

# Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France

## Academic Notes of the French Academy of agriculture

### Authors

Hervé This

### Title of the work

Ecologie microbienne de la grotte de Lascaux

Year 2016, Volume 2, Number 5, pp. 1-21

### Published online:

14 February 2023,

<https://www.academie-agriculture.fr/publications/notes-academiques/n3af-note-de-recherche-ecologie-microbienne-de-la-grotte-de-lascaux>

[Ecologie des grottes de Lascaux](#) © 2016 by Alabouvette C. et Saiz-Jimenez C is licensed under

[Attribution 4.0 International](#) 

Note de recherche

# Écologie microbienne de la grotte de Lascaux

## *Microbial ecology of the Lascaux cave*

Claude Alabouvette<sup>1</sup>, Cesareo Saiz-Jimenez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Directeur de recherche honoraire à l'Inra

<sup>2</sup> Instituto de recursos Naturales y Agrobiologia, IRNAS-CSIC, Avda. Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, Espagne

**Correspondance:**

c.ala@free.fr

**Résumé :**

La grotte de Lascaux, universellement connue pour ses peintures rupestres, a connu, depuis sa découverte, plusieurs épisodes de développement microbien qui menaçaient la conservation des peintures murales. A partir de 2005, un programme de recherches a été développé afin d'identifier les micro-organismes présents et de mettre en évidence les processus de successions microbiennes qui se produisent dans la grotte. Celle-ci constitue un écosystème dynamique où les communautés microbiennes évoluent au cours du temps et sous l'influence des traitements biocides destinés à contrôler la prolifération de certaines espèces jugées envahissantes. Ces travaux ont permis d'identifier deux nouvelles espèces fongiques : *Ochroconis lascauxensis* et *O. anomala*. Le développement de ces champignons formant des taches noires sur la paroi de la cavité a vraisemblablement été favorisé par l'utilisation de produits biocides dont les résidus constituent des sources de carbone et d'azote utilisables par certaines espèces microbiennes, bactériennes et fon-

giques. Ces résultats montrent que, pour assurer la conservation des peintures murales, il convient de prendre en considération l'ensemble des communautés d'organismes présents dans la grotte avant d'entreprendre tout traitement visant à contrôler une population donnée.

**Abstract:**

Since its discovery the Lascaux cave has suffered several events of uncontrolled microbial development, which have been dangerous for the conservation of the wall paintings. Starting in 2005, a research program has been aiming at identifying the microbial populations present in the cave and describing the microbial successions. The Lascaux cave constitutes a dynamic ecosystem in which the microbial communities evolve with time and under the effects of the biocide treatments used to control proliferating microbial species. This study permitted to

## Note de recherche

identify two new fungal species *Ochroconis lascauxensis* and *O. anomala*, apparently original in Lascaux. The development of these fungi, forming black spots on the walls of the cave, was probably favored by the use of biocide products which transformed residues can be used by several microorganisms as carbon and nitrogen sources. These results point out the necessity to consider all the communities of organisms living in the cave before using biocide treatments to try to control a given microbial species.

### Keywords :

microbial communities, bacteria, fungi, protozoa, arthropods, biocide treatments

### Mots clefs :

communautés microbiennes, bactéries, champignons, protozoaires, arthropodes, traitements biocides

### Avant-propos

Les principaux résultats présentés ci-dessous ont été obtenus lors des travaux réalisés entre 2005 et 2011, dans le cadre de deux projets de recherche financés par le Ministère de la Culture via la DRAC d'Aquitaine, à savoir :

- le projet « Microbiologie/micro-climat », qui visait à corréliser (1) la colonisation fongique visible à la surface des substrats, (2) la nature de ces substrats et (3) les conditions micro-climatiques qui règnent à l'interface substrat/atmosphère ;
- le projet « Écologie microbienne », dont le principal objectif était d'étudier les processus de successions microbiennes qui se produisent dans la grotte.

Ces projets associaient plusieurs équipes de plusieurs pays européens. Les résultats obtenus par l'ensemble des participants ont fait

l'objet de comptes rendus réguliers, présentés devant le Comité Scientifique International de la Grotte de Lascaux, et de publications scientifiques, parues dans des revues internationales à comité de lecture. Nous présentons ici une synthèse des principaux résultats obtenus par les équipes de l'INRA de Dijon et de IRNAS-CSIC (Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología-Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Séville, en nous inspirant largement du rapport final du projet « Écologie microbienne » publié en 2011 (Alabouvette et Saiz-Jimenez, 2011). Les illustrations de cet article ont toutes été déjà présentées dans ce rapport final. Les méthodes utilisées sont décrites dans les publications scientifiques correspondantes dont les références sont citées à la fin de cet article.

Nos recherches se sont interrompues en 2011, car la poursuite de ce travail a été confiée à une autre équipe, qui, à notre connaissance, n'a pas encore communiqué ses résultats. Cette synthèse ne concerne donc que les résultats acquis avant juin 2011.

Nous tenons à remercier ici, tous les chercheurs qui, outre les deux auteurs de cet article, ont contribué à ces travaux :

Pedro M. Martín-Sánchez (IRNAS-CSIC, Espagne)  
Fabiola Bastian (INRA-Dijon, France)  
Valme Jurado (IRNAS-CSIC, Espagne)  
Alena Nováková (ISB, Ceske Budejovice, République tchèque)  
Estefanía Porca (IRNAS-CSIC, Espagne)  
Santiago Sánchez-Cortés (IEM-CSIC, Espagne)  
Angela García-Sánchez (IRNAS-CSIC, Espagne)  
Concepción Ariza (Facultad de Farmacia, Séville, Espagne)

## Note de recherche

### 1. Historique des épisodes de développement microbien dans la grotte de Lascaux

Depuis sa découverte, la grotte de Lascaux a connu plusieurs épisodes de développement microbien qui ont menacé la préservation des peintures pariétales pour lesquelles elle est célèbre. Le premier événement (1962, 1963), qualifié de « maladie verte », a conduit à la fermeture de la grotte aux visites touristiques, car cette première « contamination » était très probablement une conséquence des aménagements importants effectués pour permettre les visites (Lefèvre, 1974). Ce sont vraisemblablement les modifications climatiques engendrées par le flux de visiteurs et l'apport de lumière, pendant plusieurs heures chaque jour, qui ont favorisé le développement d'algues vertes, photosynthétiques. Le second événement (2001) s'est manifesté à la suite de travaux qui ont eu pour conséquence de perturber le « climat » de la grotte et de favoriser la prolifération de moisissures blanches attribuées à un champignon d'origine tellurique : *Fusarium solani*.

Le dernier événement en date (2007), celui du développement de « taches noires » attribuées au champignon mélanisé *Ochroconis lascauxensis*, peut être corrélé à des déséquilibres microbiens provoqués par l'application de traitements biocides destinés à lutter contre les moisissures blanches.

En effet, pour préserver les peintures rupestres, chaque épisode de développement microbien a été suivi d'une période plus ou moins longue de traitements biocides destinés à juguler la prolifération microbienne. Ainsi la maladie verte a été traitée par application de méthanal (formol), mais l'application de ce composé sur les sédiments constituant les sols s'est poursuivie pendant de nombreuses années, sans que ses effets à long terme aient été évalués.

La prolifération de *F. solani*, en septembre 2001, nécessitait une intervention d'urgence,

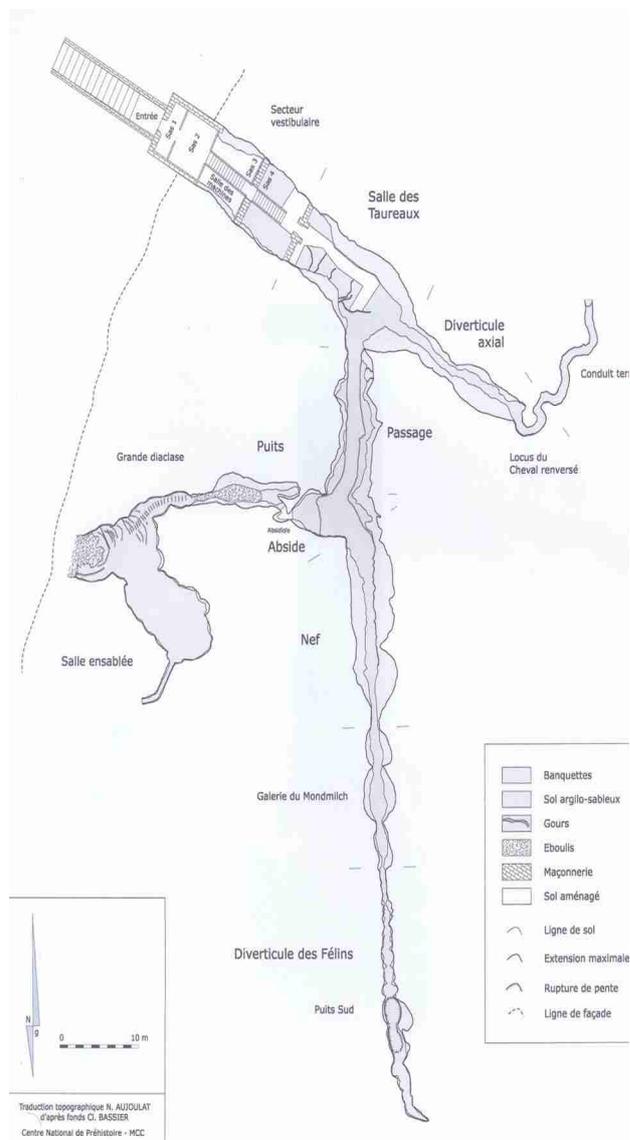


Figure 1. Schéma présentant les différents compartiments de la grotte de Lascaux (source Centre National de la Préhistoire).

