotte de Lascaux

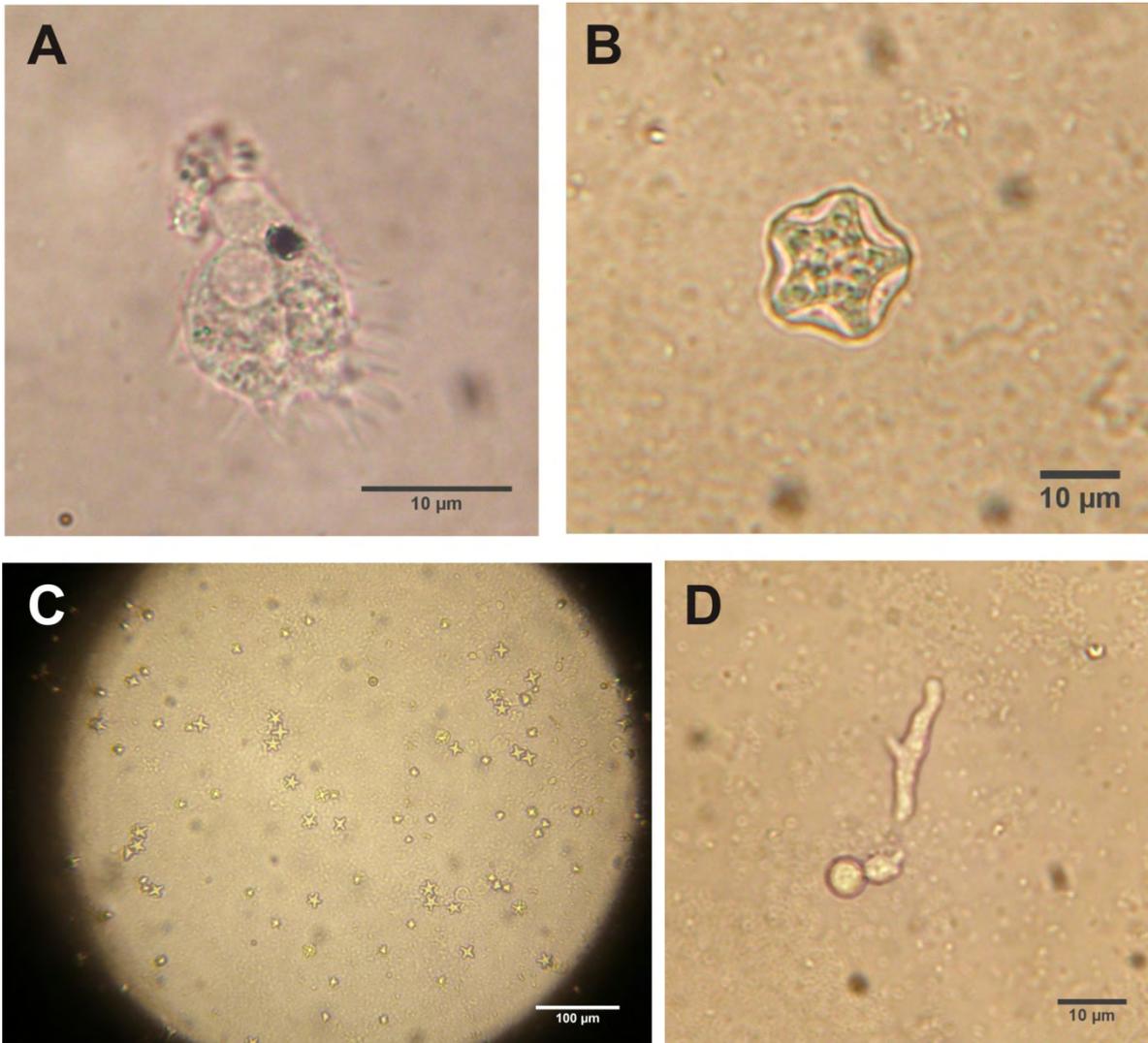
Séquence représentative	Taxon plus proche	Numéro d'accèsion	Similarity (%)	Total N° of clones (%)
S 5-78	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	EU770633	99	77 (11,1)
S 5-88	<i>Ralstonia pickettii</i>	EU770634	99	47 (6,8)
S 27-149	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	EU770637	99	35 (5,0)
S 5-49	<i>Escherichia coli</i>	EU770632	99	26 (3,7)
S 1-2	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	EU770631	99	26 (3,7)
S 5-117	<i>Pseudomonas lanceolata</i>	EU770635	99	26 (3,7)
S 2-61	<b><i>Afipia</i> spp.</b>	EU789899	99	22 (3,1)
S 2-6	<b><i>Legionella</i> spp.</b>	EU789859	96	19 (2,7)
S 4-121	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	EU790045	99	13 (1,9)
S 26-17	<b><i>Aquicella</i> spp.</b>	EU790294	97	10 (1,4)
S3-35	<i>Inquilinus</i> spp.	EU789932	98	4 (0,6)
S 1-36	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	EU789833	99	5 (0,7)
S 4-143	<i>Escherichia albertii</i>	EU790059	98	2 (0,3)
S 4-48	<i>Bordetella ansorpii</i>	EU789995	97	1 (0,1)
S 15-8	<i>Sighella sonnei</i>	EU790222	99	1 (0,1)

Trois échantillons de sédiments récoltés le 29 septembre 2010, S-1 et S-2, prélevés dans le Passage et DF dans la Chambre des Félines ont été analysés. Les échantillons sont mis en suspension dans 800 ml de solution de Neff et Band modifiée (Page, 1967 a) filtrés puis inoculés dans un milieu agar non nutritif (ANN) et sont incubés à 28 °C. Toutes les 36-48 heures, les boîtes sont examinées pour observé la croissance des amibes grâce à un microscope inversé. Pour les isoler et les maintenir en culture on utilise le milieu non nutritif (ANN) sur lequel sont incubés des *Escherichia coli* (ANNE), à 28, 37 et 42 °C. Les méthodes d'isolement, le test de formation de flagelles sont réalisées comme décrit dans Page (1967 a, b). Pour l'identification des

espèces d'amibes, il est nécessaire d'observer les différentes phases du cycle biologique de chaque espèce : les "trophozoite" correspondant à la phase végétative et kystes correspondant à la phase de résistance. Les observations "in vivo" des trophozoites sont réalisées selon la technique de la goutte pendante à partir d'une suspension d'amibes dans une solution de Neff et Band modifiée. Les principales caractéristiques considérées sont : la taille, le type de mouvement, le type de pseudopodes, la vitesse de déplacement des trophozoites. Pour les kystes, on considère la taille, l'aspect des parois, la présence de pores, le nombre de noyaux et le nombre de branches pour les espèces polygonales ou étoilées. De plus, des observations microscopiques avec la coloration PAS (Acide périodique, Schiff), permettent de mettre en évidence les polysaccharides. Les préparations sont réalisées en mettant le porte-objet dégraissé au contact direct des cultures. Des cultures jeunes de trois jours maximum sont utilisées pour l'étude des trophozoïtes et les kystes sont observés sur des cultures âgées totalement enkystées.

Les observations directes ont permis l'identification des genres *Acanthamoeba* et *Hartmannella* dans l'échantillon S-1. Les échantillons S-2 étaient trop contaminés par des champignons pour permettre l'observation des amibes. L'échantillon DF présentait aussi des amibes des genres *Acanthamoeba* et *Hartmannella*, mais avec des caractéristiques différentes des amibes isolées de S-1.

Dans l'échantillon S-1, *Acanthamoeba* sp. est facilement identifiable par ses caractéristiques morphologiques. Les trophozoïtes produisent des pseudopodes fins, parfois bifurqués, dont l'extrémité est arrondie ou pointue (Figure 30, A). Ils possèdent un seul noyau, de diamètre 4  $\mu\text{m}$  et une membrane nucléaire bien délimité. Le cytoplasme granulaire contient en général une unique vacuole pulsatile et de nombreuses vacuoles alimentaires. La taille, des trophozoïtes est de 25-15  $\mu\text{m}$  de long et de 15-9  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ils présentent un mouvement rampant, la vitesse moyenne de locomotion est de 21,2  $\mu\text{m}/\text{min}$ .



**Figure 30.** A. Echantillon S-1: trophozoïte d'*Acanthamoeba astronyxis* avec pseudopodes. B. Kyste à 5 branches d'*Acanthamoeba astronyxis*. C. Kystes d'*Acanthamoeba astronyxis* dans une boîte. D. Trophozoïtes et kystes de *Hartmannella vermiforme*.

Les kystes observés possèdent une double paroi, qui sépare l'exorcyste de l'endocyste. L'exorcyste est plutôt gros et il a un contour plus ou moins lisse. L'endocyste présente une forme caractéristique d'étoile. Le nombre de branches oscille entre 3 et 6, (Figure 30, B et C). Le cytoplasme du kyste est granuleux, avec noyau facile à distinguer. La taille du kyste varie de 21-14  $\mu\text{m}$  de long et 19-13  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les kystes sont capables de se rester viables pendant plusieurs mois à 28 °C.

Cette amibe est capable de se développer en milieu ANN et ANNE à 28, 37 et 42°C, et se présente sous forme enkystée à la température de 42°C.

Les caractères des trophozoïtes et des kystes permettent d'identifier cette amibe comme appartenant à l'espèce *Acanthamoeba astronyxis* (Pussard et Pons, 1977)

caractérisée par de grands trophozoïtes ( $> / = 18 \mu\text{m}$ ), avec des exocystes lisses et des endocystes étoilés (Page, 1967 b; Visvesvara, 1991).

*Hartmannella* sp. a également identifié dans l'échantillon S-1. Les trophozoïtes sont monopodiaux avec une forme allongée et cylindrique (Figure 30, D). L'extrémité antérieure est hémisphérique et généralement de la même taille que le reste du corps, de couleur hyaline. L'extrémité postérieure est aplatie, sans la présence de filaments. La zone exoplasmique antérieure présente généralement une longueur égale au diamètre. Le mouvement se réalise par un flux cytoplasmique continu, sans que se produise de flux éruptif. Le changement de direction se fait par apparition d'un pseudopode latéral qui génère une forme caractéristique en "Y", ou même un angle de  $180^\circ$ , avec formation d'un pseudopode dans la partie opposée à la direction du mouvement. Le noyau se trouve à la limite de l'endoplasme et de l'ectoplasme. Des vacuoles contractiles (généralement une seule) sont visibles à l'extrémité postérieure de l'endoplasme, avec un diamètre de 3 à  $4 \mu\text{m}$ . La taille moyenne des trophozoïtes est de  $10,3 \mu\text{m}$  de longueur ( $7-20 \mu\text{m}$ ) et  $2,48$  de diamètre, avec très peu de variabilité entre individus. La relation longueur/diamètre est de  $4,34 \mu\text{m}$ . La vitesse de locomotion moyenne est de  $17 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $5-30 \mu\text{m}/\text{min}$ ), et la trajectoire est le plus souvent constante.

Les kystes de cette amibe sont peu caractéristiques. Ils ont une forme circulaire ou légèrement ovoïde et possèdent une paroi lisse, ou en général se peuvent différencier dans la couche externe de l'interne. La paroi du kyste a donné une réaction PAS positive. Le contenu du kyste est granuleux et le noyau n'est pas toujours visible. Ses dimensions moyennes sont de  $6,05 \mu\text{m}$  de long et  $5,51 \mu\text{m}$  de diamètre. L'enkystement est rapide; dès 24 heures après l'inoculation et presque toute la population se trouve enkystée. Le désenkystement peut être provoqué en lavant la culture avec une solution de Neff et Band modifiée et en réalisant une inoculation sur une culture fraîche. Son isolement a été réalisé à  $28^\circ\text{C}$ , et les températures de  $37$  et  $42^\circ\text{C}$  ne permettent pas son développement.

La description de Page (1976) pour le genre *Hartmannella* correspond aux caractéristiques de la souche étudiée et identifiée comme *H. vermiformis*. L'analyse moléculaire d'une région du gène 18S de l'ARNr de cette amibe, permet de confirmer cette identification (100% de similitude).

L'échantillon de la Chambre des Félics (DF) présente des trophozoïtes et des kystes du genre *Hartmannella* mais qui présentent différentes tailles, ce qui suggère la présence de deux espèces différentes. Des kystes d'*Acanthamoeba* sp. qui ne présentent pas la forme étoilée, ont été observés, ce qui indique la présence d'une espèce différente de celle isolée de l'échantillon S-1.

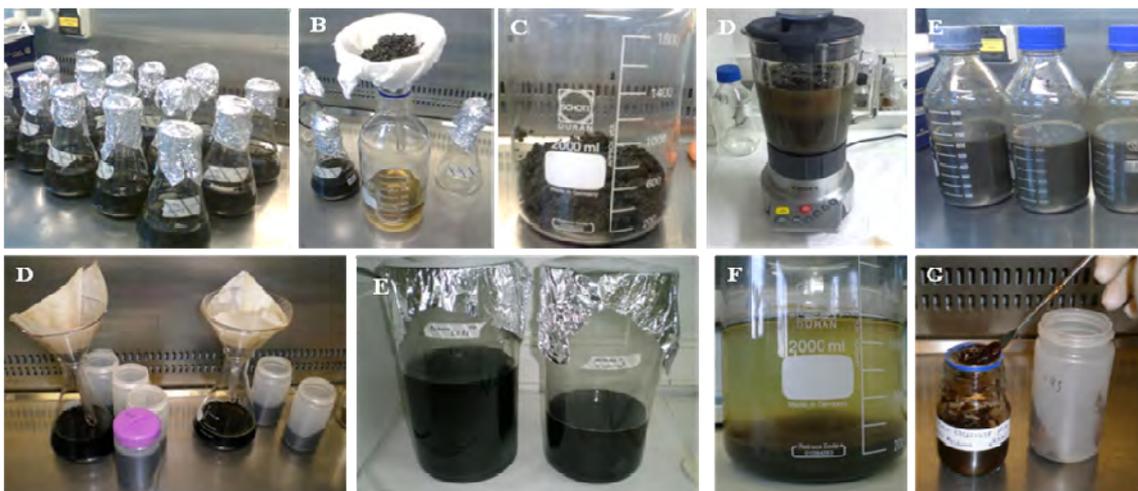
La présence simultanée de *Legionella* spp., *Afipia* spp. et *Aquicella* spp. dans quelques unes des salles de la grotte (Bastian et al., 2009b), et l'identification d'*A. astronyxis* et *H. vermiformis*, démontrent l'étroite relation existant entre les pathogènes bactériens et les amibes libres de la grotte de Lascaux.



# 3. Étude de la nature biochimique des taches noires (mélanine)

## 3.1 Extraction de mélanine d'*Ochroconis* spp.

L'extraction de la mélanine produite par différentes souches d'*Ochroconis* a été réalisée à partir des souches LX A1 et LX CH16 de la grotte de Lascaux, et des souches de référence *O. tshawytschae* et *O. anellii*. Le protocole d'extraction est illustré dans la Figure 30. Les isolats sont cultivés dans 2.25 L de milieu ME dans des Erlenmeyer de 250 ml, chaque fiole est inoculée avec 2 ml de suspension de mycélium. Les fioles sont incubées à 22°C sous agitation (150 rpm) pendant 3 à 4 semaines. La biomasse obtenue (200-400 mg de poids frais) est filtrée sur une double gaze et homogénéisée avec de l'eau distillé dans un mixeur Krups (5 minutes à vitesse maximale). Pour l'extraction, NaOH (5 M) est ajouté pour atteindre une concentration de 0.5M dans le mélange. Après agitation par retournement pendant 24 h, la suspension est centrifugée à 5000 rpm pendant 5 minutes puis filtrée : le surnageant contient la mélanine. Le culot est remis en suspension avec NaOH 0.5M. Le procédé d'extraction est ainsi répété 7 fois (Figure 31).



**Figure 31.** Protocole d'extraction de la mélanine produite par les isolats de *Ochroconis* spp.: **A** culture en milieu liquide ME, **B** filtration du mycélium, **C** homogénéisation dans de l'eau distillée stérile, **E** extraction avec NaOH, **D** centrifugation et filtration du surnageant, **E** et **F** précipitation de la mélanine avec HCl, **G** centrifugation et récupération du culot.

Les surnageants obtenus sont acidifiés avec HCl 12N jusqu'à pH = 2 et stockés jusqu'à précipitation totale de la mélanine. Le culot obtenu est lavé deux fois avec de l'eau distillée et conservé à -20°C jusqu'à la prochaine étape. A posteriori, pour éliminer les ions chlorure des échantillons, une dialyse est réalisée, pendant 5 jours, par lavages successifs avec de l'eau distillée. Pour finir, la mélanine est séchée à 30°C et conservée à température ambiante jusqu'à analyse.

### 3.2 Spectroscopie Raman de surface améliorée (surface enhanced Raman spectroscopy SERS)

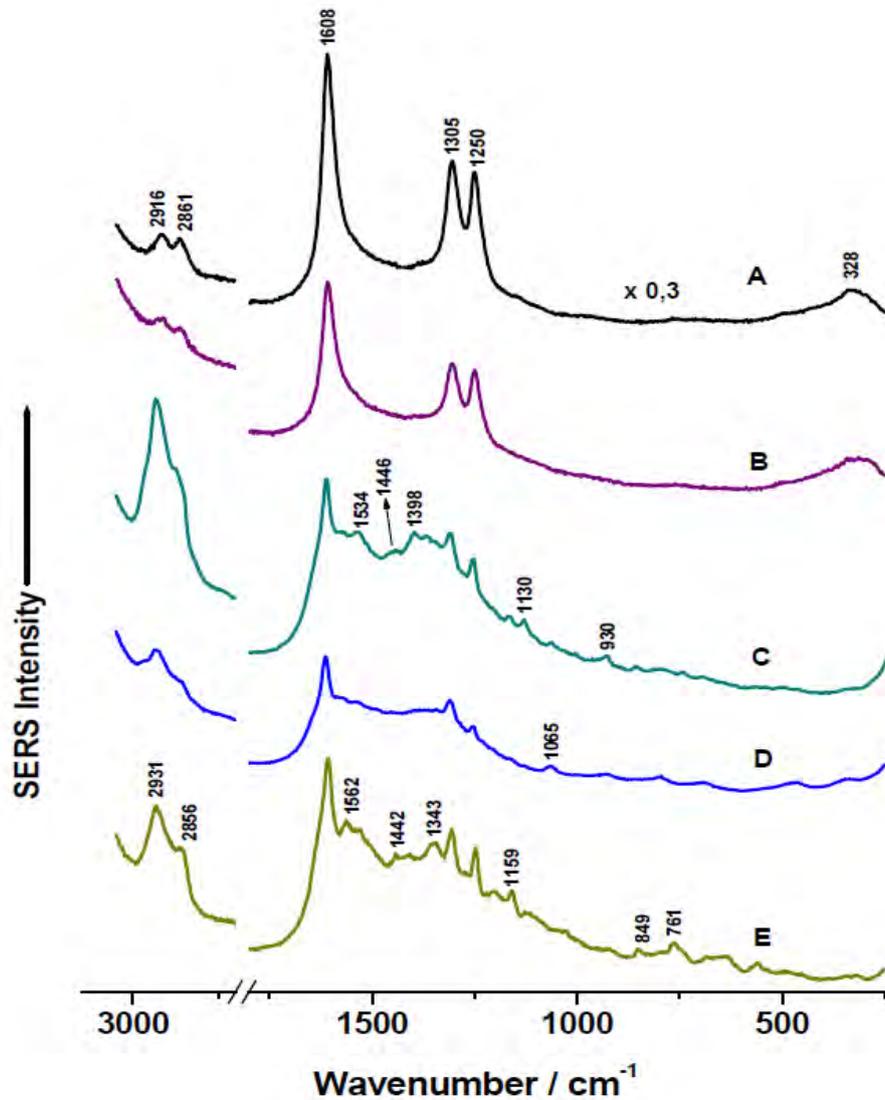
Ces échantillons, ainsi que la mélanine extraite d'*Ochroconis* ont été analysés en utilisant la technique Raman améliorée (SERS). Cette technique, très sensible, est basée sur l'intensification de la diffusion Raman d'une molécule adsorbée sur une surface métallique rugueuse. La technique SERS permet de réduire l'émission de fluorescence émise par des échantillons très fluorescents et ainsi d'obtenir des spectres Raman. Cette atténuation est due à un transfert d'énergie qui se produit entre l'état excité de la molécule et une surface métallique nanostructurée ou sous forme de nanoparticules. Le facteur d'amélioration est de l'ordre de  $10^{14}$ - $10^{15}$ , ce rend cette technique suffisamment sensible pour détecter une seule macromolécule. Cette méthode a été appliquée avec succès pour caractériser des macromolécules d'origine naturelle comme les acides humiques du sol (Sanchez-Cortes et al. 2006). Cette technique a donc été employée pour caractériser le chromophore de la mélanine ou les macromolécules associées aux taches de couleur noire.

