



**MONTIGNAC – 24, Dordogne (Aquitaine)
Grotte de Lascaux
Recherche de l'impact des paramètres physiques de l'atmosphère
et des substrats sur le développement des microorganismes
Synthèse de la première tranche d'étude
(février 2007-juillet 2009)**

CNR-ISAC (Istituto di Scienze dell'Atmosfera e del Clima - Consiglio nazionale delle ricerche) :
Adriana BERNARDI
Francesca BECHERINI

INRA (Institut National de la recherche Agronomique) :
Fabiola BASTIAN
Claude ALABOUVETTE

LRMH (Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques) :
Geneviève ORIAL, Faisl BOUSTA, Alexandre FRANCOIS, pôle « microbiologie »
Jean-Didier MERTZ, pôle « pierre »
Cercle des partenaires du patrimoine :
David GIOVANNACCI, Charlotte LECLAIRE

*Restaurateurs (équipe de suivi et de traitement de la Grotte de Lascaux, conservateurs –
restaurateurs de peintures murales, de sites et d'objets archéologiques et ethnographiques) :*
Julien ASSOUN
Diane HENRY-LORMELLE
Tristan MAHEO
Françoise MORIN
Alina MOSKALIK-DETALLE

Programme « microbiologie/microclimat »
Mesures et observations effectuées sur les zones PR1, PR2 et PR3
entre février 2007 et juillet 2009
Synthèse des résultats obtenus

Rappel des hypothèses et objectifs du projet

Depuis sa découverte, la grotte de Lascaux a connu plusieurs épisodes de développements microbiens susceptibles de porter atteinte à la préservation des peintures qui ornent ses parois. C'est à la suite de la « maladie verte » nom donné à une prolifération d'algues vertes que sa fermeture au public a été décrétée en 1963.

A l'automne 2001, corrélativement à des travaux importants au niveau de la salle des machines, le développement rapide et important d'un champignon *Fusarium solani* a nécessité des interventions d'urgence suivies d'apports répétés de désinfectants biocides à base de sels d'ammonium quaternaire et d'antibiotiques. Ces interventions destinées à contrôler le développement des microorganismes se sont poursuivies jusque fin 2003, date à laquelle elles ont été stoppées au profit des seules opérations de nettoyage et d'observation des parois de la grotte.

En effet le Comité Scientifique International de la Grotte avait souhaité que soit entrepris un programme de recherche visant à comprendre l'origine et les causes de ce développement microbien.

Les hypothèses proposées par les microbiologistes participant au comité scientifique étaient les suivantes :

- la microflore algale, bactérienne et fongique est a priori beaucoup plus diversifiée que la microflore qui se développe en colonies visibles

- cette microflore est certainement répartie de manière plus ou moins homogène à la surface des parois de la grotte

- ce sont des conditions microclimatiques locales qui permettent le développement visible des espèces envahissantes à la surface des parois en certaines zones et l'interdisent ailleurs.

Diverses observations viennent à l'appui de ces hypothèses :

- les parois apparemment les plus humides de même que les joints argileux sont plus fréquemment et plus intensément colonisés que les zones les plus sèches.

- des observations montrent qu'après nettoyage mécanique les colonies réapparaissent toujours aux mêmes endroits.

Cet ensemble d'observations et d'hypothèses a présidé à la mise en place d'un projet microbiologie/microclimat dont l'objectif était

- de mesurer le plus précisément possible les paramètres microclimatiques à l'interface de la roche et de l'atmosphère

- d'identifier les populations microbiennes présentes à la surface du substrat

- de suivre l'évolution des colonies se développant en surface de la paroi

- de corréler développement microbien visible et paramètres microclimatiques.

Le projet associant trois laboratoires (LRMH Champs sur Marne, CNR Padova Italie, INRA Dijon) a été évalué par deux experts indépendants avant d'être accepté par le Comité Scientifique International de la Grotte de Lascaux puis financé par le Ministère de la Culture et de la Communication via, la DRAC d'Aquitaine (Monsieur Alain Rieu, conservateur régional des affaires culturelles)

Démarche scientifique et protocoles expérimentaux

La compréhension du degré de dépendance du développement microbien vis-à-vis des conditions microclimatiques et de substrat nécessite des investigations selon trois axes de recherche :

- la caractérisation des communautés microbiennes de la grotte
- la caractérisation des conditions de température et d'activité de l'eau à la surface des matériaux
- le suivi dynamique des paramètres du microclimat

La première étape a consisté à choisir les zones présentant les caractéristiques requises pour y placer les instruments de mesure, réaliser les prélèvements et les observations.