qui s'est traduite par un traitement des sols à la chaux vive et des traitements des parois à l'aide d'ammoniums quaternaires, en particulier de chlorure d'alkyl-diméthyl-benzyl-ammonium, associés ou non à des antibiotiques (sulfate de streptomycine et polymyxine) mis en suspension dans l'eau ou dans l'alcool. Ces traitements se sont

### Note de recherche

poursuivis à des fréquences relativement élevées jusque fin 2003.

Parallèlement des procédés mécaniques d'élimination des colonies fongiques à la surface des zones non ornées ont été mis en œuvre, en vue d'éradiquer *F. solani*. Le développement des « taches noires », en juillet 2007, a conduit à appliquer un traitement expérimental à base d'ammoniums quaternaires associés à un fongicide (octylisothiazolinone). Plusieurs applications de différents produits ont été effectuées entre janvier 2008 et février 2009, avant une mise au repos de la grotte pendant trois mois.

A chaque épisode, l'attention s'est focalisée uniquement sur les organismes identifiés comme responsables des désordres et qui ont fait l'objet des traitements biocides. L'effet de ces derniers n'a été apprécié que par observation du comportement des organismes visés, sans que le microbiote ne soit pris en compte dans sa globalité. Or tout traitement a des effets non intentionnels sur des populations non-cibles et perturbe les équilibres microbiens.

Ces perturbations peuvent avoir des conséquences néfastes plusieurs mois, voire plusieurs années, après l'application du traitement. Il était donc indispensable d'identifier l'ensemble des communautés microbiennes de la grotte de Lascaux et d'étudier leurs interactions afin d'éviter des proliférations microbiennes dangereuses pour la conservation des œuvres d'art.

Il convient de préciser ici que le terme de « contamination », qui a été employé pour décrire la prolifération des algues vertes, puis de *F. solani*, est inapproprié. Il est plus exact de parler de colonisation apparente et potentiellement dangereuse pour la sauvegarde des peintures rupestres. En effet, le champignon *F. solani* qui a proliféré à l'automne 2001 n'est pas à proprement parlé un contaminant ; il n'a pas été introduit dans la grotte, mais préexistait certainement à la prolifération observée en 2001.

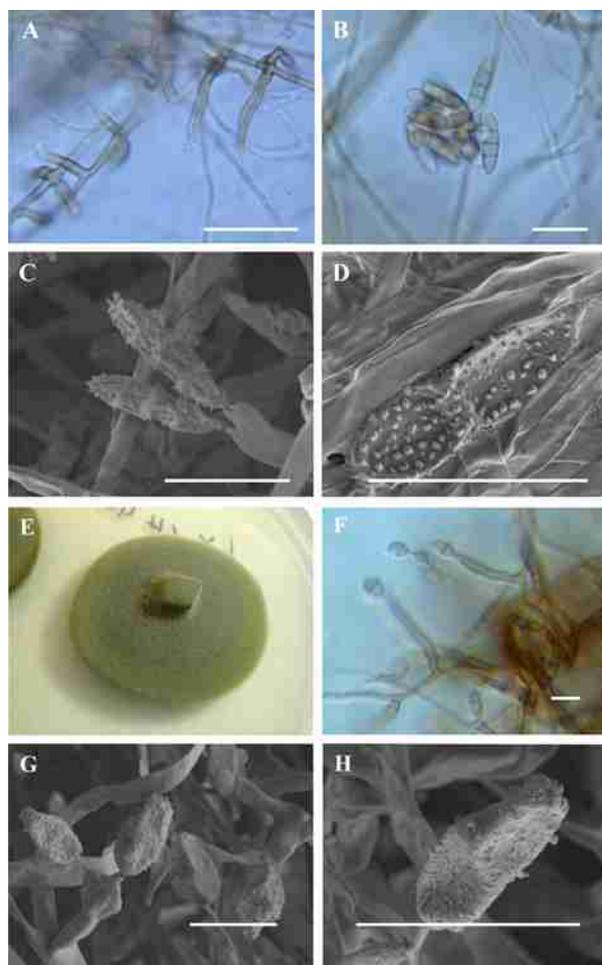


Figure 2. Structures microscopiques des souches d'*Ochroconis* spp. isolées de la grotte de Lascaux. *Ochroconis lascauxensis* : cellules conidiogènes (A) et conidies (B, C et D). *Ochroconis anomala* : colonie après 1 mois de culture (E), cellules conidiogènes (F) et conidies (F, G et H). Barre d'échelle 10  $\mu$ m.

Les *Fusarium*, et l'espèce *F. solani* en particulier, sont des constituants habituels de la microflore des sols. Ils représentent, selon les auteurs, 10 à 20 % des champignons cultivables isolés des sols agricoles où ils ont été cherchés. Ce sont des champignons saprophytes se développant aux dépens des matières organiques. Cependant ils peuvent

Note de recherche

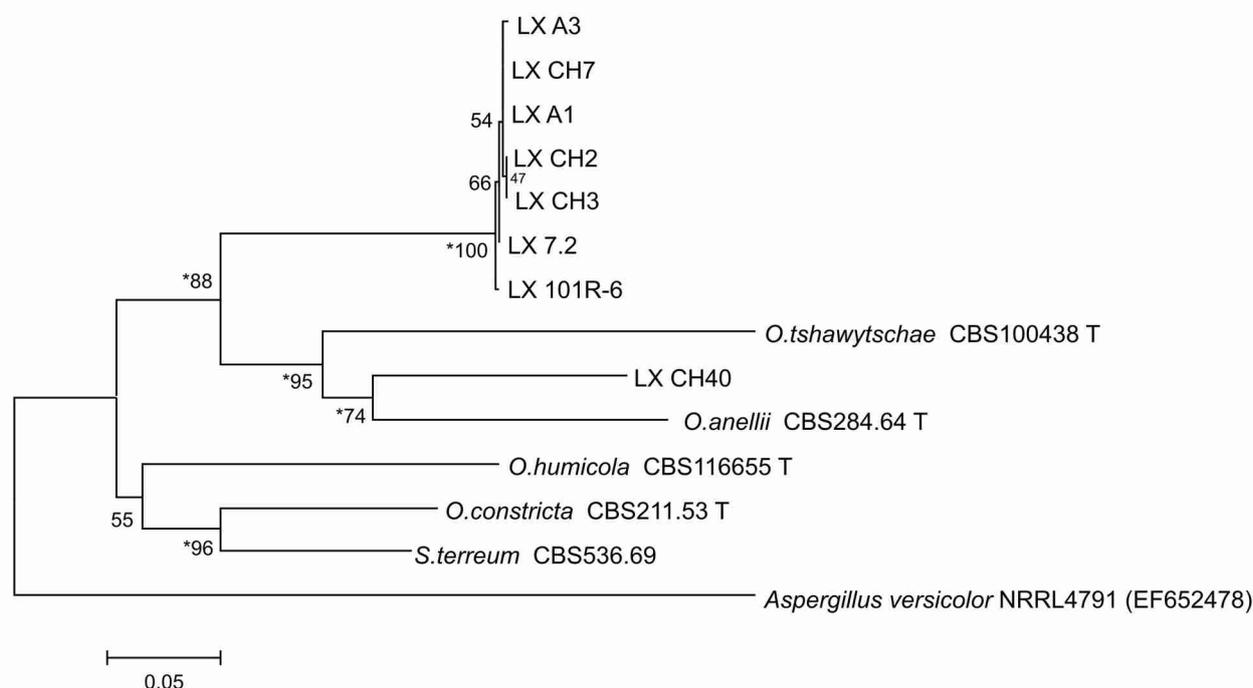


Figure 3. Relations phylogénétiques entre les isolats d'*Ochroconis* spp. de la grotte de Lascaux et les isolats de référence. Analyse fondée sur l'alignement multiple de la région internal transcribed spacer (ITS), réalisé en comparant 680 nucléotides. L'arbre a été établi par la méthode de neighbour-joining utilisant 10000 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 de nucléotides par position.