Le spectre de la mélanine d'*Ochroconis* (Figure 32 A-B) présente trois pics bien marqués à 1608, 1305 et 1250  $\text{cm}^{-1}$ , attribuées aux vibrations d'étirement de C = C, C=O et C-C dans les hydrocarbures aromatiques polycycliques, ainsi qu'aux liaisons C-O des poly phénols.

Le spectre SERS des taches noires est caractérisé par la présence de trois pics dans la région des 1600, 1300 et 1250  $\text{cm}^{-1}$ , qui peuvent être attribués au noyau poly aromatique de la mélanine (Figure 32). Ces pics peuvent être considérés comme des marqueurs de la présence de la mélanine d'*Ochroconis*. L'analyse de taches noires directement prélevées sur les parois de la grotte montre ces trois pics caractéristiques, ce qui suggère que la mélanine fongique contribue à la coloration de ces taches.

Le spectre SERS de cette mélanine est différent de celui obtenu par Centeno et Shamir (2008) pour la mélanine de sèche. Les mélanines fongiques sont généralement synthétisées par polymérisation des phénols, alors que chez la sèche elle provient de la polymérisation du 5,6-dihydroxyindole. D'autres mélanines fongiques produites par *Aspergillus niger* et *Stachybotrys chartarum* (Saiz-Jimenez et al. 1995), montrent différents spectres SERS (non présentés).

De plus, les spectres SERS des taches noires (Figure 32 C-E) montrent des pics à 1440-1470  $\text{cm}^{-1}$  et 1370-1380  $\text{cm}^{-1}$ , qui peuvent être respectivement attribués à des chaînes aliphatiques et carboxyl, indiquant la présence d'acides gras.

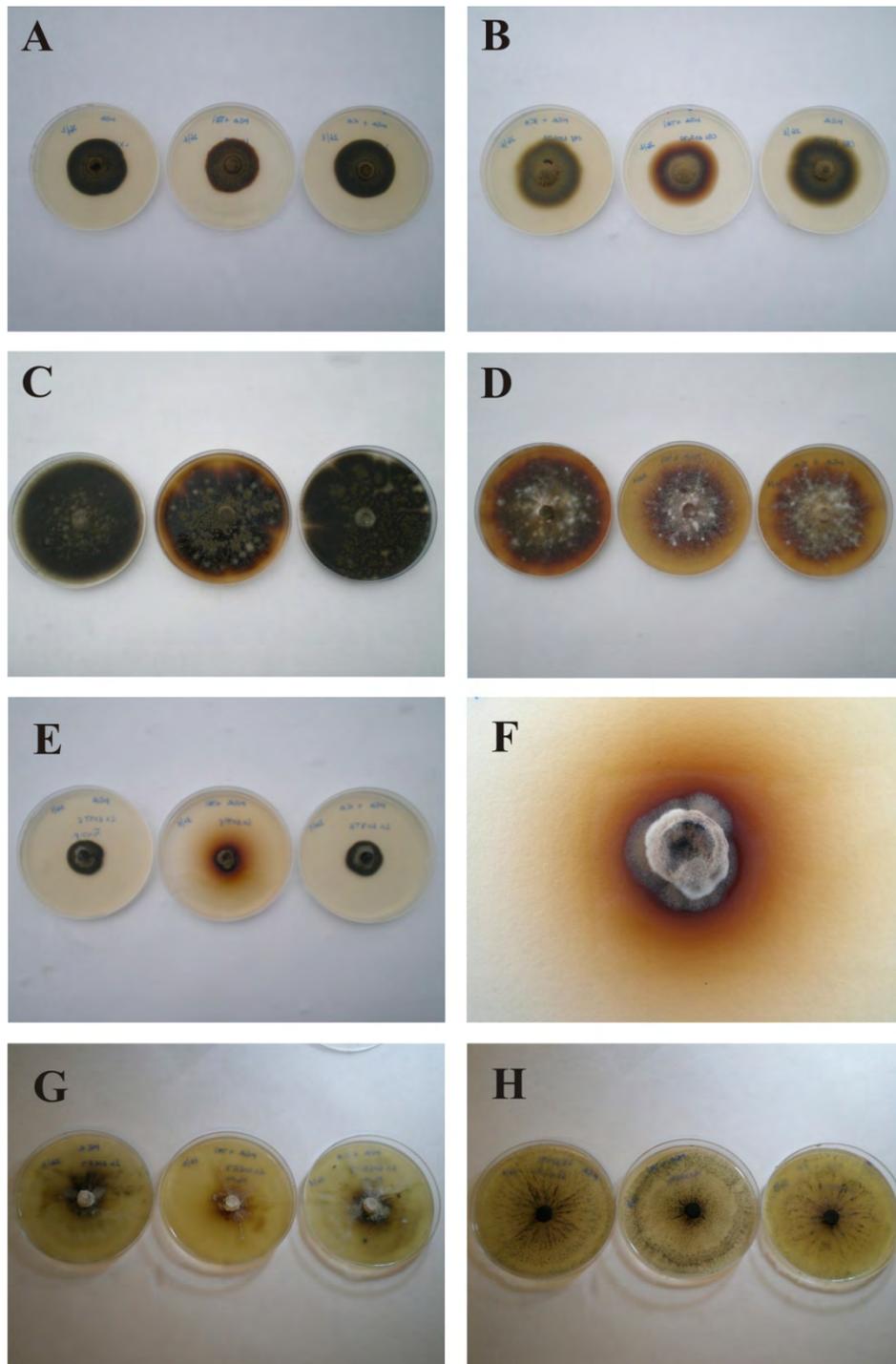


**Figure 32.** Spectres SERS des échantillons : **A** mélanine d'*Ochroconis* sp.1, souche LXA1; **B** mélanines d'*Ochroconis tshawytschae*, souche CBS100438T ; **C** tache noire de la Salle des Taureaux prélevée en août 2008 ; **D** tache noire du Diverticule Axial, prélevée en août 2008 ; **E** tache noire de la Nef prélevée en octobre 2009.

### 3.3 Test d'inhibition de synthèse de mélanine

Pour caractériser le type de mélanine produite, les champignons isolés de la grotte de Lascaux, sont cultivés en boîtes de Petri sur le milieu MEA additionné (30 mg/L) d'inhibiteurs de la synthèse de la mélanine. Deux produits ont été utilisés : le tricyclazole qui inhibe la synthèse de la mélanine ayant pour précurseur le 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN), et l'acide kojique qui inhibe la formation de la mélanine ayant pour précurseur de la 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) (Suryanarayanan et al. 2004).

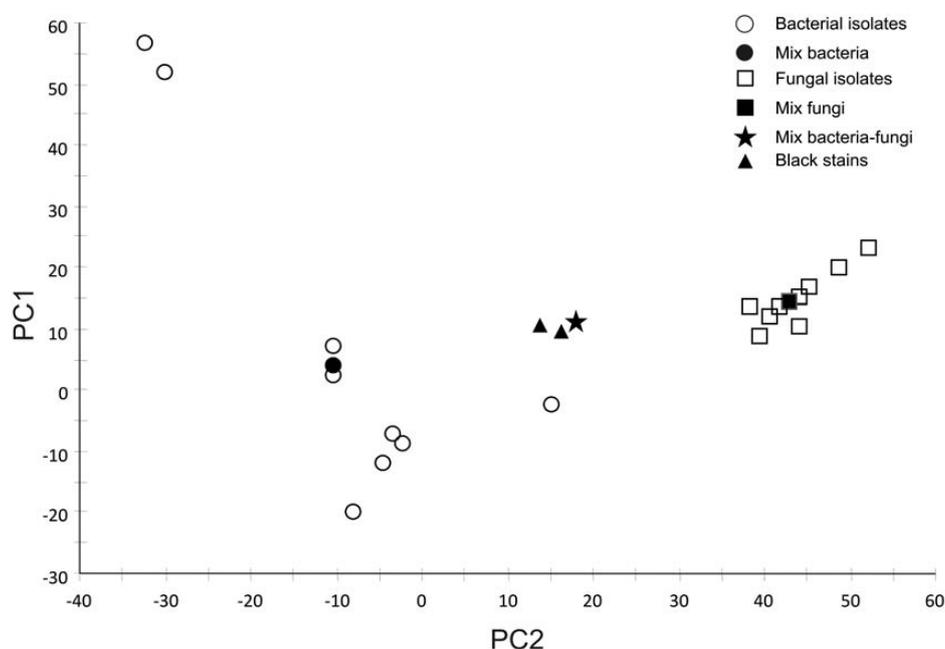
Six souches de champignons de la grotte de Lascaux sont utilisées : *Ochroconis* sp. 1, *Epicoccum nigrum*, *Exophiala* sp. (*E. castellanii* 94%), *Acremonium nepalense*, et *Gliomastix murorum*. Comme le montre la Figure 33, aucun des champignons n'est sensible aux inhibiteurs, ce qui montre que les mélanines produites par ces champignons n'ont pas pour précurseur le DHN ou la DOPA. On peut noter que les colonies d'*Exophiala* sp. en présence de tricyclazole produisent un pigment qui diffuse dans le milieu de culture (Figure 33E et F). Il faut noter que les colonies d'*A. nepalense* et *G. murorum* mélanisent très faiblement après 75 jours de culture (Figure 33 G et H).



**Figure 33.** Test d'inhibition de la synthèse de mélanine par différents champignons. Témoin sur milieu MEA sans inhibiteur (gauche), MEA avec inhibiteur de mélanine DHN (tricyclazole, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (centre) et MEA avec inhibiteur de mélanine DOPA (Kojic acide, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (droite). **A.** *Ochroconis* sp. 1, 36 jours. **B.** *Ochroconis tshawytschae* CBS100438T, 36 jours. **C.** *Cladosporium* sp. 36 jours. **D.** *Epicoccum nigrum*, 36 jours. **E.** *Exophiala* sp., 36 jours, **F** détail du pigment produit qui diffuse en présence de tricyclazole. **G.** *Acremonium nepalense*, 75 jours. **H.** *Gliomastix murorum*, 75 jours.

### 3.4 Analyse des acides gras

La composition en acides gras des taches noires, des isolats bactériens et des champignons de la grotte de Lascaux a été déterminée. Les résultats analysés par ACP (analyse en composantes principales) montrent que les acides gras de 9 bactéries et 9 champignons sont clairement séparés en deux groupes différents (Figure 34). Les acides gras des taches noires sont également groupés, séparément des bactéries et des champignons. Le mélange des 9 bactéries ou des 9 champignons sont également groupés dans des ensembles différents. Mais le mélange des dix-huit microorganismes se localise avec l'ensemble formé par les taches noires, confirmant que les acides gras des taches noires sont constitués des acides gras d'un mélange des champignons et bactéries.



**Figure 34.** Analyse des composantes principales des profils des acides gras. Sont comprises deux échantillons de taches noires (sec et humide) récoltés en juillet 2008; neuf souches des bactéries des genres *Agrobacterium*, *Ochrobactrum*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Achromobacter* et *Pseudomonas*; et neuf souches de champignons des genres *Ochroconis*, *Acremonium*, *Geomyces*, *Exophiala*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Isaria*, *Cosmospora* et *Gliocladium*. Aussi se sont analysées des mélanges des souches bactériennes, des souches fongiques, et des bactéries et champignons ensemble.

## 4. Rôle des collemboles dans la dispersion des taches noires de la grotte de Lascaux

Au cours des dernières années, *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) a été observé à proximité des taches noires (Figure 35). *Folsomia candida* est un collembole cosmopolite, opportuniste, il a un comportement cavernicole facultatif, qui normalement accomplit la totalité de son cycle dans les grottes, mais qui n'est pas strictement confiné à cet habitat. Il est présent dans les grottes du monde entier (Palacios-Vargas, 2002). Il est généralement admis que ce collembole colonise les grottes qui ne sont pas occupées par des espèces mieux adaptées à la vie cavernicole, mais aussi dans des grottes artificielles ou des grottes naturelles perturbée, comme c'est ici le cas. Au niveau moléculaire ce sont deux espèces de collemboles *F. candida* et *Hypogastrura* sp. qui ont été identifiées dans la grotte, mais aucun spécimen vivant de cette seconde espèce n'ont été capturés (Bastian et al. 2009c).



**Figure 35.** Tache noire de l'Abside, montrant de nombreux individus de *Folsomia candida*.

Le collembole *F. candida* et les deux champignons les plus représentatifs de Lascaux (*Fusarium solani* et *Ochroconis* sp. 1) ont été utilisés pour répondre aux questions suivantes :

*F. candida* montre-t-il des préférences alimentaires vis-à-vis de l'une ou l'autre de ces deux espèces fongiques ?

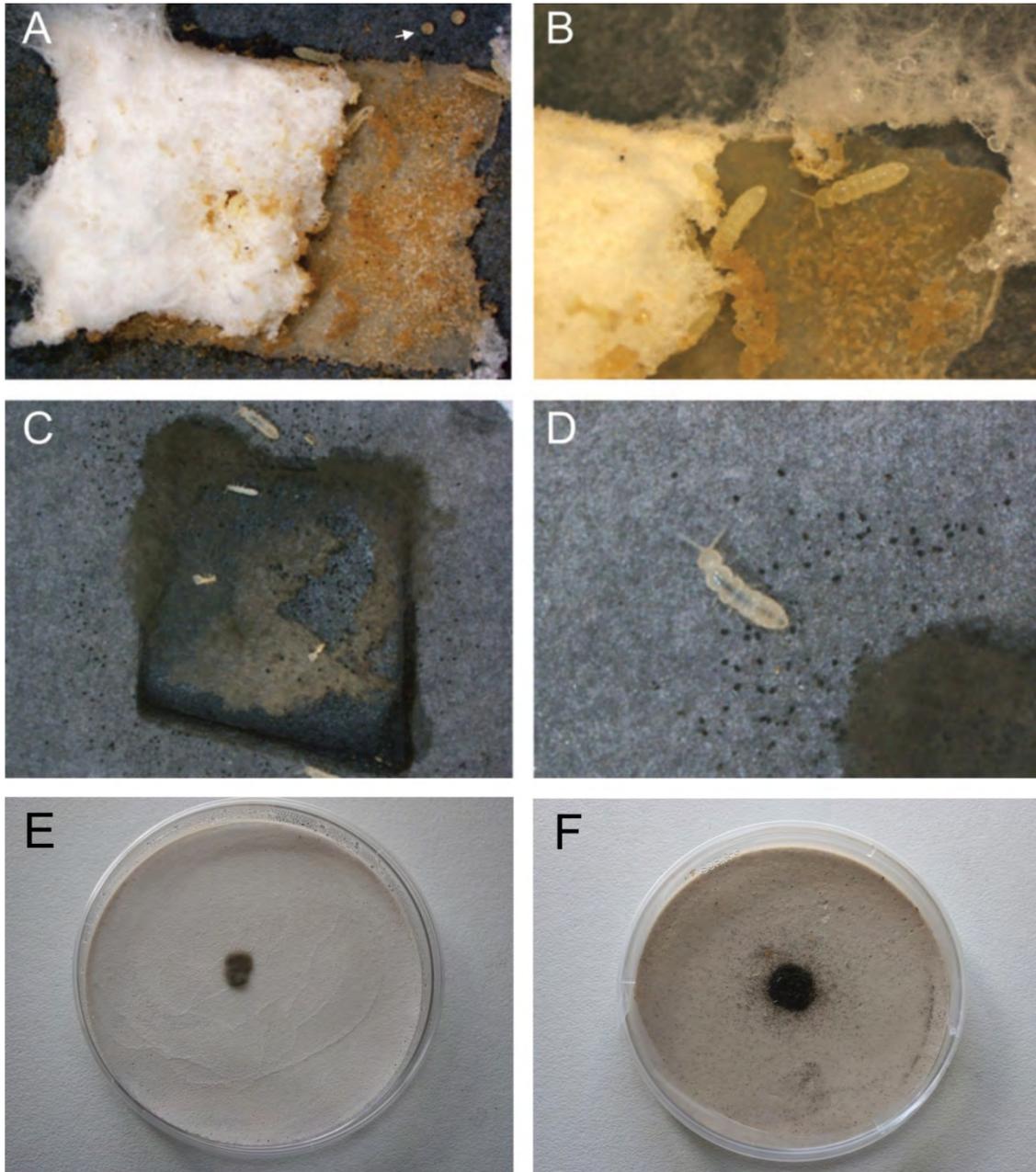
*F. candida* joue-t-il un rôle dans la dispersion des champignons qu'il consomme ?

Des spécimens vivants de *F. candida* ont été collectés dans la grotte Gombasecka en Slovaquie. Trente individus sont placés en boîtes de Petri en présence d'une culture de *F. solani* ou d'une culture d'*Ochroconis* sp. 1, déposée sur des sédiments de la grotte ou du gypse (plâtre de Paris). Après 24h, tous les individus dans les boîtes contenant le gypse étaient en train de s'alimenter à partir du mycélium de *F. solani*, mais dans les boîtes avec des sédiments, la majorité des individus observés se trouve à proximité de *Fusarium* bien que des signes visibles d'alimentation aient été observés.