A l'époque où a été lancé le programme (février 2007) les évolutions microbiennes les plus visibles affectaient le diverticule axial. C'est pour cette raison que les zones d'observation et de mesure ont été choisies à l'entrée du diverticule axial. :

deux zones côte à côte situées à gauche, la première PR1, d'apparence toujours sèche et très peu colonisée, l'autre PR2, d'apparence plus humide et présentant des colonies fongiques « blanches » et d'autres « noires ».

Une troisième zone PR3, de surface plus importante, a été définie sur le côté droit en face des zones 1 et 2. Cette zone était fortement colonisée et présentait toujours un aspect humide.

Les équipes de restauration ont été chargées d'un suivi mensuel de l'état des surfaces. Trois calques ont été relevés à chaque date, l'un présentant l'emplacement des taches blanches, un second celui des taches noires et un troisième l'état hydrique de la paroi. Ce suivi visuel reporté sur calque avait pour but de suivre l'évolution de la colonisation de surface (augmentation ou diminution de la surface colonisée, apparition de nouvelles colonies ou augmentation de surface des colonies existantes) et de donner une indication de l'humidité de surface.

Pour ce qui est des analyses microbiologiques, des prélèvements ont été effectués à J0. Ces prélèvements ont permis d'effectuer différents types d'analyse :

- caractérisation de la microflore,
 - d'une part la microflore cultivable révélée par la méthode des suspensions-dilutions et étalement sur des milieux appropriés et estimation de la densité par la méthode de Mac Grady
 - d'autre part la microflore « totale » par extraction de l'ADN du « sol » suivie (i) d'un clonage séquençage pour identifier les espèces bactériennes et fongiques et (ii) d'une analyse des communautés par la méthode de T-RFLP.

Il était convenu que d'autres prélèvements seraient effectués dès lors que des modifications se manifesteraient en surface. Malheureusement pour le programme (mais heureusement pour la grotte) la situation est restée stable tout au long de la période d'observation.

Cependant les paramètres du microclimat mesurés par l'équipe du CNR ayant montré une certaine évolution, il a été décidé de réaliser un autre prélèvement pour détecter d'éventuelles variations de la microflore.

Pour ce qui est

- de la caractérisation pétrographique du substrat rocheux et des propriétés de transfert d'eau
- de la caractérisation dynamique des paramètres du microclimat,

un travail préalable, très important, a été conduit au LRMH d'une part et au CNR de Padoue d'autre part pour mettre au point des instruments de mesure spécifiquement adaptés aux conditions particulières de la grotte de Lascaux.

Les principales étapes de ce travail préliminaire de même que les solutions techniques retenues sont présentées en détail dans les rapports du LRMH et du CNR et ne sont pas reprises dans ce rapport de synthèse.

Résultats

1/ Caractérisation pétrophysique des substrats

1.1/ Pétrographie et analyses minéralogiques

Des analyses ont été effectuées sur de petites écailles prélevées dans des zones sans intérêt archéologique.

Dans la cavité, et en particulier à l'entrée du diverticule axial, la roche correspond à uner biomicrite gréseuse à passées sparitiques et débris d'échinodermes et de foraminifères. Ce substrat rocheux compact est hétérogène. Dans les zones d'étude PR ce substratum est recouvert par un concrétionnement carbonaté, d'épaisseur millimétrique, transformé mais de même nature que la roche mère sous-jacente. En maints endroits, ce recouvrement chaotique est susceptible de se désolidariser du substratum pour former des « écailles » elles-mêmes le siège de phénomènes de dissolution-précipitation. Ces « croûtes » tantôt cohérentes, tantôt fragiles sont recouvertes localement de dépôts grésio-argileux à argilo-ferrugineux.

La fraction fine contenue dans les sédiments superficiels des concrétions calcareuses des zones PR a fait l'objet d'une caractérisation approfondie afin d'identifier la nature du cortège argileux. Parmi les argiles mises en évidence (illite, kaolinite et smectite) c'est une smectite gonflante qui domine. Elle est susceptible de jouer un rôle déterminant dans les relations microclimat substrat car elle présente une surface spécifique d'échange très importante lui permettant d'absorber de grandes quantités d'eau.