également se conserver sous forme de chlamydospores (spores de conservation) inactives pendant plusieurs années. Il est donc vraisemblable que *F. solani* a toujours été présent dans les sédiments et à la surface des supports rocheux de la grotte.

De plus, une étude de caractérisation des souches (Dupont *et al.*, 2007) a montré que la population isolée de la grotte n'est pas homogène ; elle présente une diversité qui permet de caractériser plusieurs sous-espèces de *F. solani*. Cela montre que la colonisation de l'automne 2001 ne résulte probablement pas de l'introduction accidentelle d'une souche, mais bien de conditions environnementales particulières qui ont favorisé le développement mycélien de ce champignon à la surface des substrats.

Signalons enfin que *F. solani* est un champignon imparfait, qui produit deux types de conidies : des microconidies unicellulaires et des macroconidies pluricellulaires, en forme de croissant, qui sont produites dans des gouttelettes de mucus. Ces dernières ne sont donc pas transportables par le vent. Leur dissémination est assurée par les gouttes de pluie, par des insectes ou, encore, par des particules de sol ou des résidus végétaux. Dans les conditions confinées de la grotte de Lascaux, la dissémination des spores de *F. solani* est donc *a priori* très limitée et l'apparition de colonies en divers points suggère une germination de chlamydospores préexistantes.

Comme tous les champignons, *F. solani* est hétérotrophe, c'est-à-dire qu'il ne peut se

## Note de recherche

développer qu'aux dépens de matières organiques. Le développement important observé dans la grotte suppose donc l'existence d'une source de carbone organique disponible pour la croissance des hyphes de ce champignon.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées : les matières organiques ont pu être apportées par les eaux de percolation ; elles pourraient aussi provenir des résidus des traitements biocides appliqués au cours des années qui ont précédées l'infestation ; enfin elles pourraient résulter de l'association de ce champignon avec des bactéries.

Il est très difficile d'examiner ces différentes hypothèses. Nous savons, pour l'avoir vérifié, que les champignons du genre *Fusarium* sont capables d'utiliser des sources de carbone variées : ils peuvent utiliser l'éthanol comme le formol, et nous avons montré que les souches de *F. solani* isolées de la grotte sont toutes résistantes au formol utilisé régulièrement pendant plus d'une vingtaine d'années à titre de traitement préventif.

L'éthanol a également été utilisé pour mettre en solution certaines des molécules biocides utilisées pour traiter la cavité. Or, à faible concentration, l'éthanol constitue une source de carbone facilement utilisable par les *Fusarium* spp.

Enfin il est apparu que les colonies de *F. solani* étaient souvent associées à des colonies de *Pseudomonas* spp. : cette association pourrait expliquer la résistance des *Fusarium* aux traitements biocides. Certaines souches de *Pseudomonas* spp. sont en effet capables de détoxifier les molécules d'ammonium quaternaires qui, une fois transformées, servent de substrat pour la croissance des *Fusarium* spp.

Il est clair, pour l'écologiste microbien, qu'il est impossible de tenter de comprendre les raisons du développement de ces *F. solani* sans prendre en considération les autres micro-organismes qui se développent à la surface des substrats de la grotte. Les recherches

devaient donc s'orienter vers la description des biofilms et des interactions entre micro-organismes, champignons et bactéries qui constituent ces biofilms.

## 2. Brève revue bibliographique relative aux communautés microbiennes des grottes

Avant d'aborder les recherches consacrées à l'écologie microbienne de la grotte de Lascaux, il convient de rappeler que des micro-organismes sont présents dans tous les habitats de la biosphère, y compris dans les habitats souterrains. Ces habitats sont caractérisés par l'absence de lumière, une quantité limitée, voire l'absence, de nutriments organiques, une température et un degré hygrométrique relativement constants et une grande surface de minéraux à coloniser.

La bibliographie traitant des communautés microbiennes des grottes est peu abondante et limitée à un petit nombre de grottes. Plus rares encore sont les travaux qui présentent une étude complète de l'ensemble des micro-organismes 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 plupart des articles sont consacrés à des aspects spécifiques, tel 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 à la lumière (Abdelahad et Bazzichelli, 1988 ; Aboal *et al.*, 1994 ; Hernandez Marine et Canals, 1994).

De nombreux résultats publiés sont contradictoires, et il est possible de résumer les données de la littérature en concluant que les communautés microbiennes présentes dans les grottes sont le reflet des caractéristiques de chaque écosystème où les substrats, les niveaux de matière organique et

### Note de recherche

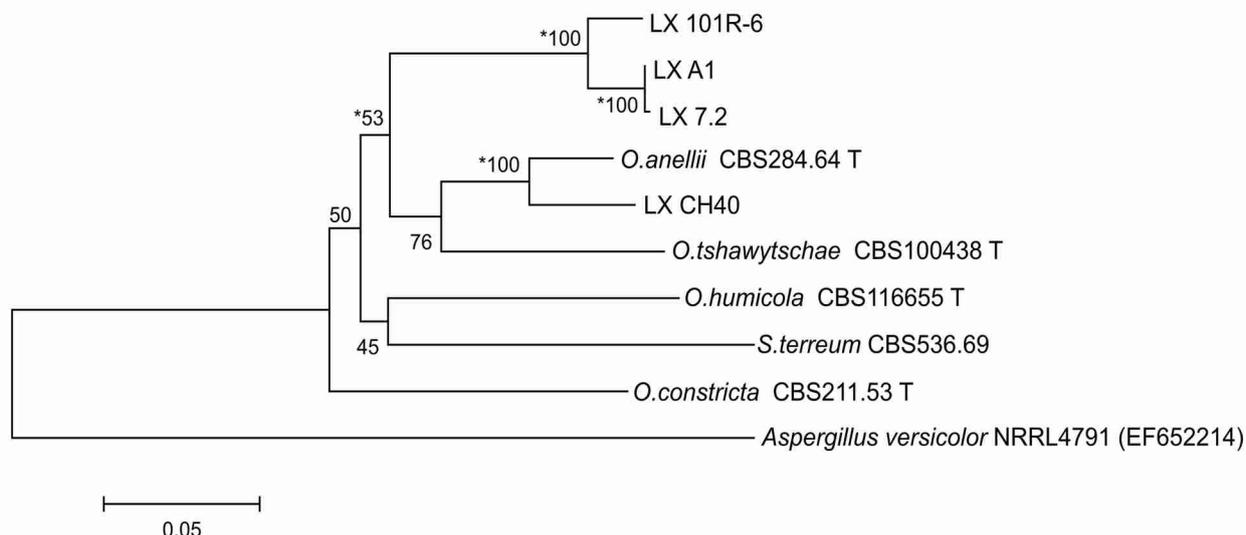


Figure 4. Relations phylogénétiques entre les isolats d'*Ochroconis* spp de la grotte de Lascaux et les isolats de référence. Analyse fondée sur l'alignement multiple de la région RPB2 (RNA polymérase 2 gene), réalisé en comparant 704 nucléotides. L'arbre a été établi par la méthode de neighbour-joining utilisant 10 000 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.

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.

### 3. Diversité des espèces bactériennes et fongiques présentes sur les parois de la grotte de Lascaux.

Lorsque nous avons commencé ce travail, comme indiqué ci-dessus, la microbiologie et l'écologie de la grotte de Lascaux étaient très mal connues. Les seuls travaux facilement accessibles aux scientifiques étaient les travaux de Lefèvre (Lefèvre, 1974), qui présentaient les effets de la maladie verte, et

ceux de Dupont *et al.* (2007), qui ont identifié les souches de *F. solani* isolées de la grotte en 2001. Nous n'avions aucune connaissance des communautés microbiennes présentes dans la grotte ; les seuls paramètres pris en compte pour juger de l'efficacité des interventions chimiques et mécaniques de désinfection avaient été l'extension ou la régression des colonies « blanches ».

C'est pourquoi notre premier objectif visait à dresser un inventaire des principales espèces bactériennes et fongiques présentes sur les parois et les sols dans les différents compartiments de la grotte de Lascaux. En effet, celle-ci est divisée en plusieurs compartiments (Figure 1) qui présentent des caractéristiques différentes, les développements microbiens étant plus fréquents dans certains compartiments que dans d'autres. Il était donc important de dresser un inventaire des populations de micro-organismes de chacun de ces

### Note de recherche

compartiments, afin de pouvoir éventuellement établir des corrélations entre diversité microbienne et caractéristiques environnementales des différents secteurs de la grotte.

Une contrainte propre à la grotte de Lascaux est l'interdiction de toucher aux gravures rupestres et, donc, de prélever des échantillons à la surface des parois ornées. Nous avons cependant été autorisés à réaliser, d'une part, des prélèvements au coton tige à la surface de zones visiblement colonisées par des micro-organismes et, d'autre part, des prélèvements de « substrat » à la surface des sols ou des banquettes.