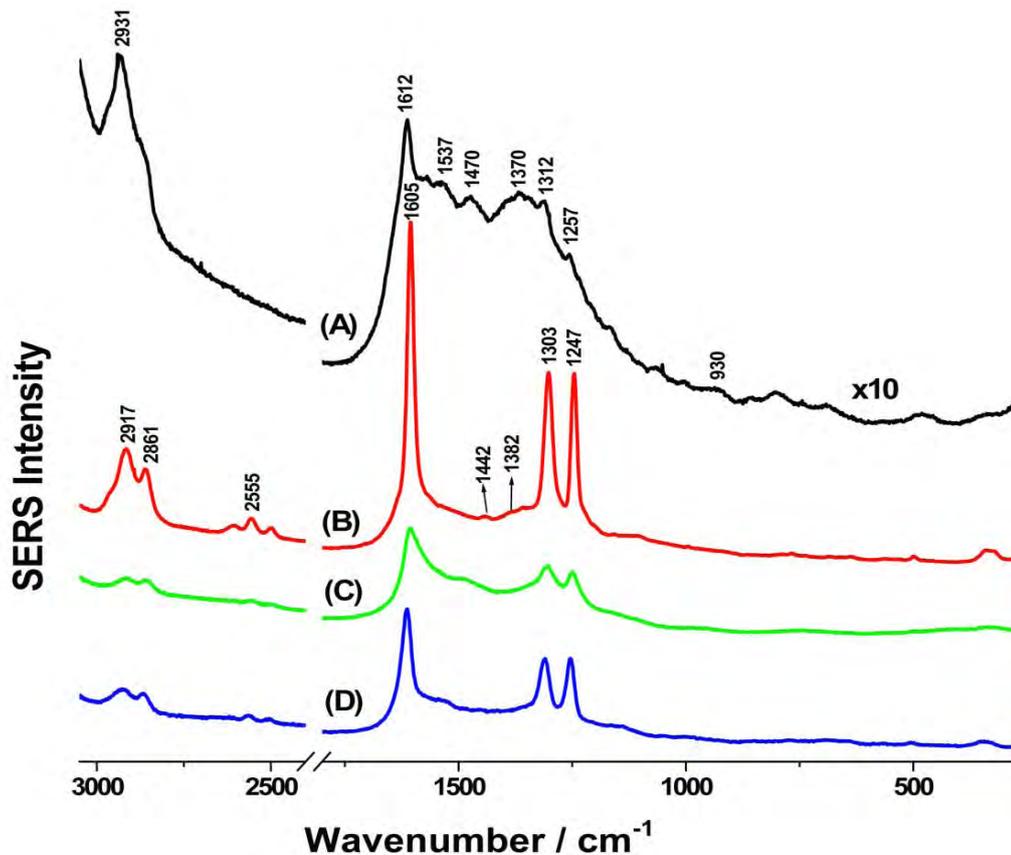
Après 10 jours, une forte consommation de champignon est observée, spécialement dans le cas de *Fusarium*, et des œufs de *Folsomia* sont visibles (Figure 36 A). Après 20 jours d'incubation, plus d'un tiers du mycélium de *Fusarium* est consommé (Figure 36 B). Le mycélium d'*Ochroconis* a également été consommé par le collembole, quel que soit le substrat utilisé, sédiment de grotte ou gypse (Figure 36 C).

Ces résultats montrent que les deux espèces fongiques associées aux crises les plus importantes de ces dernières années peuvent servir de nourriture à *F. candida*. Actuellement, la présence limitée de *F. solani* dans la grotte et l'abondance d'*Ochroconis* suggère que *F. candida* a été obligé de modifier ses préférences alimentaires de *F. solani* vers *Ochroconis* sp. 1.

Au laboratoire, comme dans la grotte, *F. candida* s'alimente à partir des champignons associés aux taches noires. Dans les deux cas *F. candida* produit des pelotes fécales noires qui sont disséminées comme le montre la Figure 36 D. Les pelotes fécales contiennent des conidies qui sont capables de germer lorsqu'elles sont déposées sur une surface humide. Ces observations rejoignent celles de Sawahata (2006) qui a observé une production importante de pelotes fécales lorsque les collemboles consomment l'hyménium des fructifications d'Agaric.

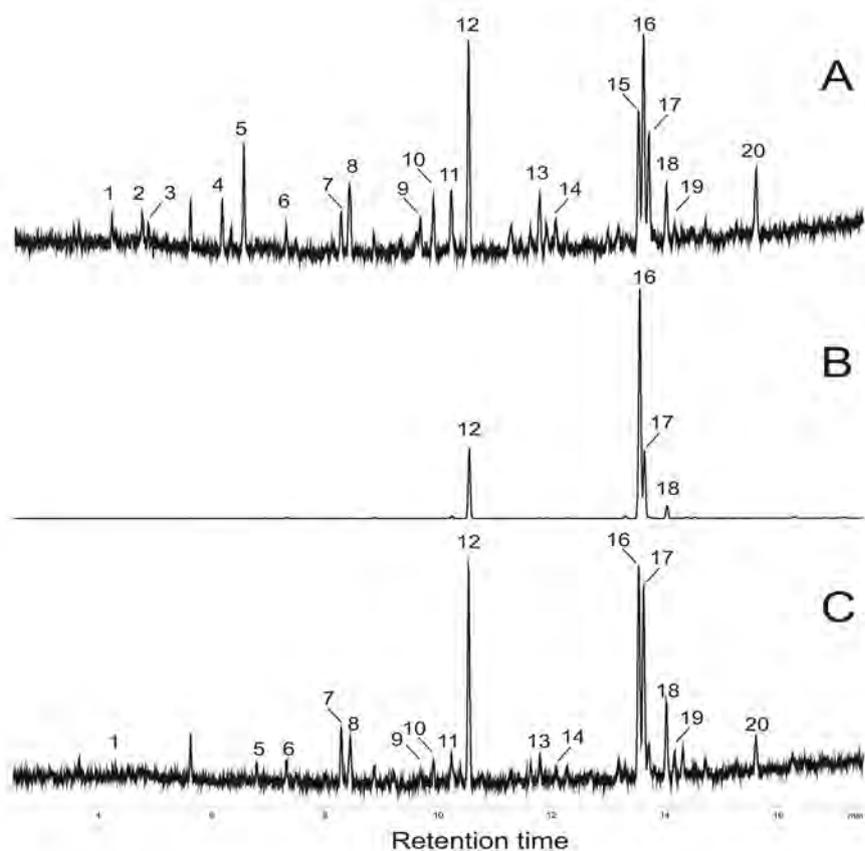


**Figure 36.** Individus de *Folsomia candida* s'alimentant sur des colonies des deux principaux champignons observés à Lascaux. Dans une culture de *Fusarium solani* sur plâtre, des œufs sont visibles (A et B). Sur une culture d'*Ochroconis* sp. 1 dans un microcosme de sédiment de la grotte (C et D). On peut observer la dispersion des excréments des collemboles et le tractus digestif noirci par la consommation de mélanine du champignon. Culture d'*Ochroconis* sp. 1, sur gypse, avant introduction de *Folsomia candida* (E) et 2 mois après l'introduction (F) ; les pelotes fécales de *Folsomia candida* ont été dispersé à la surface du gypse reproduisant le phénomène de transport et de dispersion des taches noires observés sur les parois de la grotte.



**Figure 37.** Spectres SERS des échantillons : (A) tache noire de la Salle des Taureaux août 2008; (B) tache noire avec grande abondance de collemboles, Diverticule Axial, octobre 2009; (C) mélanine d'*Ochroconis* sp. 1 hydrolysée (HCl 6 N) pendant 12 heures, et (D) excréments de *Folsomia candida* nourris en laboratoire avec *Ochroconis* sp. 1.

Le spectre SERS des pelotes fécales de *F. candida*, nourri en boîte de Petri sur *Ochroconis* sp. 1 montre les trois bandes caractéristiques de la mélanine d'*Ochroconis* sp.1 (Fig. 37 D). De même, les spectres SERS de taches noires très colonisées par des collemboles (Figure 37 B) sont identiques à ceux qui caractérisent la mélanine d'*Ochroconis* (Figure 37 C). Ceci est une conséquence de l'ingestion d'*Ochroconis* par les collemboles qui digèrent les polysaccharides et les protéines du champignon, mais pas la mélanine. Le mycélium d'*Ochroconis* est vraisemblablement digéré dans l'intestin du collembole, d'une manière analogue à celle décrite pour la larve de coléoptères consommant de l'humus. Ces larves digèrent les polysaccharides et les peptides mais pas les composés aromatiques (Li et al. 2005).



**Figure 38.** Chromatogrammes des acides gras. (A) une tache noire du Passage, 2010, (B) mélanine d'*Ochroconis* sp. 1, et (C) des excréments de *Folsomia candida* nourris avec mycélium d'*Ochroconis* sp. 1. Identification des pics: 1. 10:0 3OH; 2. 12:0; 3. 11:0 iso 3OH; 4. 12:0 2OH; 5. 12:0 3OH; 6. 14:0; 7. 15:0 iso; 8. 15:0 anteiso; 9. 16:1 iso; 10. 16:0 iso; 11. 16:1 iso I/14:0 3OH; 12. 16:0; 13. 17:0 anteiso; 14. 17:0 cyclo; 15. 18:2 w6,9c/18:0 anteiso; 16. 18:1 w9c; 17. 18:1 w7c; 18. 18:0; 19. 11 methyl 18:1 w7c; 20. 19:0 cyclo w8c.

Les acides gras de quelques échantillons ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse après saponification et méthylation. La Figure 38 montre un chromatogramme d'une tache noire de 2010 du Passage (A), la mélanine d'*Ochroconis* (B), et les excréments de *F. candida* (C). Les profils des acides gras des taches noires et des pelotes fécales sont assez similaires et correspondent au mélange d'acides gras des différents microorganismes qui composent la communauté microbienne complexe de la grotte de Lascaux. Il est remarquable que les acides gras avec du cyclopropane (pics 14 et 20), qui est caractéristique des bactéries à gram-négatif, concorde avec l'abondance de ces bactéries (*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Achromobacter*, *Afipia*, *Stenotrophomonas*, *Inquilinus*, etc.) dans la grotte (Bastian et al. 2009b).

Les mélanines sont des macromolécules très résistantes et avec les acides humiques elles tendent à s'accumuler dans les sols du fait de leur structure aromatique non-hydrolysable et leur poids moléculaire élevé. Les mélanines, produites

par *Ochroconis* persistent sur les parois et dans les sédiments en tant que résidus car elles résistent à la dégradation par les microorganismes.

Dans la grotte, la forte densité de collemboles est à l'origine d'une accumulation de pelotes fécales, contenant des débris organiques incomplètement digérés. Les collemboles au contact des cellules bactériennes, des hyphes fongiques et des conidies augmentent le taux de dispersion des bactéries et des champignons et sont à l'origine de nouvelles taches noires. Cette dispersion de proximité est observable sur les Figures 35 et 36. *F. candida* est connu pour être un vecteur de champignons entomopathogènes (Dromph, 2003). Greif et Currah (2007) ont isolé, à partir de collemboles, des souches appartenant aux genres fongiques suivants: *Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Cryptendoxyla*, *Geomyces*, *Gliocladium*, *Hormiactis*, *Leptographium*, *Oidiodendron*, *Penicillium* et *Verticillium*. La dissémination des taches noires est donc associée à l'activité des collemboles.

Il est intéressant de noter que des individus non identifiés appartenant à la famille des *Campodeidae* (*Diplura*) ont également été observés se nourrissant sur les taches noires. La plupart des *Dipluræ* sont des prédateurs qui consomment des collemboles et des acariens (Lock et al. 2009). Ils peuvent également survivre sur des débris végétaux et des hyphes fongiques. En effet, les champignons mélanisés sont parmi les nutriments les plus appréciés des acariens (Schneider et Maraun, 2005). Un inventaire détaillé des différentes classes d'arthropodes présents dans la grotte devrait être établi de manière à confirmer la présence d'autres espèces cavernicoles dans la grotte.

# 5. Étude microscopique des taches noires de la grotte de Lascaux

L'étude avait pour objectif principal de connaître la composition des taches noires. Plusieurs échantillons, collectés en mai 2007, ont été analysés :

A1. Salle des Taureaux, paroi droite, tache noire après intervention (nettoyage) (Figure 39)

D 4. Abside, tache noire située à côté de la zone témoin (Figure 40)

E 5: Passage un peu avant l'abside ; paroi gauche, tache noire sur la banquette (Figure 41).

Les observations ont été effectuées en :

- microscopie photonique avec un microscope Zeiss Axioplan équipé d'un système d'acquisition d'images MRc5 AxioCam,
- microscopie électronique à balayage environmental à l'aide d'un microscope Quanta 2000 (ESEM),
- microscopie à balayage à l'aide d'un microscope Leica/Cambridge Stereoscan 360 (SEM)
- analyse dispersive en énergie (Energy Dispersive Spectroscopy EDS, Detector LFD aprox. 1 Torr (EDX)
- microscopie électronique à transmission (TEM) à l'aide d'un microscope JEOL 1010
- microscope confocale à balayage laser Leica TCS SP5 équipé de 3 lasers (longueurs d'onde d'excitation de 633 nm, 543 nm, 488 nm respectivement).

Les échantillons destinés aux observations SEM et EDX sont fixés dans une solution à 0.2% de glutaraldehyde et 2% paraformaldehyde dans un tampon 0.1 M cacodylate, déshydratés dans un gradient d'éthanol pour atteindre le point critique puis recouverts d'un film de carbone. Les échantillons sélectionnés sont ensuite recouverts d'un film d'or pour améliorer les images.

Les échantillons destinés aux observations en microscopie électronique à transmission (TEM) sont fixés dans une solution de glutaraldehyde (2.5%) dans un tampon 0.1M cacodylate puis post-fixés dans 1% d'OsO<sub>4</sub> dans le même tampon. Ils sont ensuite déshydratés dans l'acétone puis inclus la résine de Spurr. Les coupes ultrafines sont contrastées avec 2% d'acétate d'uranyl et du citrate de plomb.

Les échantillons destinés aux observations en microscopie électronique à balayage environnemental ont été observés « frais » sans préparation préalable. La capture d'images est effectuée grâce à un appareil Leica TCS-SP5 AOBs CLSM (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) utilisant des objectifs Plan-Apochromatic 40x6 (NA 1.25, huile) et 63x6 (NA 1.4, huile).

Les biofilms sont observés avec le microscope confocal et un système de détection multi-canaux. Le réactif concanavaleine A -Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) (0.8 mM) cible les exo-poly-saccharides (EPS), il est révélé dans les longueurs d'ondes des verts (excitation, 488 nm; émission, 495–540 nm). La fluorescence dans les longueurs d'ondes des bleus correspondant au DNA est détectée avec le réactif Hoechst 33258 et excité dans l'ultra-violet (351 nm et 354 nm). Les substrats inorganiques sont visualisés par réflexion dans les longueurs d'ondes des gris (excitation, 488 nm; émission, 480–495 nm). Les images tri-dimensionnelles sont collectées à partir des images bi-dimensionnelles XY prises tous les 0.5 µm en épaisseur Z, avec un « confocal pinhole de 1 Airy unit. Pour caractériser les biofilms, différentes projections (Roldan et al. 2004) ont été générées à partir des séries XYZ en utilisant le logiciel Imaris v. 6.1.0 software (Bitplane, Zürich, Switzerland).

L'échantillon A1 (Salle des Taureaux) observé en microscopie laser confocale montre (Figure 42) des filaments mycéliens de 2.5 µm de diamètre, avec des parois se colorant en vert avec la concanavaleine A - Alexa Fluor 488 (polysaccharides). Les points bleus correspondent à du DNA bactérien, qui est très abondant. La teinte gris et blanc correspond aux matériaux inorganiques de même que la fluorescence rouge et bleue. Ces images montrent que le biofilm est vraisemblablement composé de matériel biologique (bactéries et champignons) en contact étroit avec des particules minérales.

L'échantillon D4 (Figure 43), correspondant à une tache noire humide de l'Abside montre de grandes quantités de polysaccharides (teinte verte) d'origine fongique, colorés par la concanavaleine A. La couleur bleue signale de grandes quantités de bactéries. Le cyan et le blanc correspondent à des minéraux.

L'observation en microscopie électronique à transmission révèle de grandes quantités de bactéries (Figure 44) et d'hyphes (Figure 45). Certains hyphes sont entourés d'une enveloppe non structurée dont les caractéristiques permettent de penser qu'il s'agit d'une précipitation d'oxydes de fer et/ou de manganèse induite par la présence des microorganismes (Figure 46). Le même type d'observations a déjà été effectué pour d'autres microorganismes dans des environnements souterrains (Miller, Saiz-Jimenez et al., non publiés).

Les échantillons de taches noires analysés en microscopie à balayage (SEM) et par la technique d'analyse dispersive en énergie (EDS) ont révélé la présence de silice, fer, aluminium, potassium, magnésium, calcium etc. Le signal de manganèse est très faible (Figures 47-50). L'analyse des biofilms et des échantillons présentant des polymères extracellulaires (Figures 51 et 52) a fourni des résultats identiques aux taches noires.

Une observation détaillée des taches noires montre une association très étroite entre des particules minérales et des structures biologiques (Figures 53-57). Les microorganismes d'une part pénètrent dans la matrice minérale par dissolution des minéraux et d'autre part induisent la précipitation d'oxydes qui enrobent leurs parois. De plus, de nombreux microorganismes sont inclus dans des cristaux et constituent ainsi des formations à la fois organiques et inorganiques expliquant l'échec des traitements biocides et éventuellement d'autres traitements qui affectent uniquement la surface du substrat. En effet, les biocides n'ont pas accès aux microorganismes qui sont inclus dans une matrice minérale ou dans un biofilm qui les protège. L'élimination physique de ces formations organo-minérales présente le risque de dégrader la paroi de la grotte.



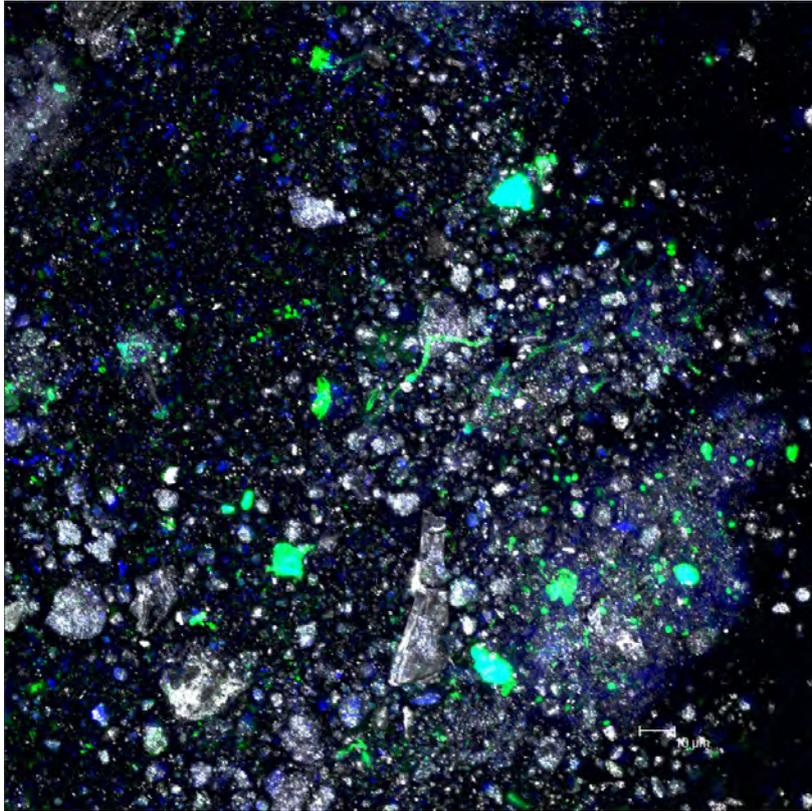
**Figure 39.** Échantillon A1. Salle des Taureaux, paroi droite, tache noire après intervention (nettoyage).