1.2/ Propriétés microstructurales de l'encaissant

La porosité accessible aux fluides et la distribution des rayons d'accès aux pores des échantillons prélevés sur les zones PR ont été étudiées par porosimétrie au mercure. L'immense majorité de la porosité de la roche de l'encaissant (98% du volume poreux) a un rayon d'accès inférieur à $10^{-1}\mu\text{m}$. En utilisant différents modèles, il est possible de calculer

la perméabilité matricielle k qui est une propriété intrinsèque au matériau ; elle se définit comme la capacité du matériau à laisser circuler un fluide en son sein. C'est une surface efficace d'écoulement qui s'exprime en m^2 ou Darcy D ($1D \sim 10^{-12} \text{m}^2$)

la teneur en eau endogène du substrat dans les conditions de la grotte du fait de la seule condensation de l'humidité.

Les résultats issus de deux modèles sont concordants ; la perméabilité de l'encaissant est estimée entre 10^{-9} et 3.10^{-9} Darcy, ce qui classe cette roche parmi les calcaires très peu perméables.

D'autres calculs permettent d'estimer une durée de transit de l'eau dans ce matériau ; cette durée a été estimée à $1,5.10^5$ ans pour traverser l'unité de volume, soit un débit de l'ordre de 25mL.an^{-1} . Il a été calculé que 70% du volume poreux accessible de la roche de l'encaissant est entièrement saturé d'eau par condensation endogène dans les conditions d'humidités habituelles de la grotte.

La conclusion principale de cette première partie du travail est que les propriétés pétrophysiques de la roche de l'encaissant montrent que les variations possibles de teneur en eau et la cinétique associée ne peuvent être que très faibles voire inexistantes. Il est donc peu probable que les fluctuations de teneur en eau générées par un transfert au sein de la roche soit un paramètre directeur conditionnant la prolifération des microorganismes à la surface.

1.3/ Propriétés microstructurales des matériaux de surface

La suite de l'étude a porté sur la structure des écailles et des dépôts naturels ou anthropiques de surface. Les propriétés porales des écailles sont significativement différentes et très supérieures à celles de l'encaissant (les valeurs sont présentées dans le rapport du LRMH). Ces écailles dont l'épaisseur est de l'ordre de quelques millimètres peuvent contenir des quantités plus importantes que l'encaissant et cette eau peut y circuler plus rapidement. Si l'on considère une unité de volume constituée en totalité de la matière constituant les différents échantillons d'écaille étudiés le temps de transfert varie de quelques jours à quelques centaines de milliers d'années.

1.4/ Conclusion

En raison du caractère quasi-imperméable de la matrice de l'encaissant rocheux, **le volume d'eau mobilisable dans la roche est beaucoup trop faible pour alimenter en eau les écailles et les dépôts de surface**. Le temps de transfert dans cet encaissant se compte en milliers d'années ; il ne peut pas être mis en relation avec les développements microbiens qui se comptent en jours. **La réserve en eau à la surface des parois se situe dans les couches superficielles (écailles et dépôts). La teneur en eau y est variable et dépend essentiellement de la nature de ces matériaux et des fluctuations du microclimat local** (conditions de condensation).

2/ Caractérisation dynamique des paramètres du microclimat.

Comme indiqué plus haut la saisie des données au niveau des zones PR1 ? PR2 et PR3 a été précédée d'une longue période de mise au point et de calibrage de sondes permettant de mesurer :

la température de l'air et de la roche avec une résolution de $0,001^{\circ}\text{C}$ et une précision de $0,01^{\circ}\text{C}$

l'humidité relative avec un psychromètre atteignant une précision maximale de 0,2-0,3%

les mouvements d'air avec un anémomètre à fil chaud avec une précision de 10-20 $\text{mm}\cdot\text{sec}^{-1}$

la condensation superficielle avec une sonde spéciale dénommée « dew sensor »

Les mesures ont été réalisées automatiquement, enregistrées sur un data logger relié connecté à Internet ce qui a permis au CNR de vérifier à distance le bon fonctionnement des sondes et de traiter les données. Des paramètres importants tels que : température du point de rosée de l'air et de la surface du substrat, l'humidité relative et le rapport de mélange ont été calculés à partir des données enregistrées en utilisant des modèles mathématiques validés.