A partir de ces échantillons, nous avons d'une part réalisé des mises en culture sur différents milieux gélosés, afin de constituer une collection de micro-organismes issus de la grotte, et nous avons d'autre part extrait l'ADN, soit directement à partir des échantillons de substrat, soit à partir des micro-organismes en culture pour réaliser une identification moléculaire des micro-organismes par séquençage des régions codant l'ARN ribosomique. Les méthodes employées sont décrites dans les publications consacrées respectivement à l'inventaire des bactéries et des champignons de la grotte (Bastian *et al.*, 2009 a, b et c).

Qu'il s'agisse des champignons ou des bactéries, nos résultats ont révélé une grande diversité de génotypes et montrent que les *F. solani* et les *Pseudomonas* fluorescents qui avaient précédemment retenu l'attention n'étaient absolument pas dominants sur les parois de la cavité, et cela quel que soit le compartiment considéré.

Parmi les 696 clones bactériens obtenus, les plus représentés correspondent aux espèces suivantes : *Ralstonia mannitolilytica*, *Ralstonia pickettii*, suivies par *Pseudomonas saccharophila*, *Escherichia coli*, *Achromobacter xylosoxidans* et *Pseudomonas lanceolata*. Moins fréquemment représentées sont des espèces appartenant aux genres *Afipia* et

*Legionella*, suivies de *Stenotrophomonas maltophilia* et *Acquicella* spp. Enfin un petit nombre de clones correspondent à *Pseudomonas fluorescens*, *Inquilinus* spp, *Escherichia albertii*, *Bordetella ansorpii* et *Sighella sonnei* (Bastian *et al.*, 2009 a,b).

Il faut attirer l'attention sur le fait que ces espèces bactériennes sont fréquemment détectées dans les systèmes de distribution de l'eau dans les hôpitaux, dans les systèmes de climatisation des immeubles, et sont très souvent associées à des protozoaires.

Ces résultats sont cohérents avec l'identification parmi les 607 clones d'eucaryotes isolés de la grotte, d'espèces d'amibes telles que *Nuclearia delicatula* et *Acanthamoeba* spp, amibes dont les bactéries constituent la principale ressource trophique.

Pour tenter d'expliquer l'abondance de *Ralstonia*, de *Pseudomonas* et d'autres espèces bactériennes potentiellement pathogènes, il faut se souvenir que la grotte a été soumise, après la prolifération de *F. solani* en juillet 2001, à de nombreux traitements biocides à base d'ammoniums quaternaires et d'antibiotiques.

Or, dans certaines conditions, les bactéries Gram négatif sont capables de s'adapter pour résister à de fortes concentrations de chlorure de benzalconium (Patrauchan et Oriel, 2003). Ces bactéries organisées en biofilms à la surface des parois peuvent résister à des concentrations 1500 fois supérieures à celles auxquelles elles sont sensibles en culture pure. Les résultats de laboratoire ne sont donc pas extrapolables au comportement des bactéries *in situ* à la surface des parois de la grotte.

Pour ce qui concerne les champignons, nous avons amplifié la séquence 18S de l'ADN ribosomique et nous avons partiellement séquencé 607 clones, afin d'identifier les phylotypes par comparaison des séquences à celles qui figuraient dans des bases de données. Les dix phylotypes les plus fréquents représentent 59 % des clones isolés

## Note de recherche

et correspondent aux espèces *Geosmithia* (= *Penicillium*) *namytslowskii*, *Isaria farinosa*, *Aspergillus versicolor*, *Tolyposcladium cylindrosporium*, *Geomyces pannorum*, *Geosmithia putterillii*, *Engyodontium album*, *Tricholoma saponaceum*, *Kraurogymnocarpa trochleospora* et une *Clavicipitaceae* sp. (Bastian *et al.*, 2009 c).

Parmi ces dix champignons, 8 sont répertoriés comme entomophiles, c'est-à-dire associés à des arthropodes, lesquels sont susceptibles de jouer un rôle important dans leur dissémination. Il est intéressant de noter que les espèces du genre *Geosmithia*, qui représentent 17 des clones identifiés dans la grotte, sont au contraire peu représentées dans d'autres environnements. Les espèces du genre *Geosmithia* sont fréquemment associées à des arthropodes, en particulier à des scolytes présents sous les écorces des arbres. Or la grotte de Lascaux est située, à faible profondeur, sous un couvert forestier de chênes et de pins.

De même, *Isaria farinosa* et *Aspergillus versicolor* sont des espèces parasites d'arthropodes. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse d'un rôle des arthropodes dans la dispersion de ces champignons à l'intérieur de la grotte.

Enfin notons que *F. solani*, qui avait proliféré dans la cavité en 2001, n'a été retrouvé qu'à une très faible fréquence quatre ans plus tard. Il en est de même pour des espèces appartenant aux genres *Chrysosporium*, *Paecilomyces*, et *Trichoderma*, qui avaient été préalablement identifiés comme formant des colonies visibles à la surface des parois de la grotte.

Ces résultats montrent que les communautés bactériennes, comme les communautés fongiques, évoluent au cours du temps et interagissent avec des communautés de protozoaires et/ou d'arthropodes, nous invitant à considérer l'écologie de la grotte dans sa globalité et à évaluer les conséquences des interventions humaines sur l'ensemble des

communautés d'organismes vivant dans la grotte.

### 4. Identification de deux nouvelles espèces d'*Ochroconis*

Alors que les traitements biocides avaient cessé depuis 2005 et que la présence humaine dans la grotte était strictement limitée, des « taches noires » de nature inconnue sont apparues, puis se sont développées, à partir de 2007, en particulier au niveau du Passage (Figure 1), ce qui avait suscité des traitements biocides à base d'ammoniums quaternaires associés à un fongicide (octylisothiazolinone).

Comme précédemment pour les développements mycéliens « blancs », nous avons d'une part tenté des mises en culture, et d'autre part réalisé de petits prélèvements de substrat afin d'extraire l'ADN et d'identifier le ou les micro-organismes associés à ces taches noires. Nous avons constitué une collection de 29 souches fongiques isolées de taches noires de la grotte.

Ces souches ont été caractérisées au niveau morphologique et au niveau moléculaire (Martin-Sanchez *et al.*, 2012a).

Cinq souches de référence appartenant à différentes espèces des genres *Scolecobasidium* et *Ochroconis*, provenant d'une collection internationale, 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). Ces cinq souches de référence montrent sur le milieu de culture à l'extrait de malt une morphologie similaire, avec cependant de petites différences de couleur, texture et vitesse de croissance.

## Note de recherche

### 4.1. Caractérisation morphologique

Toutes les souches isolées de la grotte de Lascaux forment des colonies de caractéristiques morphologiques similaires (Figure 2). Sur milieu gélosé les colonies sont rases ; elles présentent une surface veloutée ou cotonneuse, se développent lentement et atteignent un diamètre identique. L'observation au microscope optique montre que toutes les souches, à l'exception de la souche LX CH40, ont des caractéristiques 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 µm.

Les conidies sont produites à la partie supérieure du conidiophore. Elles sont de forme cylindrique et présentent deux ou trois 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 µm. Il n'a pas été observé de chlamydozoospores.

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). En revanche, ces espèces présentent des conidies plus longues. Les conidies d'*O. tshawytschae* possèdent généralement trois cloisons et les conidies de *O. anellii* sont plus larges que celles qui sont produites par les souches isolées de Lascaux.

Un 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 entre une et quatre cloisons, mais,

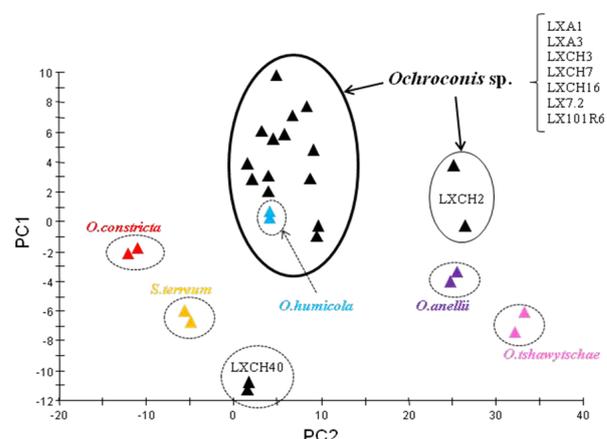


Figure 5. Analyse en composantes principales des profils d'acides gras des isolats d'*Ochroconis* de la grotte de Lascaux et des isolats des espèces de référence.

le plus souvent, seulement une ou deux cloisons et mesurent 7,8 x 2,4 µm. Elles présentent une surface rugueuse reconnaissable en microscopie électronique à balayage (Figure 2 G-H).