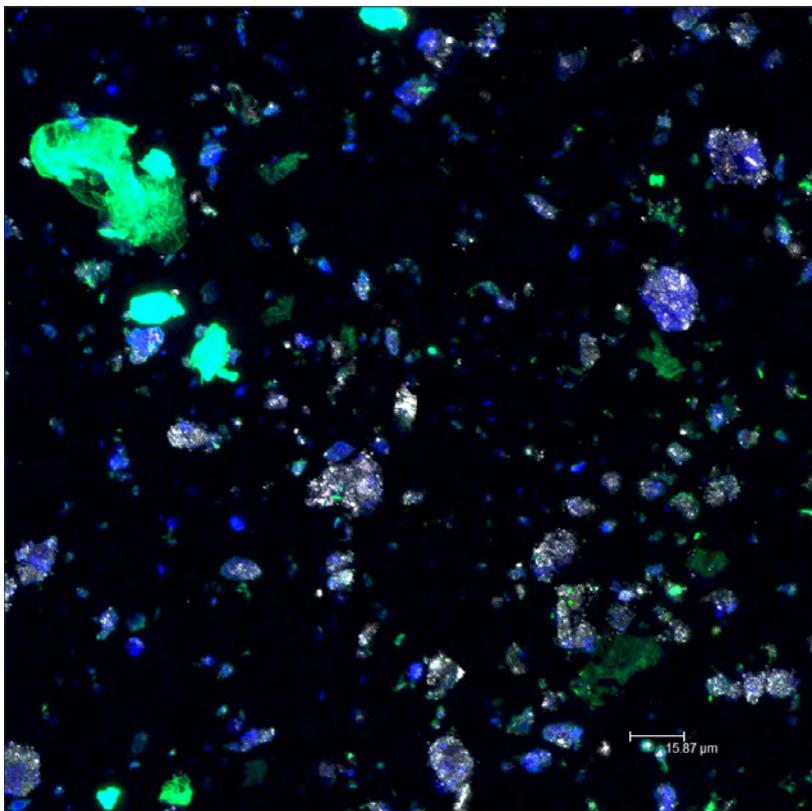
**Figure 40.** Échantillon D4. Abside, tache noire située à côté de la zone témoin.



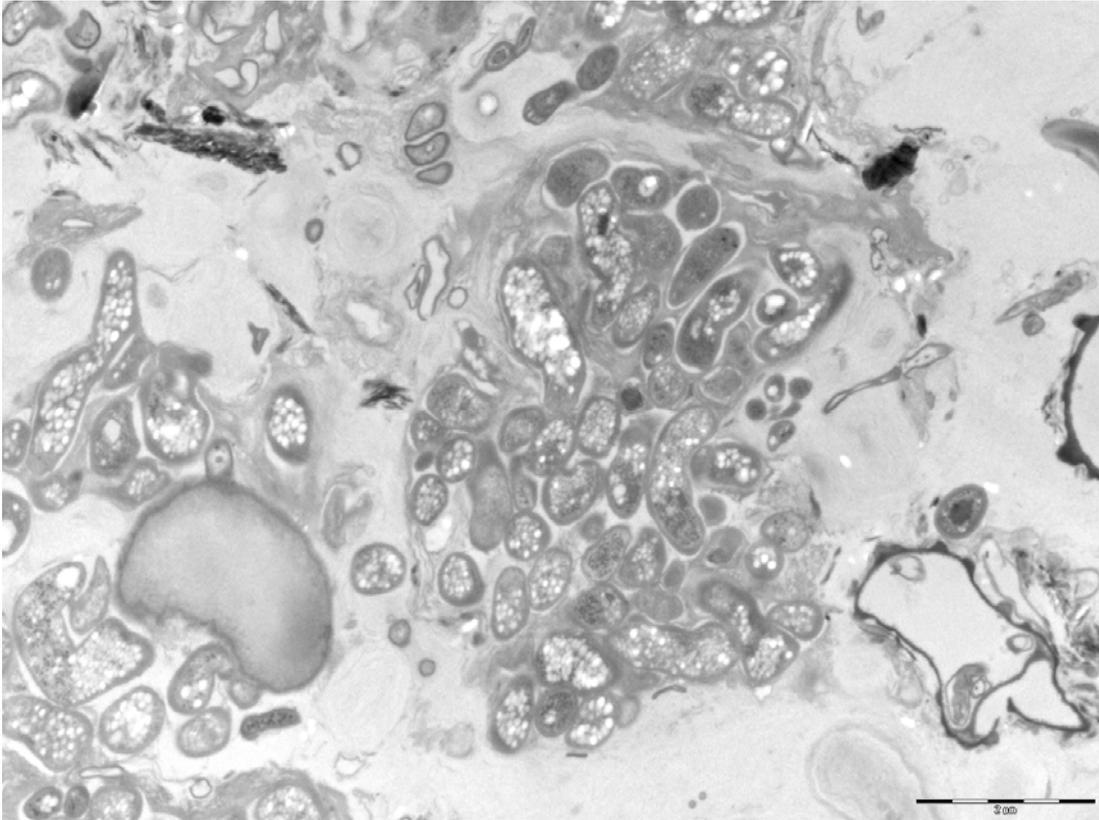
**Figure 41.** Échantillon E5. Passage un peu avant l'abside ; paroi gauche, tache noire sur la banquette.



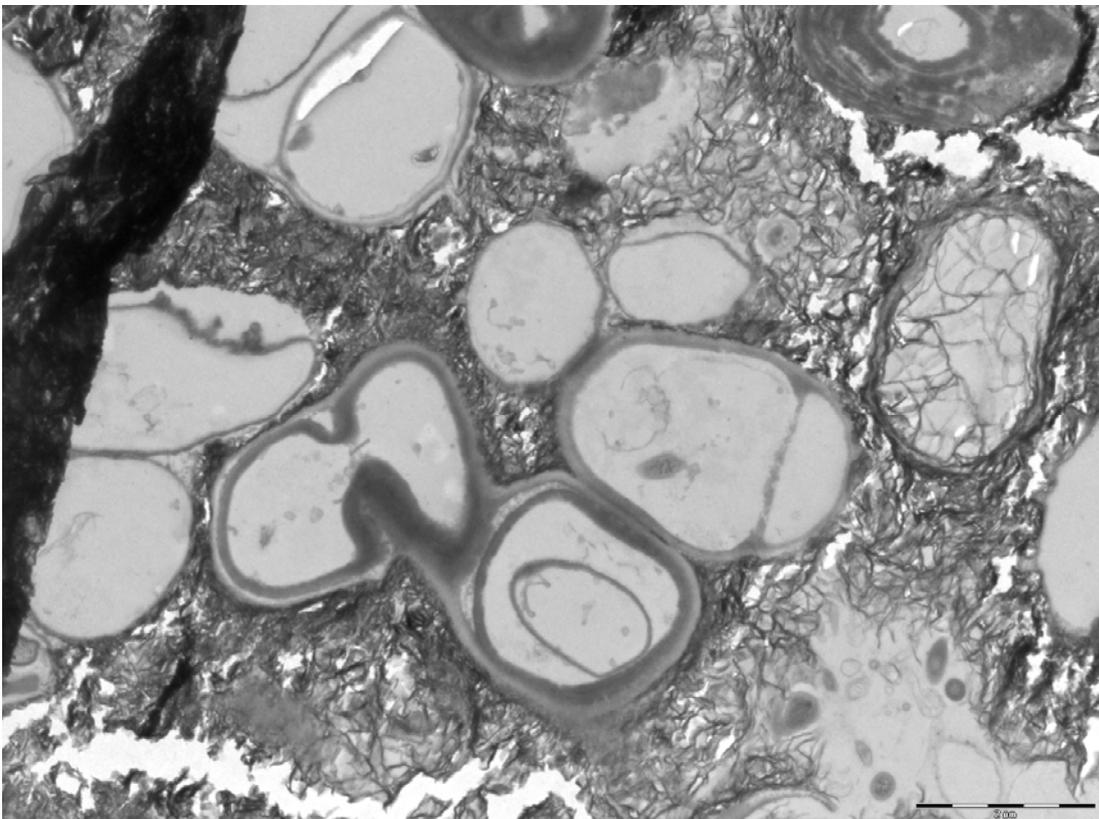
**Figure 42.** L'Échantillon A1 (Salle des Taureaux) observé en microscopie laser confocale.



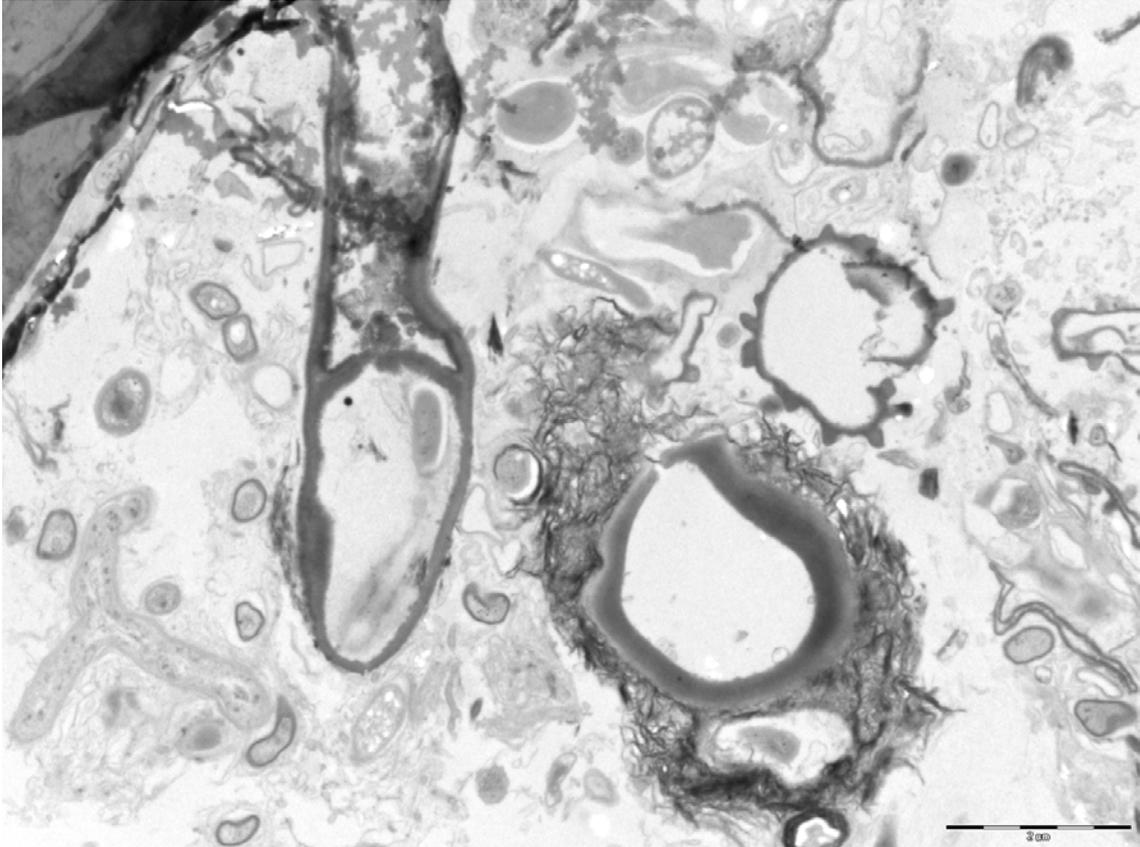
**Figure 43.** Échantillon D4 correspondant à une tache noire humide de l'Abside.



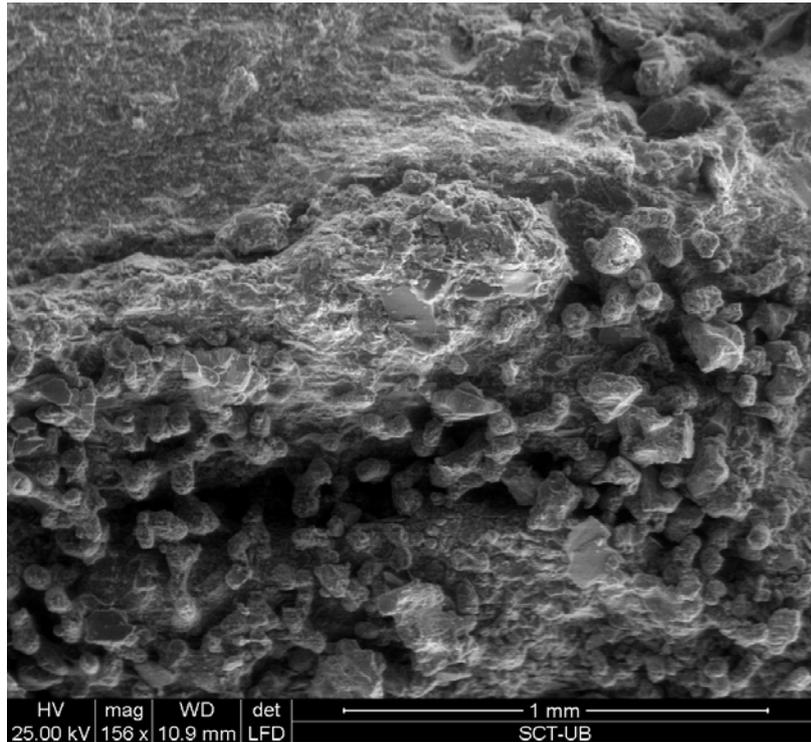
**Figure 44.** Tache noire observée en microscopie électronique à transmission montrant une grande quantité de bactéries.



**Figure 45.** Tache noire observée en microscopie électronique à transmission montrant une grande quantité d'hyphes.

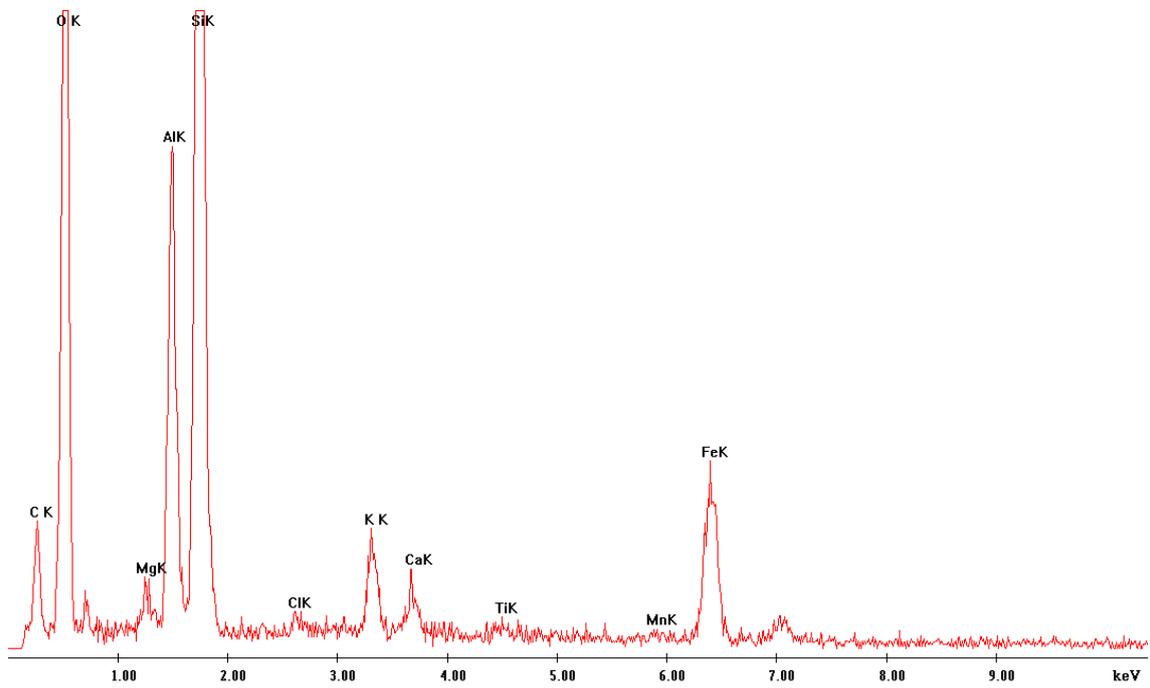


**Figure 46.** Tache noire observée en microscopie électronique à transmission montrant des hyphes entourés d'une enveloppe non structurée dont les caractéristiques sont celles d'un précipité d'oxydes de fer et/ou de manganèse.