Deux périodes de mesures ont pu être exploitées

2.1/ Caractérisation des paramètres du microclimat des zones PR1, PR2 et PR3 de mi-novembre 2007 à fin août 2008.

Les résultats détaillés étant présentés dans le compte-rendu du CNR, le présent rapport tend à mettre en lumière les différences ou similitudes enregistrées entre les zones PR1, PR2 et PR3 et qui pourraient être mises en relation avec les développements microbiens. Des variations saisonnières ont été enregistrés de telle sorte qu'il faut établir des comparaisons en fonction des saisons

En hiver les températures de l'air s'établissent de la manière suivante : PR1 > PR3 > PR2

En été les températures de l'air s'établissent de la manière suivante : PR1 \geq PR2 > PR3

En hiver les températures de la roche s'établissent de la manière suivante : PR3 \geq PR1 > PR2

En été les températures de la roche s'établissent de la manière suivante : PR3 > PR2 \geq PR1

En hiver les températures de surface s'établissent de la manière suivante : PR3 \geq PR1 > PR2

En été les températures de surface s'établissent de la manière suivante : $PR3 \geq PR2 \geq PR1$

En hiver les rapports de mélange s'établissent de la manière suivante : $PR2 > PR3 > PR1$

En été les rapports de mélange s'établissent de la manière suivante : $PR1 \approx PR2 \approx PR3$

En hiver l'humidité relative s'établit de la manière suivante : $PR2 > PR3 > PR1$

En été l'humidité relative s'établit de la manière suivante : $PR1 \approx PR2 \approx PR3$

Sachant que l'humidité relative est un paramètre directement lié au rapport de mélange et inversement lié à la température, les valeurs d'humidité relative indiquées ci-dessus montrent que c'est le rapport de mélange, c'est-à-dire la variation de la concentration en vapeur d'eau qui détermine de manière prépondérante l'humidité relative.

Un dernier paramètre important en relation avec le développement microbien est la condensation superficielle. Celle-ci a été appréciée d'une part par le calcul et d'autre part directement par la sonde « dew sensor ». Les résultats obtenus sont cohérents entre eux et montrent qu'en hiver une condensation superficielle a été enregistrée en PR2 et PR3, mais jamais en PR1, en été il n'a pas été enregistré de phénomène de condensation superficielle pour aucune des 3 zones.

Pour ce qui concerne les mouvements d'air, à la surface de la zone PR1 ils sont toujours inférieurs au seuil de détection de la sonde utilisée (10-20 mm.sec⁻¹), pour les zones PR2 et PR3 ils sont détectés en automne pour PR2 puis en hiver pour PR2 et PR3. L'intensité augmente progressivement pour atteindre une vitesse de 5,5 cm.sec⁻¹ en PR2 et 12 cm.sec⁻¹ m à la surface de la zone PR3.

A l'issue de cette première période de mesure il est possible de conclure qu'en comparaison avec la zone PR1, la zone PR2 est caractérisée par un rapport de mélange toujours supérieur et par une température superficielle toujours inférieure. Ces paramètres expliquent que de nombreux événements de condensation superficielle aient été détectés en PR2 et jamais en PR1. L'humidité relative est également toujours supérieure en PR2.

La zone PR3 montre des conditions thermohygrométriques plus proches de celles de PR2 que de PR1. Pendant l'hiver PR3 a été caractérisée par un rapport de mélange inférieur et une température superficielle supérieure à ceux de PR2. Malgré cela, les phénomènes de condensation ont été plus fréquents en PR3 qu'en PR2, ce qui peut s'expliquer par des différences de ventilation à la surface de ces deux zones.

2.2/ Caractérisation des paramètres du microclimat des zones PR1, PR2 et PR3 de septembre 2008 au début de l'été 2009

Les mesures se sont poursuivies pour les zones PR1, PR2 jusqu'en juin 2009, pour la zone PR3 elles ont été interrompues en janvier 2009, date à laquelle les instruments de mesure ont été déplacés vers les zones PR4 et PR5.

Il convient de noter une grande stabilité des températures, la fluctuation annuelle est restée limitée à 0,31°C avec un minimum estival à 12,44 et un maximum hivernal à 12,75°C. Les fluctuations journalières, hors présence humaine sont comprises entre 0,01 et 0,03°C.