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*, ce qu'ont confirmé les études moléculaires.

### 4.2. 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 résultats obtenus ont permis de confirmer 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. isolées de la grotte de Lascaux sont identiques et présentent le

### Note de recherche

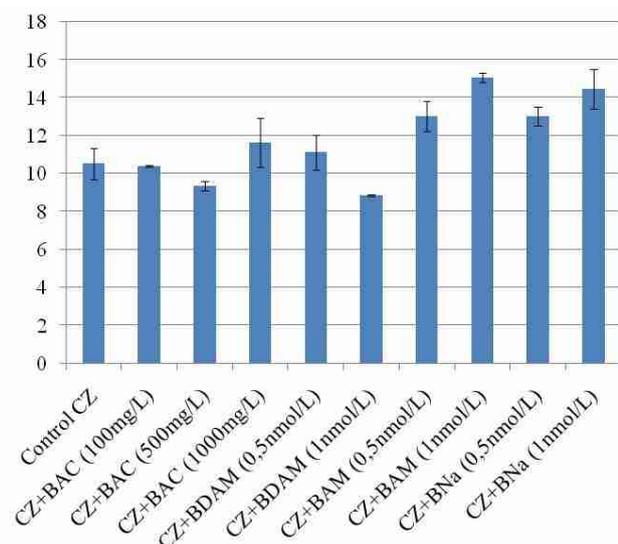


Figure 6. Évaluation de l'utilisation des différents composés testés comme source de carbone pour la croissance d'*Ochroconis lascauxensis*. La biomasse est exprimée en mg de poids sec. Le témoin, milieu CZ, ne contient pas de source de carbone ajoutée. BAC : chlorure de benzyl-diméthyl-alkyl-ammonium ; BDAM : benzyl diméthylamine ; BAM : benzylamine ; et BNa, benzoate de sodium.

plus fort pourcentage d'homologie avec la séquence de l'espèce *O. tshawytschae* (Figures 3 et 4).

Les pourcentages d'homologie avec les souches de référence étant assez faibles, il est possible de conclure que les souches isolées de la grotte appartiennent à deux nouvelles espèces d'*Ochroconis*. La souche la plus fréquemment isolée a été dénommée *O. lascauxensis*, alors que la souche LX CH40 qui se différencie morphologiquement et phylogénétiquement des autres souches d'*Ochroconis* a été dénommée *O. anomala*.

#### 4.3. Caractérisation biochimique et physiologique d'*Ochroconis lascauxensis*

Profil d'acides gras : l'appartenance des isolats

de Lascaux à une nouvelle espèce d'*Ochroconis* a également été confirmée par analyse du profil d'acides gras de plusieurs isolats d'*O. lascauxensis* et des cinq espèces de référence. Les acides gras extraits des cultures fongiques ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse : tous les isolats étudiés présentent quatre types d'acides gras principaux, mais ces quatre types communs aux différents isolats sont présents dans des proportions variables qui semblent caractéristiques de l'espèce considérée.

L'analyse en composantes principales (Figure 5) montre que sept des neuf isolats de la grotte de Lascaux présentent des profils d'acides gras similaires, différents de ceux de quatre des cinq espèces de référence. Les souches LXCH2 et LXCH40 présentent chacune un profil différent des autres souches. Dans le cas particulier de LXCH40, ce résultat conforte l'idée que cet isolat appartient à une nouvelle espèce *O. anomala*.

Tolérance d'*Ochroconis lascauxensis* au chlorure de benzalconium : ayant émis l'hypothèse que les traitements biocides pratiqués antérieurement pouvaient être à l'origine du développement d'*O. lascauxensis*, il était nécessaire d'évaluer la tolérance de ce champignon au chlorure de benzalconium (BC). A cette fin, des suspensions de mycélium ont été ensemencées dans des boîtes de Petri contenant un milieu gélosé enrichi de concentrations croissantes (de 50 à 12 500 mg/L) de BC (Sigma). La croissance a été mesurée après dix jours d'incubation à 22 °C, température optimale de croissance pour ces isolats.

Le BC inhibe la croissance des isolats d'*O. lascauxensis*, mais alors que l'inhibition est totale aux fortes concentrations, elle n'est que partielle aux concentrations les plus faibles : 50 % pour les concentrations de 50 et 100 mg/L, et 75 % pour les concentrations de 250 et 500 mg/L. Les traitements biocides dans la

### Note de recherche

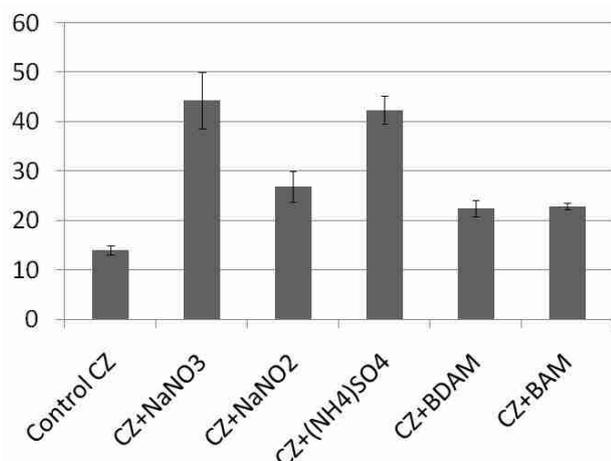


Figure 7. Évaluation de l'utilisation de différents composés comme sources d'azote pour *Ochroconis lascauxensis*. La biomasse est exprimée en mg de poids sec. CZ est le milieu Czapeck sans azote ; BDAM : benzyldiméthylamine ; BAM : benzylamine.

grotte ont été réalisés avec une solution de Devor Mousse à 5 %, correspondant à 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 micro-organismes, peut être différente de la concentration de BC appliquée à la surface de la roche.

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

*Etude des exigences nutritionnelles d'Ochroconis lascauxensis* : afin de déterminer les sources de carbone qu'*Ochroconis lascauxensis* peut métaboliser, nous avons utilisé le système *Biolog* (FF-MicroPlate) qui permet de déterminer la capacité à métaboliser 95 sources de carbone différentes (de la Cruz *et al.*, 2006). Quatre souches de l'espèce *O. lascauxensis*, une souche de l'espèce *O. anomala* et les cinq souches des espèces de référence (*O. tshawytschae*, *O. anellii*, *O. constricta*, *O. humicola* et *S. terreum*) ont été comparées pour leur capacité à utiliser ces différentes sources de carbone.

Les souches de référence des espèces d'*Ochroconis* montrent un comportement similaire : elles peuvent toutes utiliser 49 molécules parmi celles proposées. Les 46 autres sources de carbone sont métabolisées ou non selon l'espèce considérée. L'espèce *O. lascauxensis* se différencie des autres par sa capacité à métaboliser l'acide D-glucuronique ; et l'espèce *O. anomala* est capable d'assimiler l'acide  $\gamma$ -hydroxybutyrique et le L-fucose. Les deux espèces d'*Ochroconis* de Lascaux et *O. tshawytschae* ont en commun la capacité d'utiliser le D-arabinose et l'acide sébacique.

Cette capacité des souches d'*Ochroconis* à utiliser une grande diversité de sources de carbone nous a conduits à envisager leur capacité à utiliser des produits de dégradation du chlorure de benzyldiméthyl-alkyl-ammonium.

*Capacité d'Ochroconis lascauxensis à métaboliser des produits de dégradation des ammoniums quaternaires* : les produits de dégradation qui ont été testés sont ceux décrits par Patraucham et Oriel (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.

### Note de recherche

Le champignon est cultivé dans un milieu Czapeck liquide sans saccharose (CZ), dans lequel sont apportées les molécules à éprouver (Figure 6). Les produits étudiés sont : le BC aux concentrations de 100, 500 et 1 000 mg/L, qui inhibent 50 à 90 % de la croissance d'*O. lascauxensis* et ses produits de dégradation BDAM, BAM et BN aux concentrations de 0,5-1 mmol/L. Après un mois de culture à 22 °C, la biomasse était récupérée par filtration, puis séchée et pesée, de manière à calculer l'augmentation de biomasse en fonction du traitement.

Comme le montre la Figure 6, 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, réalisée à partir des réserves accumulées dans le mycélium inoculé.

Toutefois, en présence de BAM et BNa, la biomasse atteinte est légèrement supérieure au témoin ; la croissance détectée avec BAM et BNa (13-15 mg) est donc très faible. Ces résultats démontrent cependant qu'*O. lascauxensis* est capable d'utiliser la benzylamine (BAM) et l'acide benzoïque (BA) comme source de carbone.

Nous avons également montré que *O. lascauxensis* peut utiliser des produits de dégradation du chlorure de benzyl-diméthyl-alkyl-ammonium comme source d'azote. Une souche d'*O. lascauxensis* a été cultivée dans le milieu Czapeck liquide, sans source d'azote (CZ), dans lequel les molécules à tester ont été apportées.