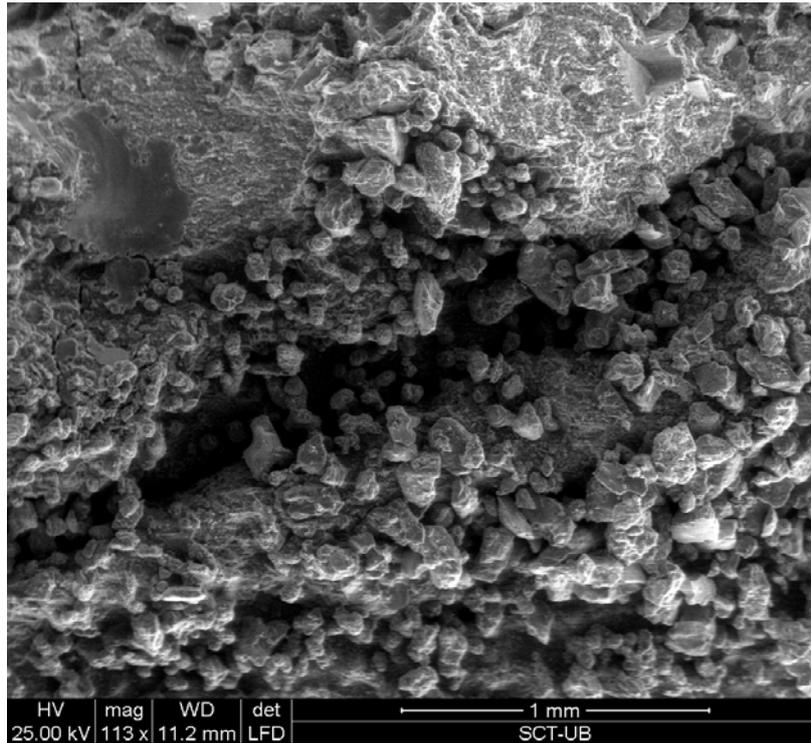


c:\edax32\genesis\genspc.spc

Label A: lascaus-0018sp

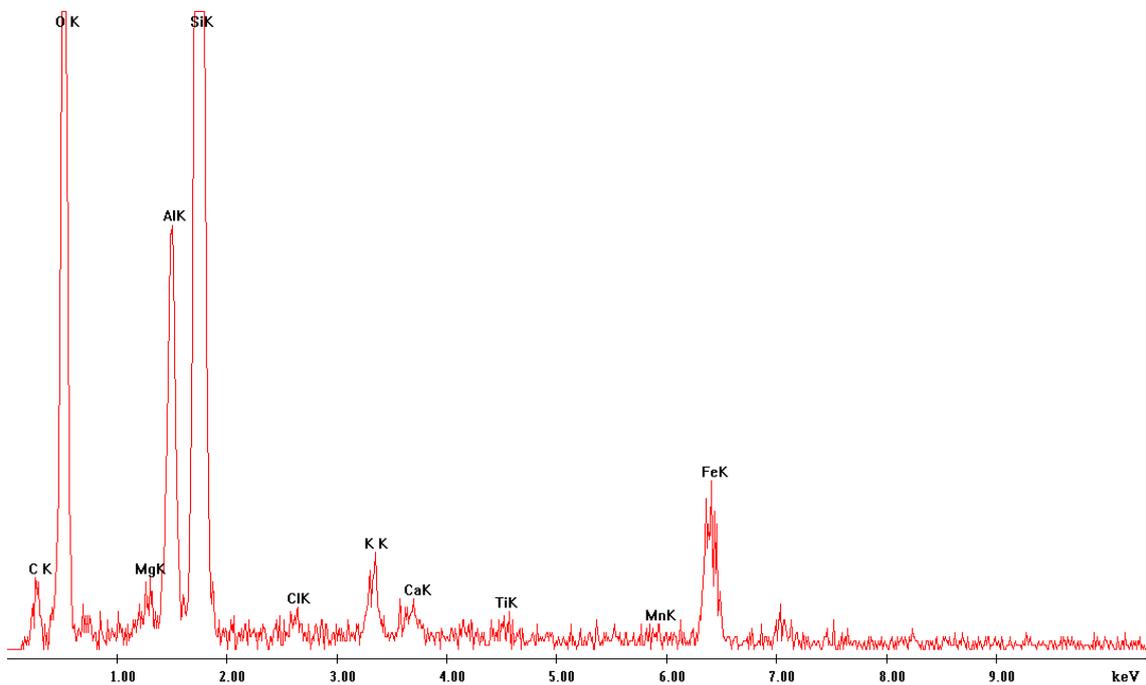


**Figures 47-48.** Échantillon (tache noire) analysé en microscopie à balayage (SEM) et par la technique d'analyse dispersive en énergie (EDS).

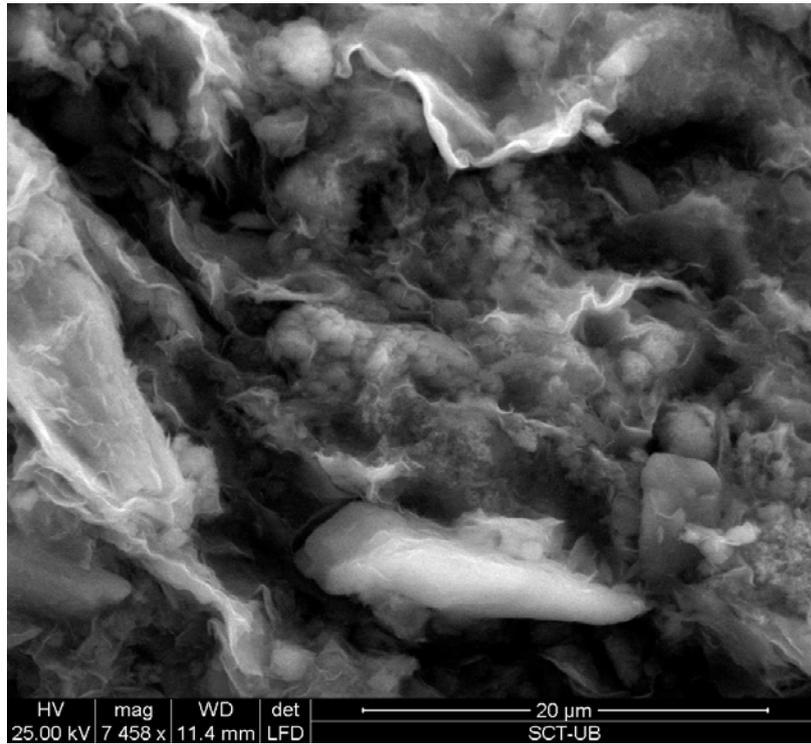


c:\edax32\genesis\genspc.spc

Label A: lascaus-020sp

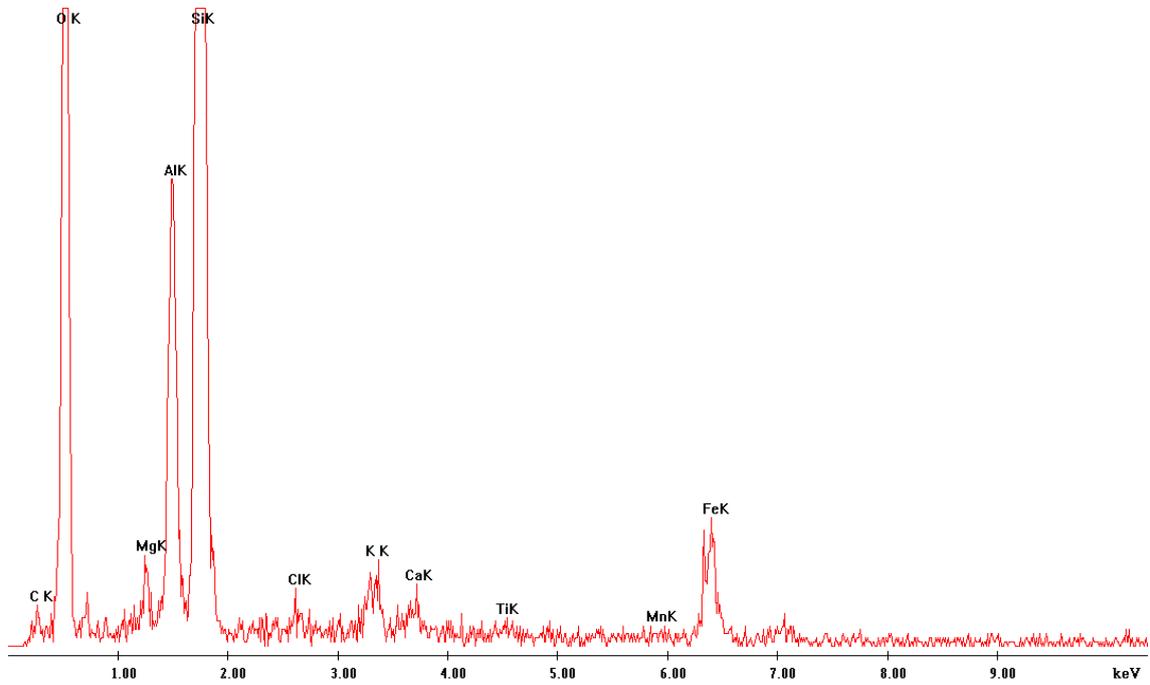


**Figures 49-50.** Échantillon (tache noire) analysé en microscopie à balayage (SEM) et par la technique d'analyse dispersive en énergie (EDS).

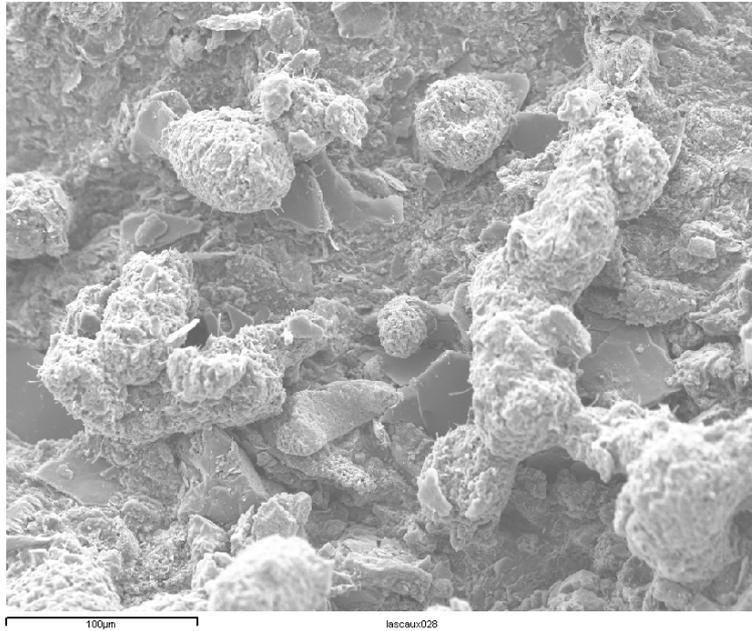


c:\edax32\genesis\genspc.spc

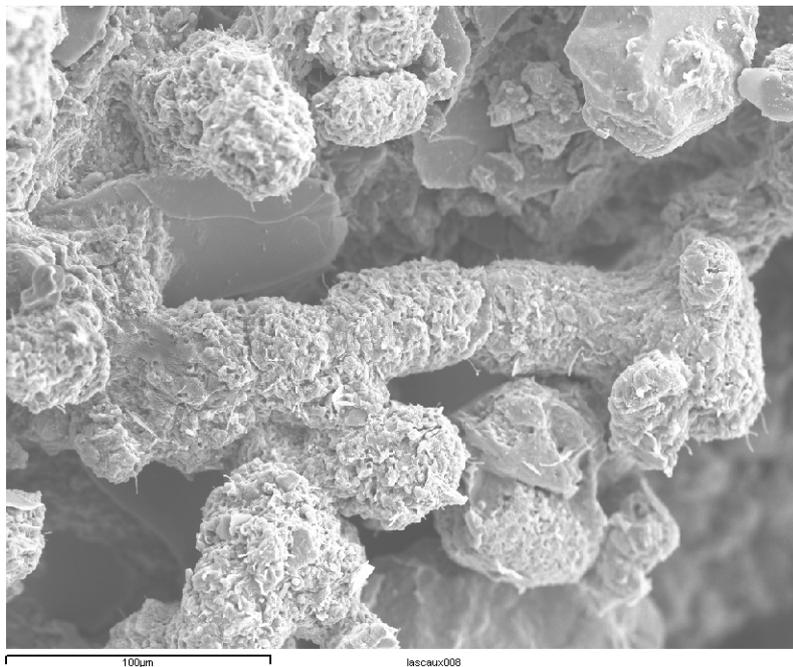
Label A: lascaus-031.sp



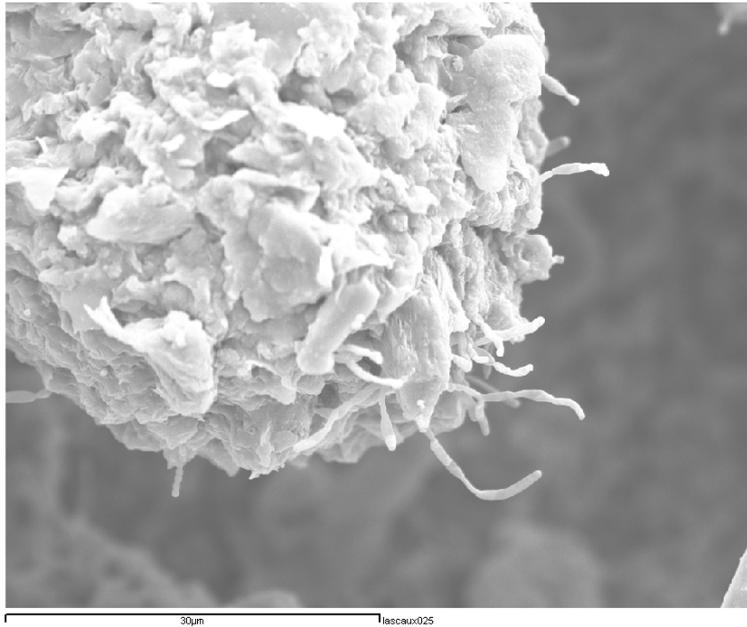
**Figures 51-52.** Échantillon (biofilm) analysé en microscopie à balayage (SEM) et par la technique d'analyse dispersive en énergie (EDS).



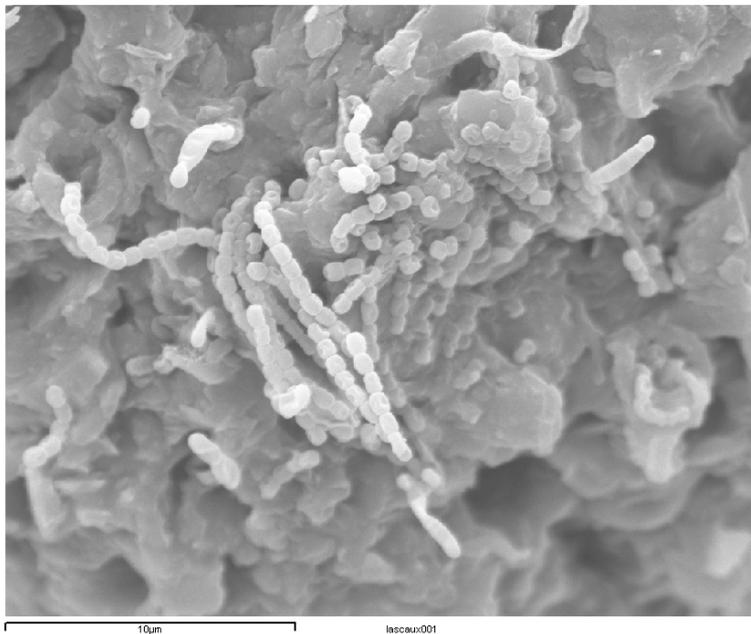
**Figure 53.** Échantillon de tache noire analysé en microscopie électronique à balayage montrant l'association étroite entre des particules minérales et des microorganismes.



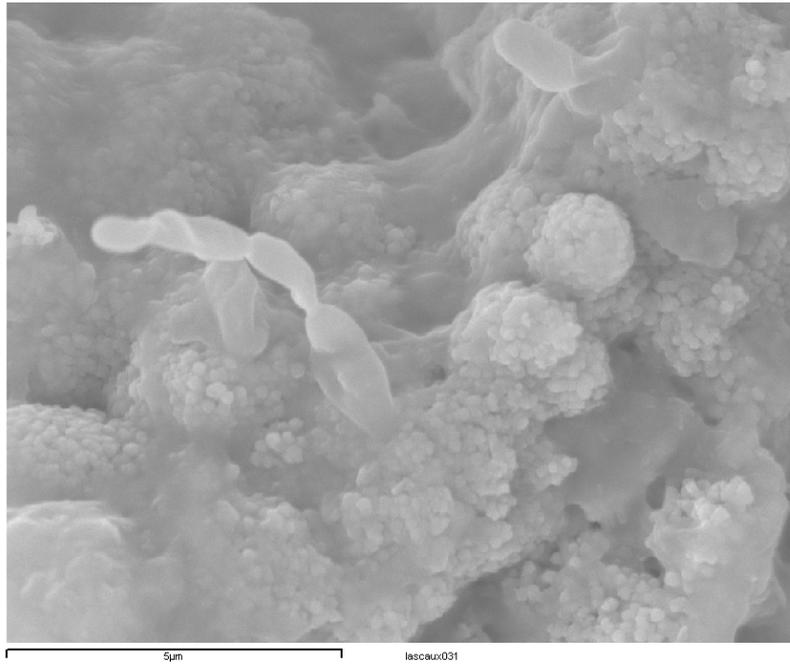
**Figure 54.** Autre échantillon de tache noire analysé en microscopie électronique à balayage montrant l'association étroite entre particules minérales et microorganismes.



**Figure 55.** Détail de la tache noire de la Figure 54.



**Figure 56.** Chaînes de *Streptomyces* sp. pénétrant dans la matrice minérale.

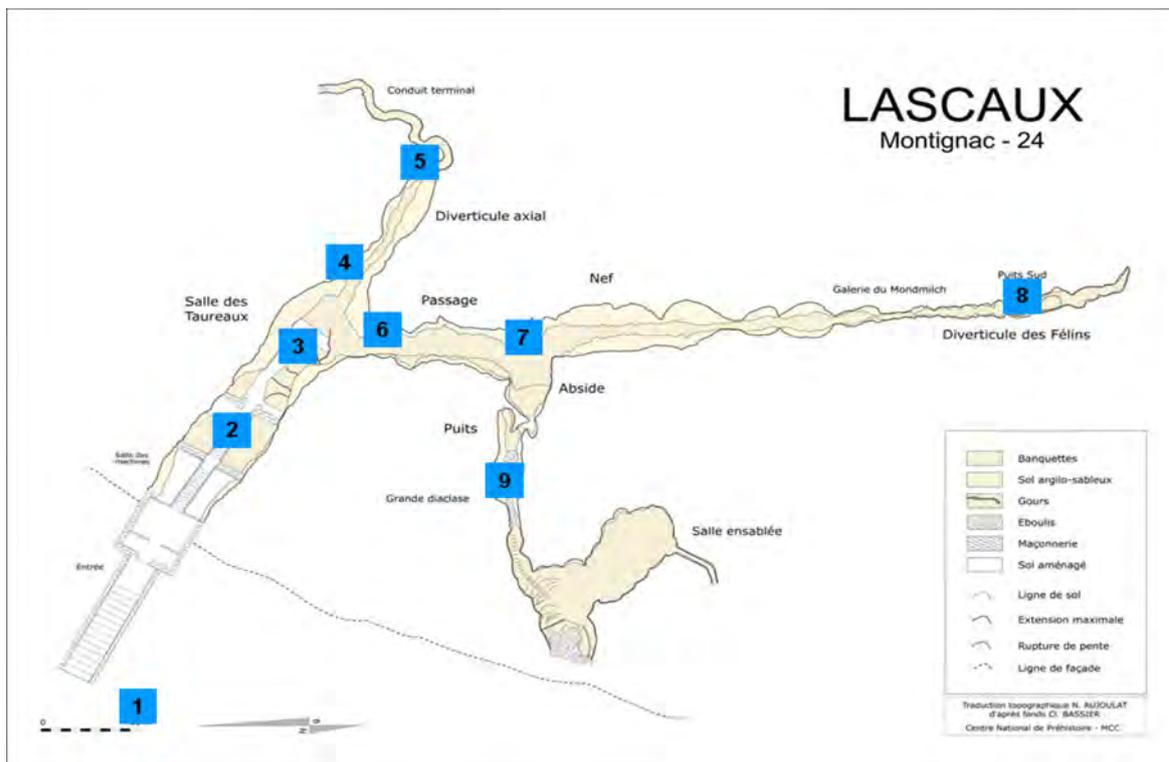


**Figure 57.** Hyphes fongiques émergeant de la matrice minérale.



## 6. Détermination du niveau de contamination aérienne dans la grotte de Lascaux

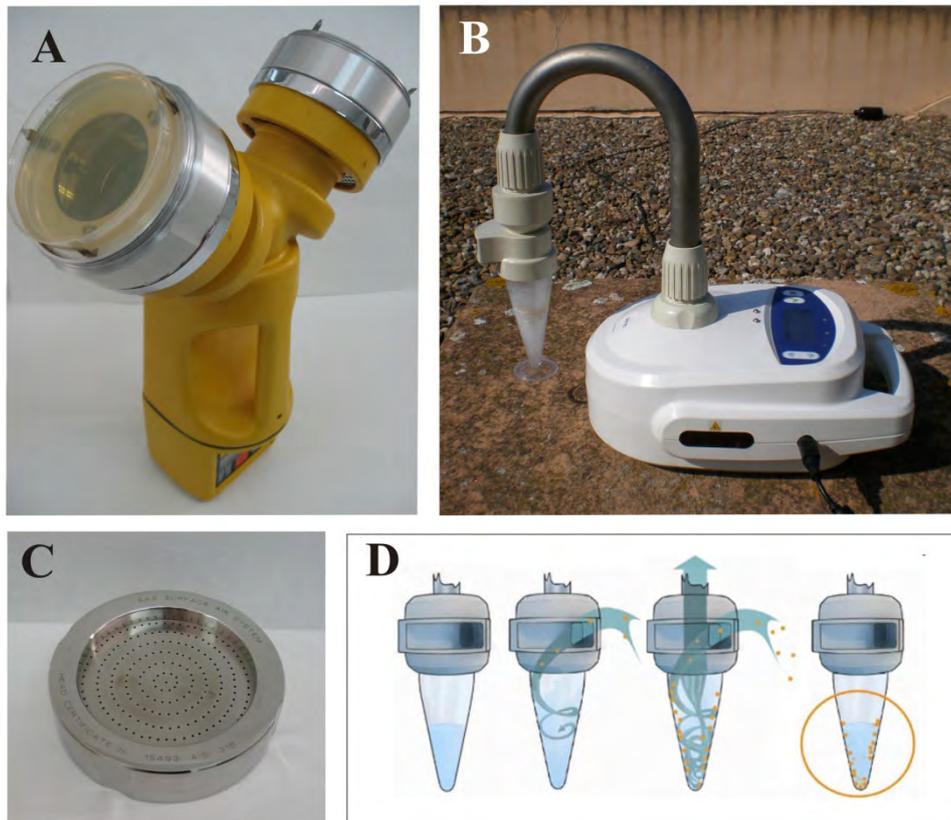
Deux séries de prélèvements ont été réalisés le 16 février 2010 puis le 21 septembre 2010, afin d'évaluer le niveau de contamination aérienne de la grotte de Lascaux. Les échantillons d'air ont été récoltés en 9 points situés sur la carte (Figure 58). L'appareil Duo SAS (Surface Air System) (Figure 59, A et C) aspire l'air à travers une tête perforée. Le flux d'air impacte directement la surface du milieu de culture contenu dans des boîtes de Petri. Deux milieux différents sont utilisés pour quantifier les bactéries et les champignons présents dans 100 L d'air prélevés.



**Figure 58.** Localisation des échantillons d'air, prélevés dans la grotte de Lascaux.

Pour chaque point de prélèvement deux boîtes de MEA pour l'isolement des champignons et deux boîtes de triptone de soja agar additionné de cycloheximide (TSAC) pour l'isolement des bactéries. Les boîtes sont incubées à 25 °C. Le

dénombrement des colonies est réalisé après 5 jours d'incubation pour les bactéries et 7 jours pour les champignons. A partir de chaque boîte, les colonies qui présentent une morphologie différente sont mises en culture, puis conservées en collection jusqu'à leur identification par des techniques moléculaires. Les bactéries sont identifiées par analyse de la séquence du gène 16S de l'ARNr, en l'amplifiant avec les amorces 616F (Juretschko et al. 1998) et 1522R (Edwards et al. 1989). Les champignons sont identifiés par analyse de la séquence des régions ITS, comme décrit précédemment.



**Figure 59.** Appareils utilisés pour prélever des échantillons d'air: Duo SAS (Surface Air System) (A) et détail d'une tête perforée (C); Coriolis (Bertin Technologies) (B) et diagramme explicatif de son fonctionnement (D).

### **6.1 Dénombrement des bactéries et des champignons présents dans l'air de la grotte**

Les résultats des dénombrements de bactéries et champignons sont présentés dans le Tableau 17. Les concentrations de bactéries déterminées dans les prélèvements de septembre sont 7 fois inférieures à celles déterminées en février, et celles des champignons sont 4 à 6 fois plus faibles.

Les zones qui présentent une forte concentration de bactéries sont le SAS2, la zone de transition entre la Salle des Taureaux et le Diverticule Axial, le Diverticule Axial lui-même et le Cabinet des Félines. Dans le Cabinet des Félines, le nombre de bactéries dans l'échantillon de février est 22 fois supérieur à celui de septembre et

presque 4 fois supérieur à celui du SAS2, et à celui de la jonction entre la Salle des Taureaux et le Diverticule Axial.

En février, la concentration des champignons est 4 à 6 fois plus élevée que celle observée en septembre. On note de fortes concentrations dans le Diverticule Axial, le Cabinet des Félines, et entre le Passage et la Nef. En septembre, la concentration des champignons, à l'extérieur de la grotte, est très supérieure aux concentrations mesurées dans toutes les zones de la grotte. Ce résultat montre qu'il existe un bon isolement de l'air intérieur par rapport à l'extérieur. Le même constat peut être fait en prenant en considération les densités bactériennes.

Ces variations de densité bactérienne et fongique doivent être discutées en relation avec les changements climatiques dans la grotte ainsi qu'en relation avec les différents traitements (application des biocides, nettoyage mécanique, etc.). Les résultats indiquent qu'une étude systématique de l'aérobiologie de la grotte est nécessaire pour tenter de comprendre les processus à l'origine de ces variations.

En février, durant les 4 semaines précédant le prélèvement, le temps de présence humaine a été de 78 h et 20 mn et la grotte était au repos complet, sans présence humaine, durant les 3 jours précédant le prélèvement. En septembre, la présence humaine a atteint un total de 81 h et 40 mn et une visite de quatre heures a été effectuée le jour précédant le prélèvement.

La différence de durée de présence humaine entre les mois de février et septembre n'est donc pas suffisamment importante pour justifier les changements observés dans la contamination aérienne de la grotte lors des prélèvements effectués en février et septembre. Le principal facteur de différenciation entre ces deux périodes est l'assistance climatique qui était en fonctionnement en septembre.

Ceci suggère que l'assistance climatique est un facteur important de réduction de la contamination aérienne. Cette hypothèse doit être vérifiée et des études complémentaires sont nécessaires pour expliquer le rôle de l'assistance climatique en relation avec le niveau d'aéro-contamination de la grotte.

**Tableau 17.** Dénombrements totaux des bactéries et champignons dans les prélèvements effectués lors des deux campagnes d'échantillonnage de l'air de la grotte

Point échantillonné	Bactéries <sup>a</sup> février	Bactéries <sup>a</sup> septembre	Champignons <sup>a</sup> février	Champignons <sup>a</sup> septembre
9 Puits du sorcier	310	70	50	10
8 Cabinet des Felins	310	740	700	190
7 Passage/Abside/Nef	1.500	760	690	120
6 Passage	1.120	540	150	80
5 Diverticule Axial	4.050	360	950	190
4 Salle des Taureaux/ Diverticule Axial	4.470	420	290	170
3 Salle des Taureaux	2.490	980	200	140
2 SAS 2	4.550	700	460	170
1 Extérieur de la grotte	360	1090	170	960

<sup>a</sup>Quantification totale exprimé en unités formant colonies (ufc) / m<sup>3</sup> d'air.

## 6.2 Identification des bactéries et des champignons présents dans l'air de la grotte

Les identifications des champignons et des bactéries isolés lors des deux campagnes d'échantillonnage, sont présentés dans les Tableaux 18-21.

### 6.2.1 Identification des bactéries

En février, l'espèce *Brachybacterium fresconis* est fortement représentée dans tous les points d'échantillonnage sauf dans le Puits du Sorcier. Cette bactérie est avec *Bacillus muralis* une des bactéries isolées des peintures murales de la chapelle Saint-Catherine du château Herberstein (Autriche) et de l'église luthérienne de Greene-Kreiensen (Allemagne). *B. fresconis* représente 80% des colonies (ufc/m<sup>3</sup>) isolées de l'air de la grotte, mais *B. muralis* ne représente que 0,3% des isolaments. Par ordre d'abondance des autres genres représentés sont : *Micrococcus* 5,8% des isolats, l'espèce *M. lylae* étant la plus représentée, *Streptomyces* 3%, *Bacillus* 2,7%, *Microbacterium* 2%, *Pseudomonas* 0.8% et *Olivibacter* 0,7% des isolats.

Lors des prélèvements de septembre, la représentation des différents genres et espèces bactériens est totalement différente. *B. fresconis*, bactérie la plus abondante en février (80%) n'est pas détectée. La représentation des autres genres et espèces est

beaucoup plus équilibrée avec 28,1% de *Microbacterium*, 20,1% de *Bacillus*, 11,3% de *Pseudomonas*, 10,8% de *Rhodococcus erythropolis*, et 9,7% de la levure *Debaryomyces hansenii*.

Dans ces prélèvements de septembre, 8 espèces isolées de l'air présentent un pourcentage de similitude avec des espèces décrites inférieur à 95%, et même pour quelques unes de l'ordre de 77% seulement. Ces faibles pourcentages indiquent que ces isolats pourraient appartenir à de nouveaux genres et/ou espèces non encore décrites dans les bases de données.

### 6.2.2 Identification des champignons

Les genres et espèces fongiques représentés dans les prélèvements de février (Tableau 19) sont par ordre décroissant : les espèces d'*Aspergillus* 30,5% des isolats (*A. versicolor* étant majoritaire 26,8%), *Acremonium murorum* et *A. nepalense* 23,3%, *Pochonia suchlasporia* (uniquement présente dans le Diverticule Axial) 7,3%, *Verticillium leptobactrum* 6,5%, *Doratomyces* sp. 5,4%, *Cladosporium cladosporioides* 4,4%, *Penicillium* 3,4% et *Ochroconis* 3% des isolats.

Les genres et espèces fongiques représentés dans les prélèvements de septembre sont différents de ceux décrits en février. Les espèces *Aspergillus* et *Acremonium* ont disparu, les espèces de *Cladosporium* représentent 18,6% des isolats, *Arthroderma quadrifidum*, isolé uniquement dans le Diverticule Axial atteint une fréquence de 17,8%, *Doratomyces* sp. 15,6%, *Bulleromyces albus* 15,4% et *Penicillium* sp. 10,5% des isolats. L'identification d'*Arthroderma quadrifidum*, téléomorphe de *Trichophyton terrestre*, est remarquable car il s'agit d'un champignon d'intérêt clinique ; il est dermatophyte et keratinophyte (se nourrissant de la kératine des cheveux). *Bulleromyces albus* est le téléomorphe de *Bullera alba* et *Bullera* sp. a été identifiée dans les taches noires récoltées en février 2010 (Figure 24).

### 6.2.3 Evolution des populations fongiques au cours du temps

Les changements drastiques qui ont affectés la composition des communautés bactériennes et fongiques présentes dans l'air de la grotte entre les prélèvements de février et ceux de septembre montrent que ces communautés évoluent de manière permanente. Il serait donc important d'étudier la dynamique qui affecte les communautés microbiennes de la grotte de Lascaux.

Il est intéressant de noter qu'*Ochroconis* sp. 1, présent dans les différentes zones de la grotte, est dispersé de façon efficace par l'air. Il est détecté dans 5 des zones de prélèvement à l'intérieur de la grotte. Ces résultats coïncident avec ceux des quantifications par PCR en temps réel qui ont révélé la présence d'*Ochroconis* sp. 1 dans tous les échantillons de sédiments, avec une abondance importante dans les points 3 (Salle des Taureaux), 6 (Passage) et 7 (entre le Passage et l'Abside) ; ces points sont également ceux où *Ochroconis* a été révélé dans l'air avec une fréquence de 3,5 a

9,5 % des isolats fongiques. Ces résultats mettent en évidence la relation entre ce champignon et la présence des taches noires, qui sont abondantes dans ces zones de la grotte.

Dans le point 9 correspondant au Puits du Sorcier les concentrations de champignons et bactéries dans l'air sont minimales. Mais parmi les champignons identifiés en février *Ochroconis* sp. 1 représente 24 % des isolats. Ce résultat doit être relié à l'observation de taches noires dans cette zone et à l'isolement d'*Ochroconis* à partir des échantillons M-LX14 et M-LX15 (Tableau 9) prélevés en octobre 2009 à droite de la trappe du Puits du Sorcier.

Dans l'échantillonnage de septembre, le niveau de contamination aérienne diminue, et *Ochroconis* sp. 1 n'a pas été détecté. Cependant cette absence de détection ne signifie pas nécessairement absence de ce champignon. En effet, dans les analyses par PCR en temps réel *Ochroconis* a été détecté et quantifié dans les échantillons d'air récoltés avec l'appareil Coriolis, au niveau des points 3 (Salle des Taureaux), 4 (Salle des Taureaux-Diverticule Axial), 5 (Diverticule Axial) et 6 (Passage). Il était particulièrement abondant dans les points 4 et 6 (Figure 17).

Dans l'échantillonnage de février des isolats appartenant à l'espèce *Acremonium nepalense* ont été détectés dans les échantillons prélevés dans les zones les plus affectées par les taches noires : points 6 (Passage) et 7 (Passage-Abside-Nef), avec une abondance respective de 5,3 % et 2% des isolats fongiques. Ce résultat démontre la capacité de ce champignon à être dispersé par l'air.

Il faut noter la présence abondante d'un champignon identifié comme appartenant à l'espèce *Verticillium leptobactrum*. En février *V. leptobactrum* a été isolé de cinq des sept points intérieurs de la grotte (4, 6, 7, 8 et 9) avec des fréquences élevées : 30% dans le point 4 (Salle des Taureaux-Diverticule Axial) et 76% dans le point 9 (Puits). De plus, en septembre, cette espèce a aussi été isolée du point 7 (Passage-Abside-Nef) avec une fréquence de 26,7%. Cette espèce a été décrite comme parasite de nématodes (Godoy et al. 1982), et sa présence dans l'air de Lascaux pourrait indiquer la présence de nématodes dans la grotte, mais il est également possible qu'il soit associé à des insectes.

Dans l'échantillonnage de février, d'autres espèces fongiques sont fréquentes dans l'air de la grotte : *Aspergillus versicolor* 95% (5 points), *Acremonium murorum* 99% (3 points) et *Geomyces pannorum* 99% (4 points).

Parmi les champignons isolés en septembre (Tableau 20), *Bulleromyces albus* est abondant dans points 4 et 6 où il représente respectivement 50 et 100 % des isolats. Les levures appartenant au genre *Bullera* sont majoritaires dans les analyses DGGE de l'échantillon prélevé sur une tache vert-jaune de la Nef (M7, Fig. 24).

Il est permis de conclure qu'il existe une bonne concordance entre d'une part les résultats des analyses d'aérocontamination et d'autre part les analyses de l'ADN prélevé sur les taches noires, et avec les isolements directs de microorganismes à partir de ces taches noires.

**Tableau 18.** Identification des bactéries isolées des échantillons d'air prélevés en février 2010

Point d'échantillonnage	Identification (% homologie) <sup>a</sup>	UfC/m <sup>3</sup> aire
9 Puits du Sorcier	<i>Streptomyces</i> sp. 99%	129
	<i>Agrococcus</i> sp. 96%	78
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 99%	52
	<i>Terrabacter</i> sp. 99%	13
	<i>Bacillus</i> sp. 99%	13
	<i>Olivibacter soli</i> 98%	13
	<i>Rhodococcus globerulus</i> 99%	6
	<i>Bacillus muralis</i> 99%	6
8 Cabinet des Félines	<i>Brachybacterium fresconis</i> 99%	13.713
	<i>Agrococcus</i> sp. 99%	493
	<i>Streptomyces</i> sp. 99%	411
	<i>Bacillus</i> sp. 99%	329
	<i>Streptomyces</i> sp. 99%	164
	<i>Acinetobacter</i> sp. 99%	123
	<i>Bacillus muralis</i> 99%	82
	<i>Streptomyces</i> sp. 99%	82
	<i>Micrococcus</i> sp. 99%	41
	<i>Massilia timonae</i> 99%	41
7 Passage/Abside/Nef	<i>Brachybacterium fresconis</i> 99%	1.204
	<i>Bacillus pumilus</i> 99%	205
	<i>Agrococcus</i> sp. 99%	57
	<i>Streptomyces</i> sp. 99%	23
	<i>Bacillus</i> sp. 99%	11
6 Passage	<i>Brachybacterium fresconis</i> 99%	485
	<i>Microbacterium oxydans</i> 99%	301
	<i>Agrococcus</i> sp. 99%	150
	<i>Sphingomonas</i> sp. 98%	67
	<i>Streptomyces</i> sp. 99%	33
	<i>Streptomyces</i> sp. 99%	33
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 99%	17
	<i>Olivibacter soli</i> 98%	17
5 Diverticule Axial	<i>Brachybacterium fresconis</i> 99%	3.285
	<i>Micrococcus lylae</i> 99%	334
	<i>Bacillus</i> sp. 99%	143
	<i>Streptomyces</i> sp. 99%	84
	<i>Olivibacter soli</i> 99%	72
	<i>Bacillus</i> sp. 99%	60
	<i>Massilia timonae</i> 99%	48
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 99%	12
4 Salle des Taureaux/ Diverticule Axial	<i>Brachybacterium fresconis</i> 99%	3.717
	<i>Micrococcus</i> sp. 99%	382
	<i>Micrococcus lylae</i> 99%	301
	<i>Streptomyces</i> sp. 99%	20
	<i>Olivibacter soli</i> 98%	10
	<i>Microbacterium oxydans</i> 99%	10
	<i>Olivibacter soli</i> 99%	10
	<i>Bacillus muralis</i> 99%	10
	<i>Rhodococcus globerulus</i> 99%	10

<sup>a</sup>Identification basse sur la séquences de la région ITS et comparaison avec les séquences de GenBank.

**Tableau 18 (suite)** Identification des bactéries isolées des échantillons d'air prélevés en février 2010

Point d'échantillonnage	Identification (% homologie) <sup>a</sup>	UfC/m <sup>3</sup> aire
3 Salle des Taureaux	<i>Brachybacterium fresconis</i> 99%	1.261
	<i>Micrococcus lylae</i> 99%	599
	<i>Microbacterium oxydans</i> 99%	384
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 99%	138
	<i>Olivibacter soli</i> 98%	77
	<i>Olivibacter soli</i> 99%	31
	<i>Bacillus</i> sp. 99%	31
2 SAS 2	<i>Brachybacterium fresconis</i> 99%	3.559
	<i>Micrococcus lylae</i> 99%	307
	<i>Curtobacterium herbarum</i> 99%	286
	<i>Advenella incenata</i> 99%	92
	<i>Pseudosphingobacterium domesticum</i> 98%	143
	<i>Streptomyces</i> sp. 99%	41
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 98%	41
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 99%	20
	<i>Acinetobacter</i> sp. 99%	20
	<i>Flavobacterium</i> sp. 98%	10
1 Extérieur de la grotte	<i>Rhodococcus globerulus</i> 99%	78
	<i>Microbacterium oxydans</i> 99%	78
	<i>Brachybacterium fresconis</i> 99%	55
	<i>Agrococcus</i> sp.99%	44
	<i>Curtobacterium herbarum</i> 99%	33
	<i>Bacillus licheniformis</i> 99%	33
	<i>Arthrobacter</i> sp. 99%	11
	<i>Staphylococcus</i> sp. 99%	11
	<i>Bacillus</i> sp. 99%	11
<i>Arthrobacter arilaitensis</i> 99%	6	

<sup>a</sup> Identification basée sur les séquences de la région ITS et comparaison avec les séquences de GenBank.