Différentes sources d'azote sont comparées : nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ), nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) et sulfate d'ammonium ( $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ ) ainsi que différents produits de la dégradation du chlorure de benzalconium : la benzyldiméthylamine (BDAM) et la benzylamine (BAM). La concentration des produits a été calculée de manière à apporter la même quantité d'azote (0,32 g/L). Les résultats sont présentés Figure 7.

Ils montrent que les composés étudiés sont utilisés comme source d'azote par *O. lascauxensis*. Les sources de nitrate ( $\text{NaNO}_3$ ) et d'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 chlorure de benzalconium, BDAM et BAM, la biomasse produite est le double de celle observée dans le témoin sans azote ajouté.

Il est donc permis de conclure que *O. lascauxensis* peut assimiler certains produits de dégradation du chlorure de benzalconium, à la fois comme source de carbone et comme source d'azote. Ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle les traitements biocides intensifs auxquels la grotte a été soumise ont favorisé le développement de ce champignon.

En effet, à la surface des substrats rocheux ou argileux, les champignons sont présents sous forme de biofilms associés à des bactéries, parmi lesquelles des espèces du genre *Pseudomonas* capables de survivre à de fortes concentrations en BAC (Nagai *et al.*, 1996).

Nous avons isolé de la grotte de Lascaux plusieurs espèces de *Pseudomonas* (*P. brenneri*, *P. chlororaphis*, *P. poae*, *P. fluorescens* et *P. reactans*) capables de se développer à des concentrations élevées de *Devor Mousse* (5 ml/L), ce qui est équivalent à 5 000 – 12 500 mg/L de BAC (Bastian *et al.*, 2009a).

Sur la base de nos résultats et de ceux de la littérature, il est permis de conclure que les fortes concentrations en BAC auxquelles la grotte a été soumise pendant plusieurs années ont provoqué une sélection des espèces de *Pseudomonas* résistantes à ce produit, qui sont capables de dégrader ces composants et de former des produits de dégradation susceptibles d'être utilisés par les bactéries et par certains champignons, dont *Ochroconis*, comme sources de carbone et d'azote.

## Note de recherche

### 5. Autres communautés microbiennes associées aux taches noires

Bien que les isollements microbiens effectués à partir de taches noires aient permis de révéler la présence de deux nouvelles espèces d'*Ochroconis*, ces dernières ne sont pas les seules à être associées aux taches noires. L'emploi de l'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE), largement utilisée pour caractériser les communautés de bactéries et de champignons dans des échantillons naturels d'origines diverses, a permis de révéler d'autres champignons, présents à la surface des substrats présentant ces taches noires. Deux échantillons de taches noires récoltés en août 2008 et deux échantillons de sédiments 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 précédemment.

Dans les échantillons de taches, avant traitement, le champignon le plus représenté est *O. lascauxensis*, mais, après les traitements, bien qu'*O. lascauxensis* soit toujours détecté, les champignons majoritaires appartiennent aux genres *Alternaria*, *Gymnascella*, *Cladosporium* et *Aspergillus*. Ces champignons ayant également été détectés dans l'air de la grotte il est permis de conclure qu'après nettoyage et application de biocide, les sédiments et les roches sont rapidement colonisés par des champignons présents dans l'air de la grotte.

Le suivi de l'évolution des communautés fongiques au cours du temps a montré que les populations de champignons de chaque zone de prélèvements apparaissent stables au cours de l'année. Cependant certains prélèvements révèlent la présence, dans les taches noires, d'autres champignons et, en particulier, de « levures noires » appartenant aux genres *Exophiala* et *Cladophialophora*. Afin d'approfondir l'étude de ces micro-organismes et de mettre en lumière leur rôle dans la

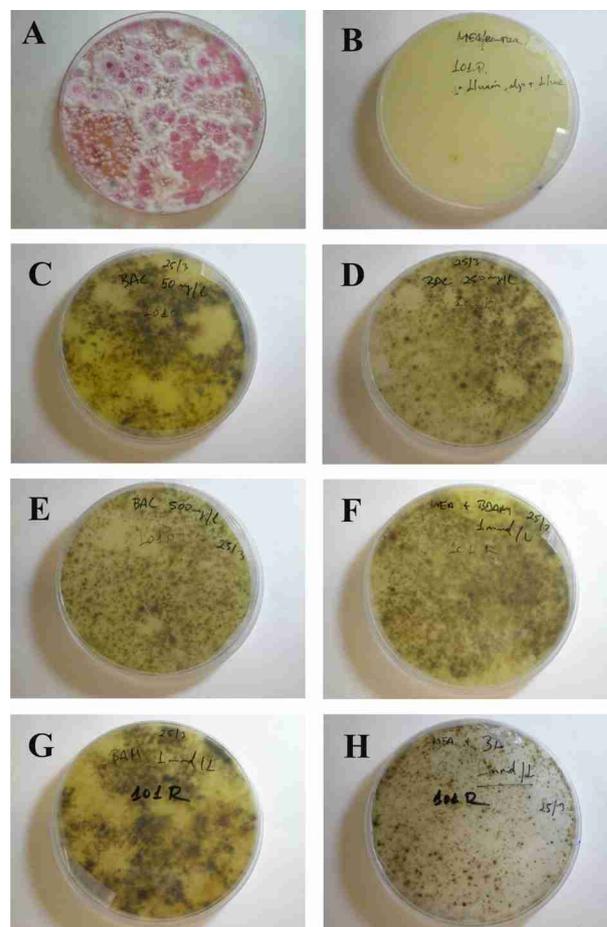


Figure 8. Boîtes de Petri inoculées avec une suspension de champignons isolés d'une tache noire après un mois d'incubation à 22°C. Milieux de culture : DRBCA (A), MEA (B), et MEA additionné de : chlorure de benzalconium (BAC) 50 mg/L (C), 250 mg/L (D) et 500 mg/L (E) ; benzylidiméthylamine (BDAM), 1 mmol/L (F) ; benzylamine (BAM), 1 mmol/L (G) ; acide benzoïque (BA), 1 mmol/L (H).

formation des taches noires, nous avons appliqué la technique DGGE à l'ARN extrait des échantillons.

Alors que l'analyse de l'ADN permet d'identifier les champignons majoritaires, qu'ils soient métaboliquement actifs ou non, l'analyse des ARN révèle uniquement les