**Tableau 19.** Identification des bactéries isolées des échantillons d'air prélevés en septembre 2010

Point d'échantillonnage	Identification (% homologie) <sup>a</sup>	UfC/m <sup>3</sup> aire
9 Puits du Sorcier	<i>Bacillus cereus</i> 97%	20
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 95%	20
	<i>Bacillus</i> sp. 99%	10
	<i>Olivibacter soli</i> 99%	10
	<i>Bacillus simplex</i> 99%	10
8 Cabinet des Félines	<i>Pseudomonas</i> sp. 99%	278
	<i>Bacillus muralis</i> 99%	216
	<i>Micrococcus lylae</i> 99%	108
	<i>Microbacterium</i> sp 99%	93
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 99%	30
	<i>Streptomyces</i> sp. 99%	15
7 Passage/Abside/Nef	<i>Microbacterium</i> sp. 99%	491
	<i>Micrococcus lylae</i> 99%	82
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 99%	58
	<i>Streptomyces xanthophaeus</i> 99%	47
	<i>Streptomyces</i> sp. 95%	35
	<i>Bacillus</i> sp. 99%	35
6 Passage	<i>Arthrobacter</i> sp. 99%	12
	<i>Bacillus</i> sp. 99%	295
	<i>Agromyces fucosus</i> 99%	184
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 82%	36
5 Diverticule Axial	<i>Acinetobacter johnsonii</i> 98%	25
	<i>Bacillus</i> sp. 99%	284
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 86%	38
	<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i> 99%	19
4 Salle des Taureaux/Diverticule Axial	<i>Doratomyces</i> sp. 98%	19
	<i>Microbacterium</i> sp. 99%	296
	<i>Bacillus</i> sp. 99%	49
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 84%	25
3 Salle des Taureaux	<i>Terrabacter</i> sp. 83%	25
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 99%	25
	<i>Debaryomyces hansenii</i> 99%	443
	<i>Microbacterium</i> sp. 99%	349
	<i>Olivibacter soli</i> 82%	67
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 99%	54
2 SAS 2	<i>Phyllobacterium</i> sp. 77%	27
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 95%	27
	<i>Agrococcus</i> sp. 100%	13
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> 99%	385
	<i>Rahnella genomosp.</i> 84%	178
1 Extérieur de la grotte	<i>Microbacterium</i> sp. 99%	55
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 98%	55
	<i>Streptomyces</i> sp. 99%	27
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 89%	549
	<i>Bacillus</i> sp. 99%	198
	<i>Sediminibacterium</i> sp. 85%	99
1 Extérieur de la grotte	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> 99%	99
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 87%	99
	<i>Staphylococcus</i> sp. 99%	46

<sup>a</sup>Identification basse sur la séquences de la région ITS et comparaison avec les séquences de GenBank.

**Tableau 20.** Identification des champignons isolés des échantillons d'air prélevés en février de 2010

Point d'échantillonnage	Identification (% homologie) <sup>a</sup>	UfC/m <sup>3</sup> aire
9 Puits du Sorcier	<i>Verticillium leptobactrum</i> 98%	38
	<b><i>Scolecobasidium tshawytschae</i></b> 83% <sup>b</sup>	12
8 Cabinet des Félinés	<i>Aspergillus versicolor</i> 99%	613
	<i>Acremonium murorum</i> 99%	62
	<i>Verticillium leptobactrum</i> 98%	10
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> 99%	10
	<i>Aspergillus versicolor</i> 95%	5
7 Passage/Abside/Nef	<i>Trichoderma velutinum</i> 98%	200
	<i>Aspergillus versicolor</i> 95%	146
	<i>Aspergillus asperescens</i> 98%	131
	<i>Verticillium leptobactrum</i> 98%	66
	<b><i>Scolecobasidium tshawytschae</i></b> 83% <sup>b</sup>	66
	<i>Doratomyces</i> sp. 98%	40
	<i>Alternaria alternata</i> 99%	27
6 Passage	<i>Acremonium nepalense</i> 96% <sup>c</sup>	14
	<i>Tritirachium</i> sp. 100%	55
	<i>Mortierella alpina</i> 95%	41
	<i>Verticillium leptobactrum</i> 98%	15
	<i>Geomyces pannorum</i> 100%	15
	<i>Doratomyces</i> sp. 98%	8
5 Diverticule Axial	<b><i>Scolecobasidium tshawytschae</i></b> 83% <sup>b</sup>	8
	<i>Acremonium nepalense</i> 96% <sup>c</sup>	8
	<i>Acremonium murorum</i> 99%	325
	<i>Pochonia suchlasporia</i> 98%	254
	<i>Doratomyces</i> sp. 98%	127
4 Salle des Taureaux/Diverticule Axial	<i>Aspergillus versicolor</i> 95%	117
	<i>Penicillium commune</i> 99%	115
	<b><i>Scolecobasidium tshawytschae</i></b> 83% <sup>b</sup>	12
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> 99%	145
4 Salle des Taureaux/Diverticule Axial	<i>Verticillium leptobactrum</i> 98%	97
	<i>Geomyces pannorum</i> 100%	24
	<i>Emericella rugulosa</i> 94%	12
	<i>Doratomyces</i> sp. 98%	12

<sup>a</sup> Identification basée sur les séquences de la région ITS et comparaison avec les séquences de GenBank.

<sup>b</sup> Identifié comme *Ochroconis* sp. 1 (100% d'identité).

<sup>c</sup> Séquences qui présentent 100% d'identité avec des autres *Acremonium nepalense* (bandes DGGE, clones et isolements).

**Tableau 20** (Suite). Identification des champignons isolés des échantillons d'air prélevés en février de 2010

Point d'échantillonnage	Identification (% homologie) <sup>a</sup>	UfC/m <sup>3</sup> aire
3 Salle des Taureaux	<i>Engyodontium album</i> 100%	72
	<i>Mortierella alpina</i> 95%	57
	<i>Aspergillus versicolor</i> 95%	43
	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i> 98%	7
	<i>Geomyces pannorum</i> 100%	7
	<i>Debaryomyces hansenii</i> 99%	7
	<b><i>Scolecobasidium tshawytschae</i> 83%<sup>b</sup></b>	<b>7</b>
2 SAS 2	<i>Acremonium murorum</i> 99%	404
	<i>Geomyces pannorum</i> 99%	31
	<i>Aspergillus versicolor</i> 95%	10
	<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i> 99%	10
	<i>Penicillium</i> sp. 96%	5
1 Extérieur de la grotte	<i>Penicillium expansum</i> 98%	121
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> 99%	28
	<i>Penicillium</i> sp. 100%	14
	<i>Sporobolomyces coprosmae</i> 99%	7

<sup>a</sup> Identification basée sur les séquences de la région ITS et comparaison avec les séquences de GenBank.

<sup>b</sup> Identifié comme *Ochroconis* sp. 1 (100% d'identité).

**Tableau 21.** Identification de champignons isolés dans les échantillons d'air prélevés en septembre de 2010

Point d'échantillonnage	Identification (% homologie)*	UfC/m <sup>3</sup> aire
9 Puits du Sorcier	<i>Cladosporium</i> sp. 99%	10
	<i>Cladosporium</i> sp. 99%	48
8 Cabinet des Félines	<i>Mortierella</i> sp. 98%	48
	<i>Cryptococcus dimennae</i> 97%	47
	<i>Doratomyces</i> sp. 98%	47
	<i>Penicillium</i> sp. 98%	66
7 Passage/Abside/Nef	<i>Verticillium leptobactrum</i> 99%	32
	<i>Sporobolomyces</i> sp. 98%	11
	<i>Cladosporium</i> sp. 99%	11
	<i>Bulleromyces albus</i> 99%	80
5 Diverticule Axial	<i>Arthroderma quadrifidum</i> 97%	190
4 Salle des Taureaux/Diverticule Axial	<i>Bulleromyces albus</i> 99%	85
	<i>Cladosporium</i> sp. 99%	85
3 Salle des Taureaux	<i>Doratomyces</i> sp. 98%	120
	<i>Penicillium</i> sp. 99%	20
	<i>Hirsutella</i> sp. 98%	68
2 SAS 2	<i>Cladosporium</i> sp. 99%	45
	<i>Penicillium brevicompactum</i> 99%	23
	<i>Penicillium</i> sp. 97%	23
	<i>Sporobolomyces roseus</i> 100%	11
	<i>Cladosporium</i> sp. 99%	433
1 Extérieur de la grotte	<i>Epicoccum nigrum</i> 99%	433
	<i>Penicillium</i> sp. 99%	46
	<i>Alternaria</i> sp. 99%	12
	<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i> 100%	12
	<i>Epicoccum nigrum</i> 99%	12
	<i>Epicoccum nigrum</i> 100%	12

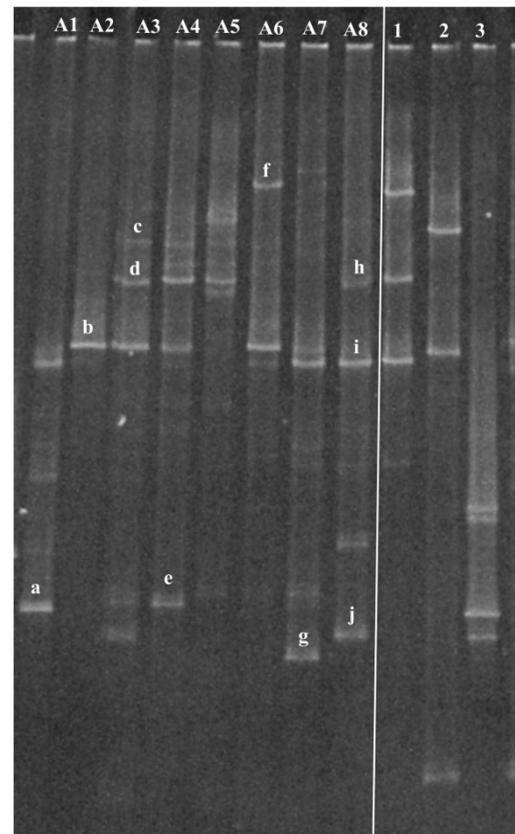
\*Identification basée sur la séquences de la région ITS et comparaison avec les séquences déposées dans GenBank.

### 6.3 Caractérisation moléculaire des communautés fongiques de l'air de la grotte

Lors de la campagne de prélèvements du 21 septembre 2010, des échantillons ont été récoltés pour la caractérisation moléculaire des communautés fongiques majoritaires par la technique DGGE. Huit échantillons (point de prélèvements 1 à 8) ont été prélevés avec l'équipement Coriolis (Bertin Technologies) (Figure 59).

Les profils DGGE des communautés fongiques sont présentés Figure 60. La comparaison des profils à ceux des champignons isolés dans les mêmes échantillons montre que quelques champignons majoritaires se distinguent dans les profils DGGE. Par exemple, dans l'échantillon A1 (extérieur de la grotte), les bandes correspondent aux deux champignons majoritaires (*E. nigrum* et *Cladosporium* sp.) se distinguent

nettement. Dans les échantillons A7 et A8, les bandes correspondant à *Cladosporium* sp. sont présentes. Dans le profil DGGE de l'échantillon du Passage (A6), une des bandes majoritaires correspond à *Exophiala* sp., montrant que les "levures noires" présentes dans les taches de cette zone sont dispersées par l'air.



**Figure 60.** Profils DGGE des échantillons d'air récoltés en septembre 2010 (A1-A8). Marqueurs: (1) *Exophiala* sp., *G. pannorum* et *Cladosporium* sp.; (2) *Cosmospora* sp., *Penicillium* sp. et *Acremonium nepalense*; (3) *Ochroconis* sp. 1 (LX A1). Bandes identifiées : (a) *Epicoccum nigrum*, (b) Ectomycorrhizes (*Atheliae*, *Amphinema*), (c, d et h) *Geomyces pannorum*, (e) Pleosporales, (f) *Exophiala* sp., (g et j) *Aspergillus* spp., (i) *Cladosporium* sp.



## 7. Résumé des principaux résultats et conclusions

La grotte de Lascaux, contrairement à d'autres grottes, ne peut être assimilée à un écosystème oligotrophe. Les événements qu'elle a connus au cours des 70 années qui ont suivi sa découverte l'ont transformée en un écosystème riche en matière organique, favorable au développement des microorganismes. Les interventions destinées à inhiber la croissance des microorganismes ont, au contraire, augmenté la disponibilité en éléments nutritifs et favorisé une diversification des espèces microbiennes.

La caractérisation chimique des profils d'acides gras des taches noires et d'une collection de bactéries et champignons isolés de la grotte a permis de montrer que les taches noires sont composées d'un mélange d'acides gras d'origine bactérienne et fongique. Un mélange composé de 9 souches bactériennes et de 9 souches fongiques présente le même profil d'acides gras que celui des taches noires et l'analyse des résultats par ACP montre que les acides gras du mélange microbien et des taches noires sont groupés dans le même ensemble.

Les bactéries et champignons actuellement présents dans la grotte n'appartiennent pas aux groupes microbiens habituellement rencontrés dans les grottes. Ils correspondent à des communautés qui ont été sélectionnées par les traitements. Cette conclusion est basée sur l'abondance des genres bactériens *Ralstonia* et *Pseudomonas* et de *Fusarium solani*, *Ochroconis* spp. *Exophiala* sp., *Acremonium nepalense*, etc. pour les champignons. Parmi ces microorganismes, certains doivent être décrits comme des espèces nouvelles.

L'ensemencement de milieu de culture en boîte de Petri avec une suspension réalisée à partir des microorganismes qui forment les taches noires montre que la présence de chlorure de benzalconium et de ses produits de dégradation stimule ou/et accélère la capacité des microorganismes à produire des mélanines. D'autre part le traitement au chlorure de benzalconium non seulement n'élimine pas les champignons mélanisés, mais favorise le développement d'autres espèces fongiques et ainsi augmente la diversité des espèces présentes. Ces nouvelles espèces fongiques appartiennent aux genres *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Engyodontium*, *Trichoderma*, etc. qui sont des champignons saprophytes, normalement présents dans l'air de la grotte.

Un échantillonnage exhaustif des taches noires, effectué d'août 2007 à février 2011, a montré qu'un des composants principaux des taches est une nouvelle espèce du genre *Ochroconis*. Une autre espèce d'*Ochroconis*, beaucoup moins abondante, a également été détectée. L'étude des caractères phénotypiques comme l'analyse moléculaire confirment la nouveauté de ces deux espèces d'*Ochroconis* qui sont proches mais différentes des espèces *O. tshawytschae* et *O. anellii*. Ces deux espèces d'*Ochroconis* identifiées à Lascaux seront prochainement décrites dans des publications et déposées dans une collection internationale. L'isolement et la caractérisation des mélanines produites par ces espèces et des espèces proches démontrent que ces mélanines possèdent des caractéristiques similaires et qu'elles proviennent d'une polymérisation de phénols. Les inhibiteurs de la synthèse de mélanines ayant pour précurseur le 1,8-dihydroxynaphtalène n'ont pas affecté la synthèse de mélanine d'*Ochroconis*, ce qui permet d'exclure cette voie de synthèse, très répandue chez les animaux.

L'étude des mélanines par spectroscopie Raman (SERS) a permis de définir trois pics, qui peuvent être considérés comme caractéristiques des espèces du genre *Ochroconis*. Ces pics sont également présents dans les mélanines extraites des taches noires et dans les excréments du collembole *Folsomia candida*, qui se nourrit du champignon. Dans les profils des taches noires avec présence abondante de collemboles ces trois pics sont très prononcés, indiquant un enrichissement en mélanines, du fait de la présence des mélanines non digérées dans les excréments des collemboles. La disposition caractéristique des taches noires, très proches les unes des autres et distribuées dans des zones déterminées est cohérente avec le comportement de dispersion par les collemboles.

Les espèces d'*Ochroconis* de Lascaux se développent dans une gamme de températures de 5 à 35 °C, l'optimum étant de 22 °C. Ces champignons présentent une grande adaptabilité métabolique, ils sont capables de métaboliser 66 des 95 sources de carbone évaluées (monosaccharides, disaccharides et polysaccharides, glucosides, acides organiques, aminoacides et tensioactifs) et utilisent nitrates, nitrites et ammonium comme source d'azote. Ils se développent en présence de faibles concentrations de chlorure de benzalconium et sont capables d'utiliser les produits de dégradation du chlorure de benzalconium comme source de carbone et azote. Parmi les 19 activités enzymatiques testées, les 2 souches d'*Ochroconis* donnent des résultats positifs pour 5 et 7 d'entre elles.

Les espèces d'*Ochroconis* sont largement distribuées dans la grotte. Une méthode spécifique de détection et de quantification d'*Ochroconis* par PCR en temps réel a été mise au point. Elle a été utilisée pour quantifier la présence d'*Ochroconis* dans les échantillons récoltés entre août 2008 et septembre 2010. Dans les taches noires, le pourcentage d'ADN d'*Ochroconis* représente entre 0.1 et 3% de l'ADN total et peut même atteindre 7,5 et 9,8%. L'ADN d'*Ochroconis* est également détecté dans les sédiments, mais en proportion plus faible. *Ochroconis* est également présent dans

l'air de la grotte comme le montre l'isolement de l'espèce la plus abondante *Ochroconis* sp. 1.

La technique d'électrophorèse en gel de gradient dénaturant (DGGE) a été utilisée pour caractériser les communautés de bactéries et champignons présents dans les échantillons de taches noires. La faible sensibilité de cette technique n'a pas permis mettre en évidence *Ochroconis lascauxensis* (*Ochroconis* sp. 1), bien que sa présence ait été détectée par la méthode de PCR en temps réel appliquée aux mêmes échantillons. Par contre la technique de DGGE a permis de révéler d'autres bandes, attribuées à des levures noires comme *Exophiala*, *Capronia* ou *Cladophialophora* et à une souche identifiée comme appartenant à l'espèce *Acremonium nepalense*. Des souches appartenant à ces genres, ainsi qu'*Ochroconis* ont été isolées des échantillons collectés en février 2011. De plus, ces levures noires, comme la souche d'*A. nepalense*, se sont révélées métaboliquement actives dans les échantillons prélevés en février 2011.