Note de recherche

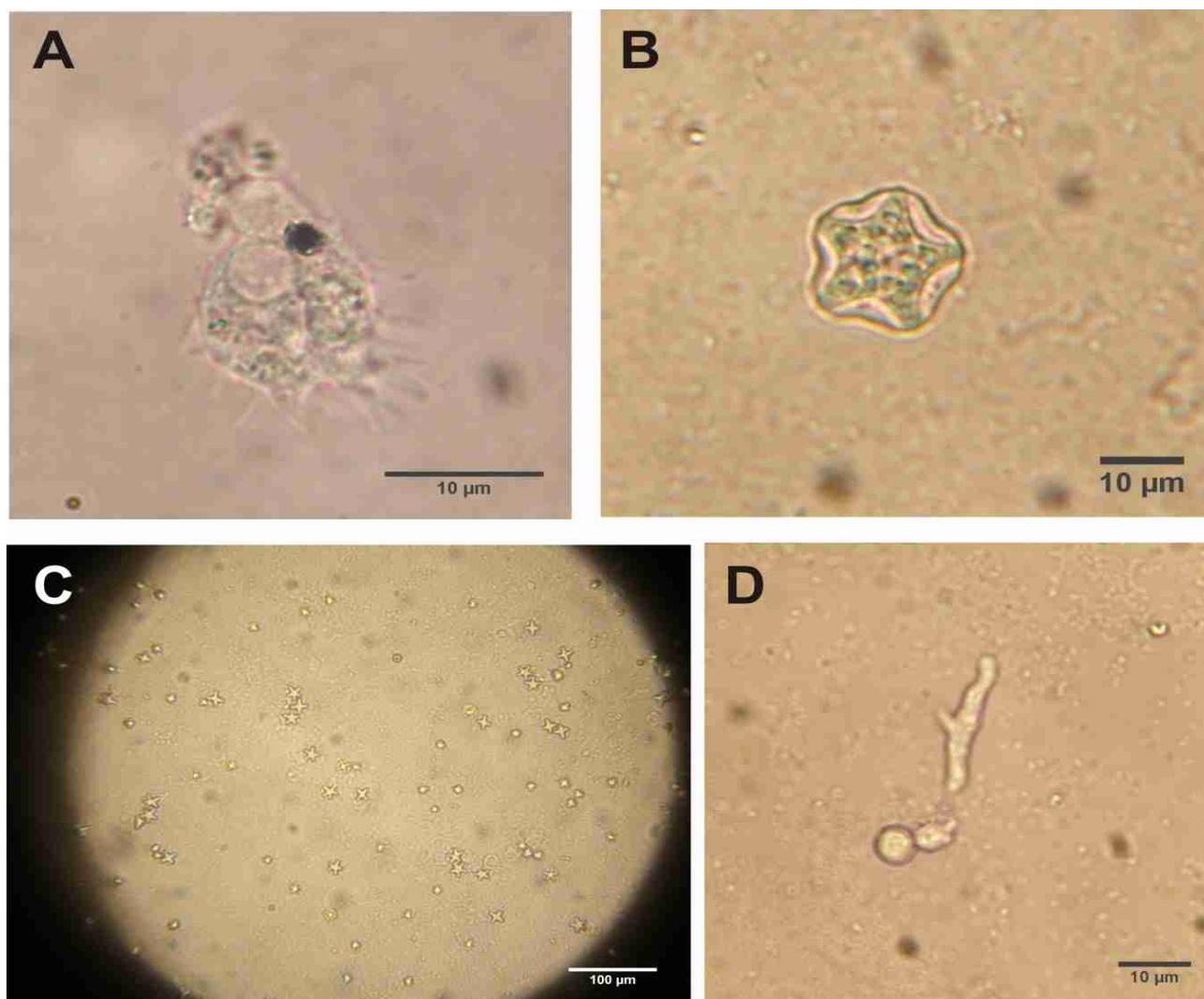


Figure 9. A. Trophozoïte d'*Acanthamoeba astronyxis* avec pseudopodes. B. Kyste à 5 branches d'*Acanthamoeba astronyxis*. C. Kystes d'*Acanthamoeba astronyxis* en surface du milieu de culture dans une boîte de Petri. D. Trophozoïtes et kystes de *Hartmannella vermiforme*.

populations de champignons métaboliquement actifs. Les résultats montrent que les échantillons analysés comportent des levures noires et des souches d'*Acremonium/Gliocladium* sp métaboliquement actives (Martin-Sanchez *et al.*, 2012b).

Ces champignons avaient fréquemment été isolés à partir de taches noires, mais nous ne

leur avons pas prêté attention, car, sur les milieux de culture classiquement utilisés, ils forment des colonies blanches. En revanche, sur d'autres milieux, ces champignon forment des colonies mélanisées dès les premiers jours de culture et prennent une couleur vert gris caractéristique (Figure 8).

Dans tous les échantillons prélevés, *Mortierella alpina*, *F. solani*, *Doratomyces* sp.

### Note de recherche



Figure 10. Tache noire de l'Abside (Figure 1), montrant de nombreux individus de *Folsomia candida*.

et *I. farinosa* sont également isolés de manière récurrente. La coloration des hyphes, révélée sur certains milieux de culture, peut s'expliquer *in situ* par l'action des biocides.

#### 6. Rôle des biocides dans la mélanisation des micro-organismes

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 récoltée dans le Passage (Figure 1) 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 du chlorure de benzalconium, de la benzyldiméthylamine, de la benzylamine et de l'acide benzoïque (Figure 8 C-H) montraient une mélanisation importante, alors que les champignons cultivés en absence de ces composants ne présentaient pas de mélanine (Figure 8 A, B).

Dans la littérature les études portant sur les processus de mélanisation chez les micro-organismes sont très anciennes et décrivent la production de mélanine par *Azotobacter*

Note de recherche

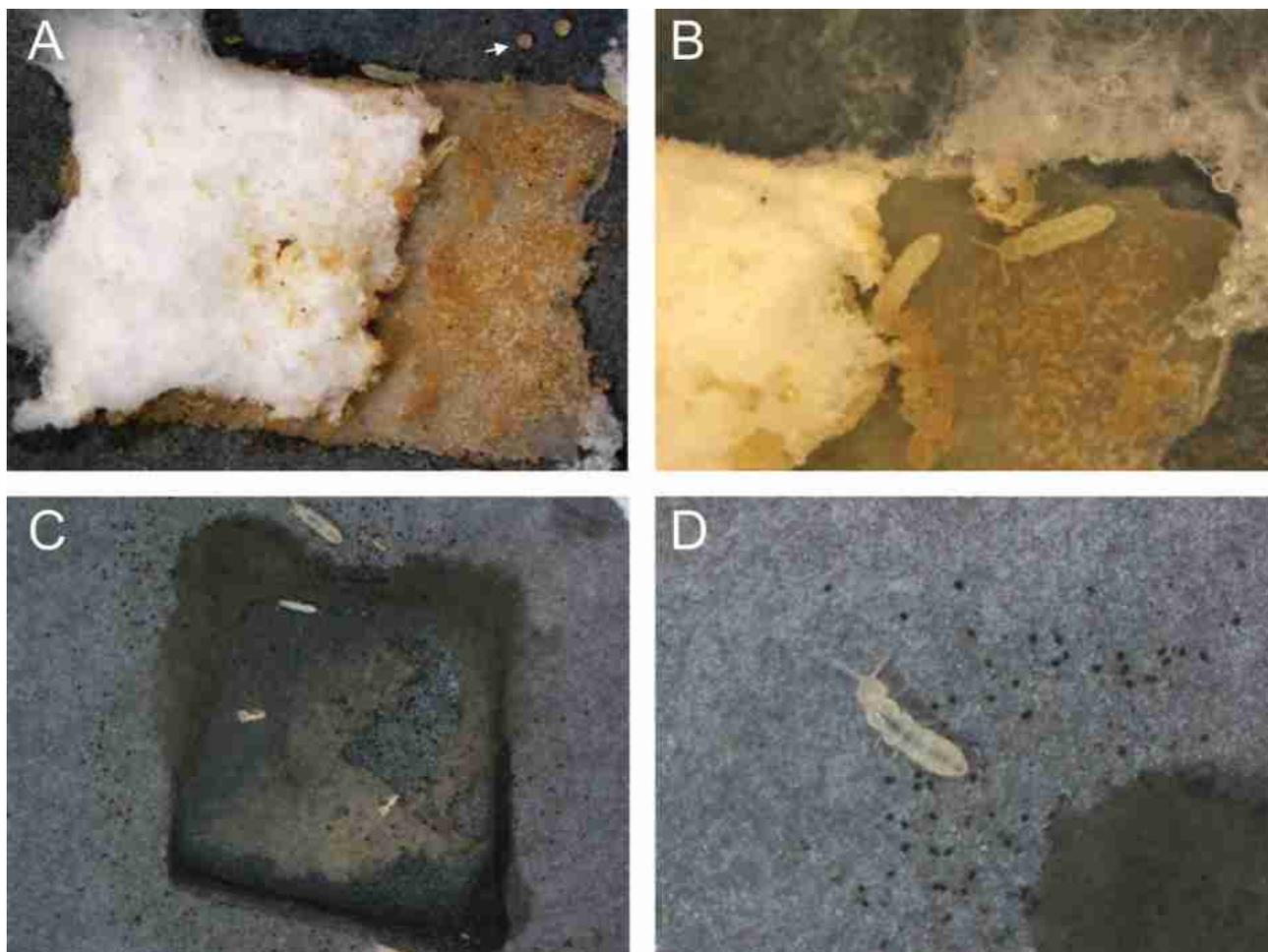


Figure 11. Individus de *Folsomia candida* s'alimentant sur des colonies des deux principaux champignons observés à Lascaux. Dans une culture de *Fusarium solani*, des œufs sont visibles (A et B). Sur une culture d'*Ochroconis* sp. dans un microcosme de sédiment de la grotte (C et D). On observe la dispersion des excréments des collemboles et le tractus digestif noirci par la consommation de mélanine du champignon.

*chroococcum* en présence de benzoate de sodium (Hardisson et Pochon, 1966 ; Thompson, 1989).

Les résultats que nous avons acquis suggèrent que la prolifération des taches noires et des micro-organismes 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 micro-organismes

producteurs de mélanine et/ou induit le processus de mélanisation.

## 7. Interactions entre la microflore et la microfaune de la grotte de Lascaux

### 7.1. Interactions bactéries/protozoaires

L'analyse de la flore bactérienne (Bastian et al., 2009b) ayant montré que 45 % des 696

## Note de recherche

clones bactériens obtenus correspondaient à des phylotypes incluant des bactéries pathogènes, nous avons cherché à identifier les protozoaires présents dans les sédiments prélevés dans les divers compartiments de la grotte. Toutes les 36-48 heures, les échantillons mis en culture à partir des prélèvements étaient examinés pour observer la croissance d'amibes grâce à un microscope inversé. L'identification des espèces d'amibes était fondée sur l'observation des différentes phases du cycle biologique de chaque espèce : les "trophozoïtes" correspondant à la phase végétative et les kystes correspondant à la phase de résistance.

Les observations directes ont permis l'identification des genres *Acanthamoeba* et *Hartmannella*. *Acanthamoeba* sp. est facilement identifiable, par ses caractéristiques morphologiques. Les trophozoïtes de 25-15 µm de long et de 15-9 µm de diamètre produisent des pseudopodes fins, parfois bifurqués, dont l'extrémité est arrondie ou pointue (Figure 9). Les trophozoïtes possèdent un seul noyau, de diamètre 4 µm et une membrane nucléaire bien délimitée. Les kystes possèdent une double paroi, qui sépare l'exocyste de l'endocyste. L'endocyste présente une forme caractéristique d'étoile. Le nombre de branches oscille entre trois et six (Figure 9, B et C).

Les trophozoïtes d'*Hartmannella vermiformis* sont monopodiaux, avec une forme allongée et cylindrique (Figure 9) de taille moyenne 10,3 µm de longueur et 2,48 de diamètre, avec très peu de variabilité entre individus. Les kystes de cette amibe sont peu caractéristiques. Ils ont une forme circulaire ou légèrement ovoïde et possèdent une paroi lisse.

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*, *A. castellanii* et *H. vermiformis*, montrent l'étroite relation existant entre les pathogènes bactériens et les amibes libres de la grotte de Lascaux. En effet, de nombreuses espèces de

protozoaires hébergent de manière intracellulaire des bactéries pathogènes ; il a, en particulier, été montré que *A. castellanii* constitue une niche intracellulaire dans laquelle des souches de *Legionella* spp. peuvent proliférer.

### 7.2. Interactions champignons/collemboles

Après l'arrêt des traitements biocides, nous avons détecté le collembole *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) à proximité des taches noires (Figure 10).

*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.

Le collembole *F. candida* et les deux champignons les plus représentatifs de Lascaux (*F. solani* et *O. lascauxensis*) ont été utilisés pour étudier les relations entre cet arthropode et les champignons.

Placés en boîte de Petri en présence d'une culture de *F. solani* ou d'une culture d'*O. lascauxensis*, déposée sur des sédiments de la grotte, les individus de *F. candida* se nourrissent aux dépens des hyphes de *F. solani* et d'*O. lascauxensis* (Figure 11). De plus, ce collembole contribue à l'extension et à la dissémination des taches noires.

En effet, les pelotes fécales contiennent des conidies qui sont capables de germer lorsqu'elles sont déposées sur une surface humide.

Dans la grotte, la forte densité de collemboles est à l'origine d'une accumulation de pelotes fécales qui contribuent à l'extension des « taches noires ». Cette dispersion de proximité est observable sur la Figure 11.

L'ensemble de ces observations concorde avec les données publiées précédemment, Greif et Currah (2007) ayant notamment isolé, à partir de collemboles, des souches appartenant aux genres fongiques :

## Note de recherche

*Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Cryptendoxyla*, *Geomyces*, *Gliocladium*, *Hormiactis*, *Leptographium*, *Oidiodendron*, *Penicillium* and *Verticillium*. La dissémination des taches noires serait donc associée à l'activité des collemboles.

### 8. Discussion

La grotte de Lascaux, contrairement à d'autres grottes, ne peut plus être assimilée à un écosystème oligotrophe. Les événements qu'elle a connus au cours des dernières 70 années l'ont transformée en un écosystème relativement riche en matière organique, favorable au développement des micro-organismes. Les résultats rapportés ici ont été choisis pour illustrer la complexité de cet écosystème souterrain particulier et pour montrer comment des erreurs graves peuvent être commises lorsque, de bonne foi, on ne se focalise que sur un micro-organisme à l'origine d'un dégât apparent.

La méthode de traitement choisie pour endiguer la prolifération d'un champignon a perturbé l'ensemble de l'écosystème, entraînant de nouveaux désordres et la prolifération de micro-organismes qui préexistaient mais qui ont bénéficié d'un avantage compétitif décisif lié à leur plus grande résistance aux biocides utilisés et à leur capacité à en assimiler les produits de dégradation. Ces résultats montrent aussi comment les produits biocides utilisés révèlent certaines capacités métaboliques des micro-organismes. Ainsi des champignons que le mycologue classe dans les champignons à thalle hyalin produisent des mélanines en réponse à la présence de biocides et présentent alors des hyphes et des colonies mélanisées plus résistantes aux conditions défavorables à leur survie.

Ces résultats illustrent aussi la nécessité de ne pas opposer techniques « classiques » et techniques moléculaires, mais de les associer pour mieux disséquer les interactions

microbiennes dans un écosystème complexe. Juste évoqués ici, les résultats acquis avec la technique DGGE appliquée, d'une part à l'ADN et d'autre part à l'ARN ont permis de faire la part entre les micro-organismes présents (ADN) et les micro-organismes métaboliquement actifs (ARN) et ainsi de détecter l'évolution affectant les communautés de champignons associés aux taches noires. D'autres résultats n'ont pas été présentés ici. Ils concernent la mise au point d'outils permettant la détection et la quantification spécifique de certains micro-organismes d'intérêt comme les *Ochroconis* dans des échantillons de substrat et dans l'air de la cavité (Alabouvette et Saiz-Jimenez, 2011). Ces outils ont permis d'initier l'étude de l'aérocontamination de la grotte et de suivre la dynamique des populations de champignons et de bactéries associés aux taches noires. Comme signalé en avant-propos, notre travail s'est interrompu en 2011, une nouvelle équipe ayant été choisie pour mettre en œuvre le programme de recherche élaboré à partir des résultats déjà acquis. Ce programme visait à compléter l'inventaire des communautés de micro-organismes de protozoaires et de microarthropodes présents dans la grotte en faisant appel aux méthodes de métagénomique et tenter de corrélérer les variations dans l'abondance et la composition des communautés bactériennes et fongiques détectées dans l'air de la grotte, en fonction des saisons, avec des paramètres micro-climatiques. Quant à la conservation de la grotte et de ses peintures rupestres, nous pensons qu'elle doit être préventive et qu'il convient de s'abstenir de tout traitement qui aurait pour conséquence de l'enrichir en matière organique propice au développement des micro-organismes.

### Références

Alabouvette C., Saiz-Jimenez C. 2011. *Ecologie microbienne de la grotte de*

Note de recherche

- Lascaux, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiologia de Sevilla 118 pp. ISBN : 978-84-694-7852-3.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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'Institut 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.
- Hoog GS de, Arx JA von. 1973. Revision of *Scolecobasidium* and *Pleurophragmium*, *Kavaka* 1, 55-60.
- Hoog G.S. de. 1985. Taxonomy of the *Dactylaria* complex, IV. *Dactylaria*, *Neta*, *Subilisporea*, and *Scolecobasidium*, *Studies in Mycology*, 26, 1-60.
- Kirilenko TC, Al-Achmed MA. 1977. *Ochroconis tshawytschae*, *Mikrobiologichnyi Zhurnal*, 39, 305.
- Lefèvre M. 1974. La maladie verte de Lascaux, *Studies in Conservation*, 19, 126-156.
- Martin-Sanchez PM, Novákova A, Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. 2012a. Two new species of the genus *Ochroconis*, *O. lascauxensis* and *O. anomala* isolated from black stains in Lascaux Cave, France, *Fungal Biology*, 116, 574-589.
- Martin-Sanchez PM, Novákova A, Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. 2012b. The use of biocides for the control of fungal outbreaks in subterranean environments: the case of the Lascaux Cave in France,

### Note de recherche

*Environmental Science and Technology*, 46, 3762-3770.

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.

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

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 Speleological Society Bulletin*, 56, 38-45.

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

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

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

#### Édité par :

Nadine Vivier, membre de l'Académie d'agriculture de France.

Hervé This, directeur du Centre International de gastronomie moléculaire AgroParisTech-Inra, membre de l'Académie d'agriculture de France.

#### Rapporteurs :

1. Françoise Joset, professeur honoraire de

génétique procaryote et microbiologie – Université Aix-Marseille  
2. n.d.

#### Rubrique :

Cet article a été publié dans la rubrique « Notes de recherche » des *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France*.

#### Reçu :

30 mai 2016

#### Accepté :

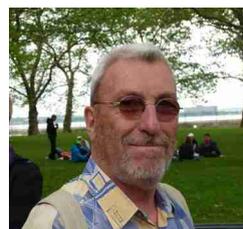
26 août 2016

#### Publié :

5 septembre 2016

#### Citation:

Alabouvette C. et Saiz-Jimenez C. 2016. *Ecologie microbienne de la grotte de Lascaux* *Notes Académiques de l'Académie d'agriculture de France / Academic Notes from the French Academy of Agriculture (N3AF)*, 2(5), 1-21. <https://doi.org/10.58630/pubac.not.a372706>.



Claude Alabouvette est membre correspondant de l'Académie d'agriculture de France.



Cesaero Saiz-Jimenez est Research Professor au Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).