Les souches isolées des échantillonnages de l'année 2011 devront être étudiés avec plus de précision. Il s'agit des souches appartenant aux espèces de levures noires : *Exophiala moniliae*, *E. castellanii*, *Capronia coronata*, des souches d'*Acremonium*, et une nouvelle souche du groupe *Ochroconis/Scolecobasidium*, identifiée comme *S. dendroides*, mais appartenement à la nouvelle espèce *O. anomala* (*Ochroconis* sp. 2). Les études réalisées entre les années 2006 et 2007 par Bastian et al. (2009c) n'ayant détecté aucune levure de ce type, il est à craindre que ce nouveau groupe de microorganismes se développe et envahisse la grotte.

Il serait également nécessaire d'étudier la structure des mélanines produites par les levures noires pour évaluer leur contribution à la formation des taches noires. Il faut vérifier que les trois pics caractéristiques attribués à *Ochroconis* dans l'étude Raman (SERS) ne sont pas présents dans les profils des mélanines des levures noires.

La détection de protozoaires dans la grotte montre que la présence des espèces bactériennes *Legionella*, *Afpia* et *Aquicella*, est en relation avec ces protozoaires qui forment des kystes résistants au chlorure de benzalconium.

L'étude du comportement trophique du collembole *Folsomia candida* dans la grotte et au laboratoire a démontré que cet arthropode participe à la dispersion d'*Ochroconis* et des autres espèces de champignons et bactéries qui peuvent être véhiculés de façon passive par adhésion au corps du collembole. Une autre voie importante de dispersion est l'air, comme a montré l'étude d'aérobiologie. Les grandes différences observées dans les concentrations de bactéries et champignons dans l'air entre les échantillonnages de février et septembre 2010 invitent à étudier l'influence du climat et de l'équipement climatique dans l'aérobiologie de la grotte. Le rôle des collemboles dans la grotte peut paraître contradictoire. Leur activité permet d'une part de contrôler la croissance des champignons par ingestion, mais d'autre part elle contribue à la dispersion des spores adhérentes à la surface du corps et ingérées puis

expulsées non digérées avec les excréments. L'élimination des collemboles changerait l'équilibre écologique de la grotte, et pourrait conduire à une nouvelle invasion fongique car les champignons n'auraient plus de prédateurs. Au laboratoire, l'emploi d'insecticides (piretrines) sur une communauté de collemboles a eu pour conséquence une croissance explosive des champignons dans le sol.

En résumé, l'étude de l'écologie microbienne de la grotte de Lascaux a montré la complexité de l'écosystème, mais a permis de connaître le comportement des macro- et micro-organismes. La présence de nouvelles espèces de microorganismes non détectés lors des études précédentes doit alerter sur la dynamique de communautés microbiennes de la grotte et son évolution.

En réponse à la plus grande disponibilité de sources nutritives l'écosystème répond par une plus grande diversité et abondance d'espèces. De nouvelles espèces semblent être en train d'envahir la grotte. L'introduction de n'importe quelle source de carbone ou d'azote organique doit être évitée, car les communautés présentes sont capables de métaboliser une grande variété de composants organiques, y compris les biocides utilisés. De plus, les résidus ou les produits de décomposition du chlorure de benzalconium favorisent la croissance des bactéries et champignons et stimulent la mélanisation de ces derniers.

## 8. Perspectives de recherche dans la grotte de Lascaux

Dans ce rapport, nous avons indiqué les résultats qui nécessitent d'être confirmés et les voies de recherche qui n'ont pas pu être explorées faute de temps.

Il serait intéressant de compléter l'inventaire des microorganismes de la grotte en faisant appel aux dernières techniques de métagénomique, actuellement disponibles. Il est souhaitable de confirmer l'évolution récente des communautés associées aux taches noires et en particulier de préciser l'identité des nouvelles espèces qui se sont révélées métaboliquement actives lors des dernières analyses avec la technique DGGE. Il conviendrait également de déterminer quels sont les facteurs qui ont favorisé le développement de ces nouvelles populations et de préciser le rôle du chlorure de benzalconium et de ses produits de dégradation sur la mélanisation des champignons.

Les techniques d'analyse moléculaire mises au point au cours de ce travail devraient maintenant être plus amplement utilisées en particulier pour identifier les champignons et bactéries métaboliquement actifs, préciser les facteurs qui favorisent leur développement et proposer des moyens d'inhiber leur activité.

Il faut poursuivre la caractérisation structurale des mélanines d'*Ochroconis* et surtout celles des levures noires afin de déterminer quel type de métabolisme conduit à la synthèse des mélanines pour tenter de trouver des méthodes permettant d'interrompre ce processus de mélanisation.

Il semble nécessaire de compléter la caractérisation des macroorganismes présents dans la grotte, afin de visualiser les réseaux trophiques qui s'établissent entre macroorganismes et microorganismes de la grotte. La mise en évidence du rôle joué par les protozoaires et les collemboles invite à étudier le rôle potentiel des diptères. L'abondance de *Verticillium leptobactrum* et l'identification d'autres champignons entomopathogènes semblent indiquer la présence de nématodes, d'araignées et de coléoptères dans la grotte. Il conviendrait donc de confirmer la présence de ces macroorganismes et de définir leur rôle dans les réseaux trophiques.

La variabilité dans l'abondance et la composition des communautés bactériennes et fongiques dans les prélèvements effectués en février et septembre suggère que les variations climatiques pourraient jouer un rôle dans l'évolution des communautés

microbiennes au cours de l'année. Il pourrait être intéressant de modéliser l'effet d'un abaissement de la température sachant qu'il entrainerait un ralentissement du métabolisme microbien. Une telle étude devrait prendre en compte toutes les conséquences possibles de cet abaissement de la température sur les processus physico-chimiques et géochimiques, la formation de minéraux, d'efflorescences, etc. et bien sur la conservation des peintures.

Les résultats obtenus et les doutes concernant l'efficacité des traitements et leur capacité à modifier les équilibres microbiens indiquent qu'une conservation préventive de la grotte doit reposer sur l'élimination de tout apport de matière organique, y compris de biocides.

Ce projet de recherche conduit pendant deux années n'a pas permis de répondre à toutes les questions posées, mais il indique les pistes à explorer pour une meilleure compréhension des interactions devant conduire à la définition d'intervention de conservation préventive des peintures de la grotte de Lascaux.

## 9. Remerciements

Ce projet de recherche a principalement été financé par un contrat signé avec la DRAC d'Aquitaine. Ce contrat a permis l'embauche de Pedro M. Martín-Sánchez et de Fabiola Bastian qui se sont entièrement consacrés à ce travail.

Cette recherche a également été financée par un projet espagnol "Programa de Investigación en Tecnologías para la Conservación y Revalorización del Patrimonio Cultural", CSD2007-00058, qui a permis de couvrir en grande partie les frais de fonctionnement de l'équipe de l'Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, Seville, Espagne.

La complexité du sujet a nécessité la collaboration de collègues spécialisés dans d'autres domaines scientifiques. Ces collègues ont bénéficié de financement émanant du Ministère de la Science et l'Innovation d'Espagne, de l'Institut de Biologie du Sol, České Budějovice, Czech Republic, de l'Instituto de Estructura de la Materia, CSIC, Madrid, Espagne, le Département de Microbiologie et de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, Université de Séville, Espagne, et le Département de Biologie Végétale, Faculté de Pharmacie, Université de Barcelone, Espagne.

Les auteurs tiennent à exprimer leur gratitude à Muriel Mauriac, Alina Moskalik Detalle et son équipe, Stéphane Konik, Sandrine van Solinge et tous ceux et celles qui ont permis la réalisation de ce travail en facilitant l'accès à la grotte, participant aux prélèvements des échantillons et réalisant les prises de vue.



# 10. Références bibliographiques

Abdelahad N, Bazzichelli G. 1988. *Geitleria calcarea* Friedmann, Cyanophyceae cavernicole nouvelle pour l'Italie. *Nova Hedwigia*, 46:265-270.

Aboal M, Asencio AD, Prefasi M. 1994. Studies on cave cyanophytes from southeastern Spain: *Scytonema julianum* (Meneghini ex Franck) Richter. *Algological Studies*, 75:31-36.

Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. 2009a. Impact of biocide treatments on the bacterial communities of the Lascaux Cave. *Naturwissenschaften*, 96: 863-868.

Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. 2009b. Bacteria and free-living amoeba in Lascaux Cave. *Research in Microbiology*, 160: 38-40.

Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. 2009c. The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux Cave. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1456–1462.

Caumartin V. 1963. Review of the microbiology of underground environments. *National Speleology Society Bulletin*, 25: 1-14.

Centeno S, Shamir J. 2008. Surface enhanced Raman scattering (SERS) and FTIR characterization of the sepia melanin pigment used in works of art. *Journal of Molecular Structure*, 873: 149-159.

Chelius MK, Moore JC. 2004. Molecular phylogenetic analysis of Archaea and Bacteria in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal*, 21: 123-134.

Chelius, MK, Beresford, G, Horton, H, Quirk, M, Selby, G, Simpson, RT, Horrocks, R, Moore, JC. 2009. Impacts of alterations of organic inputs on the bacterial community within the sediments of Wind Cave, South Dakota, USA. *International Journal of Speleology*, 38: 1-10.

Cunningham KI, Northup DE, Pollastro RM, Wright WG, LaRock EJ. 1995. Bacteria, fungi and biokarst in Lechuguilla Cave, Carlsbad Caverns National Park, New Mexico. *Environmental Geology*, 25: 2-8.

de Hoog GS, von Arx JA. 1973. Revision of *Scolecobasidium* and *Pleurophragmium*. *Kavaka*, 1: 55-60.

de Hoog GS. 1985. Taxonomy of the *Dactylaria* complex, IV. *Dactylaria*, *Neta*, *Subilispora*, and *Scolecobasidium*. *Studies in Mycology*, 26: 1-60.

de la Cruz TEE, Schulz BE, Kubicek CP, Druzhinina IS. 2006. Carbon source utilization by the marine *Dendryphiella* species *D. arenaria* and *D. salina*. *FEMS Microbiology Ecology*, 58: 343-353.

Dromph KM. 2003. Collembolans as vectors of entomopathogenic fungi. *Pedobiologia (Jena)*, 47: 245-256.

Dupont J, Jacquet C, Denetiere B, Lacoste S, Bousta F, Oriol G, Cruaud C, Couloux A, Roquebert MF. 2007. Invasion of the French Paleolithic painted cave of Lascaux by members of the *Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 99: 526-533.

Edwards U, Rogall T, Bliicker H, Emde M, Bottger EC. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 19: 7843-7853.

Godoy G, Rodriguez-Kabana R, Morgan-Jones G. 1982. Parasitism of eggs of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne arenaria* by fungi isolated from cysts of *H. glycines*. *Nematropica*, 12: 111-119.

Gonzalez JM, Portillo MC, Saiz-Jimenez C. 2006. Metabolically active Crenarchaeota in Altamira Cave. *Naturwissenschaften*, 93: 42-45.

Gorbushina AA, Lyalikova NN, Vlasov DY, Khizhnyak TV. 2002. Microbial communities on the monuments of moscow and St. Petersburg: Biodiversity and trophic relations. *Microbiology*, 71: 350-356. (Translated from *Mikrobiologiya*, 71: 409-417).

Graniti A. 1962. *Scolecobasidium anellii* n. sp., agente di annerimenti superficiali di stalattiti. *Giornale Botanico Italiano*, 69: 360-365.

Greif MD, Currah RS. 2007. Patterns in the occurrence of saprophytic fungi carried by arthropods caught in traps baited with rotted wood and dung. *Mycologia*, 99: 7-19.

Hardisson C, Pochon J. 1966. Synthèse de substances para-humiques par *Azotobacter chroococcum*. I. Conditions de culture et extraction de la substance. *Annales de l'Institute Pasteur (Paris)*, 111: 66-75.

Hernandez-Marine M, Canals T. 1994. *Herpyzonema pulverulentum* (Mastigocladaceae) a new cavernicolous atmophytic and lime-incrusted cyanophyte. *Algological Studies*, 75: 123-136.

Holmes AJ, Tujula NA, Holley M, Contos A, James JM, Rogers P, Gillings MR. 2001. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environmental Microbiology*, 3: 256-264.

Jurado V, Porca E, Cuezva S, Fernandez-Cortes A, Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C. 2010. Fungal outbreak in a show cave. *Science of the Total Environment*, 408: 3632-3638.

Juretschko S, Timmermann G, Schmid M, Schleifer KH, Pommering-Röser A, Koops HP, Wagner M. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3042-3051.

Kirilenko TC, Al-Achmed MA. 1977. *Ochroconis tshawytschae*. *Mikrobiologichnii Zhurnal*, 39: 303-306

Kiyuna, T, An, K-D, Kigawa, R, Sano, C, Miura, S, Sugiyama, J. 2008. Mycobiota of the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan, focusing on the molecular phylogenetic diversity of *Fusarium* and *Trichoderma*. *Mycoscience*, 49: 298-311.

Kroon AG, Pomper MA, Ginkel G van. 1994. Metabolism of dodecyldimethylamine of *Pseudomonas* MA3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42: 134-139.

Laiz L, Groth I, Gonzalez I, Saiz-Jimenez C. 1999. Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). *Journal of Microbiological Methods*, 36: 129-138.

Langecker TG, Wilkens H, Parzefall J. 1996. Studies on the trophic structure of an energy-rich Mexican cave (Cueva de las Sardinias) containing sulfurous water. *Memoires Bioespeologie*, 23: 121-125.

Lefèvre M. 1974. La maladie verte de Lascaux. *Studies in Conservation*, 19: 126-156.

Li X, Brune A. 2005. Selective digestion of the peptide and polysaccharide components of synthetic humic acids by the humivorous larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1476-1483.

Liu YJ, Whelen S, Hall BD. 1999. Phylogenetic relationships among Ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1799-1808.

Lock K, Adriaens T, Stevens M. 2010. Distribution and ecology of the Belgian *Campodea* species (Diplura: *Campodeidae*). *European Journal of Soil Biology*, 46: 62-65.

Matsumoto T, Padhye AA, Ajello L. 1987. Medical significance of the so-called black yeast. *European Journal of Epidemiology*, 3: 87-95.

Nagai K, Ohta S, Zenda H, Matsumoto H, Makino M. 1996. Biochemical characterization of a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from a benzalkonium chloride solution. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19: 873-875.

Nishiyama N, Okamoto T, Nishiyama N. 2000. Biodegradation of dodecyldimethylammonium chloride by *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 641-647.

Palacios-Vargas JG. 2002. La distribución geográfica de los Collembola en el mundo subterráneo. *Boletín Sociedad Venezolana de Espeleología*, 36: 1-5.

Page FC. 1967a. Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of three new species of *Hartmannella* and three of *Vahlkampfia*. *Journal of Protozoology*, 14: 499-521.

Page FC. 1967b. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *Journal of Protozoology*, 14: 709-724.

Page FC. 1976. An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoeba with Notes on Cultivation and Ecology. *Freshwater Biological Association of Science. Publication N° 34*, 1-155.

Patrauchan MA, Oriol PJ. 2003. Degradation of benzyldimethylalkylammonium chloride by *Aeromonas hydrophila* sp. K. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 266-272.

Peck SB. 1986. Bacterial deposition of iron and manganese oxides in North American caves. *National Speleology Society Bulletin*, 48: 26-30.

Pussard M, Pons R. 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, 13: 557-598.

Revankar SG, Sutton DA. 2010. Melanized fungi in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 23: 884-928.

Roldán, M, Thomas, F, Castel, S, Quesada, A, Hernández-Mariné, M. 2004. Noninvasive pigment identification in living phototrophic biofilms by confocal imaging spectrophotometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3745-3750.

Rutherford JM, Huang LH. 1994. A study of fungi of remote sediments in West Virginia caves and a comparison with reported species in literature. *National Speleology Society Bulletin*, 56: 38-45.

Saiz-Jimenez C, Hermosin B. 1999. The nature of the organic matter present in dripping waters from Altamira cave. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 49: 337-347.

Saiz-Jimenez C, Ortega-Calvo JJ, Leeuw JW de. 1995. The chemical structure of fungal melanins and their possible contribution to black stains in stone monuments. *Science of the Total Environment*, 167: 305-314.

Sanchez-Cortes S, Corrado G, Trubetskaya OE, Trubetskoj OA, Hermosin B, Saiz-Jimenez C. 2006. Surface-enhanced Raman spectroscopy of chernozem humic acid and their fractions obtained by coupled size exclusion chromatography-polyacrylamide gel electrophoresis (SEC-PAGE). *Applied Spectroscopy*, 60: 48-53.

Sarbu SM, Kane TC, Kinkle BK. 1996. A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science*, 272: 1953-1955.

Sawahata T. 2006. Hymenial area of agaric fruit bodies consumed by Collembola. *Mycoscience*, 47: 91-93.

Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, Lubitz R, Rölleke S. 2002. Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiology Letters*, 211: 7-11.

Suryanarayanan TS, Ravishankar JP, Venkatesan G, Murali TS. 2004. Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte. *Mycological Research*, 108: 974-978.

Schneider K, Maraun M. 2005. Feeding preferences among dark pigmented fungal taxa ("Dematiacea") indicate limited trophic niche differentiation of oribatid mites (*Oribatida*, *Acari*). *Pedobiologia (Jena)*, 49: 61-67.

Sterflinger K. 2006. Black yeasts and meristematic fungi: Ecology, diversity and identification. In: Peter G, Rosa C. (eds.) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, The Yeast Handbook*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 501-514.

Thompson JP. 1989. Counting viable *Azotobacter chroococcum* in vertisols. II. Comparison of media. *Plant Soil*, 117: 17-29.

Urzi C. 2004. Microbial deterioration of rocks and marble monuments in Mediterranean Basin: A review. *Corrosion Reviews*, 22: 441-457.

van Ginkel G, van Dijk JB, Kroon AG. 1992. Metabolism of hexadecyltrimethylammonium chloride in *Pseudomonas* strain B1. *Applied and Environmental Microbiology*, 17: 1145-1151.

Visvesvara GS. 1991. Classification of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases*, 13, Supplement 5: S369-S372.

Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 661-671.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (eds), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, USA, pp. 315-322.

Wollenzien U, de Hoog GS, Krumbein WE, Urzì C. 1995. On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *The Science of the Total Environment*, 167: 287-294.



Le principal objectif de ce projet était d'étudier l'écologie et les processus de succession microbienne qui se produisent dans la grotte. La grotte constitue un écosystème dynamique, les populations microbiennes évoluent avec le temps et nous avons pu constater à l'échelle de ces derniers 24 mois, que les profils microbiens sont en train de changer. Au cours des dix dernières années, nous avons assisté à l'invasion par **Fusarium solani** puis à celle des «taches noires» et actuellement nous observons une évolution au sein des communautés fongiques associées aux «taches noires». Celles-ci ont révélé en 2007, la présence d'une nouvelle espèce de champignon, **Ochronis lascauxensis**, apparemment originale à Lascaux, et actuellement nous constatons l'apparition de levures noires et d'autres champignons mélanisés. La cause de cette évolution complexe et de cette succession de microorganismes au sein des communautés formant les «taches noires» est vraisemblablement l'utilisation de biocides dont les résidus constituent une source de carbone et d'azote utilisable par beaucoup de microorganismes.



Instituto de Recursos  
Naturales y Agrobiología  
de Sevilla