Quelque soient les paramètres les conditions thermohygrométriques des 3 zones sont plus semblables que lors de la période précédente. C'est en particulier le cas pour le rapport de mélange qui varie de la même manière pour les 3 zones.

2.3/ Présentation synthétique des paramètres du microclimat des zones PR1, PR2 et PR3 (extrait du rapport détaillé du CNR)

Comparaison entre les zones 1-2				
	automne-hiver 2007-2008	été 2008	automne-hiver 2008-2009	Printemps-début été 2009
T air	1>2	1?2	1>2	1~2
T roche	1>2	2?1	1~2	2>1
Ts	1>2	2?1	1~2	2?1
Mouv.de l'air	2>>1	2>>1	2>1(aut) 1>2(hiv)	1>2
RM	1~2	1~2	1~2	1?2
HR	2>1	1~2	1~2	1>2
Dew sensor	2>1=absente	absente	absente	absente
Condens indirect	2>1=absente	absente	absente	absente

Comparaison entre les zones 2-3				
	automne-hiver 2007-2008	été 2008	automne-hiver 2008-2009	Printemps-début été 2009
T air	3>2	2?3	2?3	/
T roche	3>2	3>2	3>2	/
Ts	3>2	3~2	3?2	/
Mouv.de l'air	2>>3	3~2	3~2	/
RM	2>3	3~2	3~2	/
HR	2>3	3~2	3~2	/
Dew sensor	3>>2	absente	3>>2=absente	/
Condens indirect	3>2	absente	absente	/

Tableau I : comparaison des paramètres du microclimat des zones PR1, PR2 et PR3 en fonction des saisons

Il apparaît globalement que les conditions microclimatiques régnant au niveau des 3 zones d'étude étaient clairement distinctes durant la période automne-hiver 2007- 2008. Bien que les zones 1 et 2 soient côte-à-côte, la zone 1 se différenciait de la zone 2 cette dernière se différenciant de la zone 3. Ces différences se sont atténuées au cours de l'été 2008 et ne se retrouvent pas durant la période automne-hiver 2008-2009.

3/ Identification des populations microbiennes

3.1/ Identification des populations microbiennes par la méthode des suspensions-dilutions de sol

A T0 (février 2007) la méthode des suspensions-dilutions de sol avec étalement sur des milieux appropriés révèle une densité variant de 10^4 à 10^8 UFC.g⁻¹ pour les bactéries hétérotrophes et de 10^4 à 10^6 UFC.g⁻¹

pour les champignons et sans révéler de différence évidente selon les zones. La diversité est extrêmement faible, elle se réduit à 2 ou 3 genres pour les champignons et quelques espèces pour les bactéries. Il est à noter que seul *Fusarium* sp. est identifié à partir de la zone PR1, il est accompagné de *Gliomastix* sp dans la zone PR2 et de *Penicillium* sp. dans la zone PR3.

La même méthode appliquée aux prélèvements effectués à T + 28 mois (juin 2009) à partir des zones PR2 et PR3 permet d'estimer la densité des populations bactériennes à 10^8 UFC.g⁻¹ et celle des champignons entre 10^5 et 10^6 UFC.g⁻¹. La diversité est apparemment plus grande que celle observée précédemment : on identifie 8 à 9 espèces bactériennes différentes et 6 genres fongiques différents. Ces résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous

Zones	Microorganismes	Février 2007	Juin 2009
PR2	Bactéries	<i>Alcaligenes</i> <i>Oligella ureolyticus</i> <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> <i>Stenotrophomonas maltophila</i> <i>Bacillus</i> sp <i>Micrococcaceae</i>	<i>Moraxella</i> sp <i>Ochrobactrum anthropi</i> 4 <i>Bacillus</i> sp. 3 <i>Micrococcaceae</i>
	Moisissures	<i>Fusarium</i> sp ; <i>Gliomastix</i> sp.	<i>Gliomastix</i> sp. <i>Verticillium</i> sp. <i>Ulocladium</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp.
PR3	Bactéries	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Bacillus</i> sp <i>Micrococcaceae</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Brevundimonas vesicularis</i> <i>Bacillus</i> sp <i>Micrococcaceae</i>
	Moisissures	<i>Fusarium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp. <i>Verticillium</i> sp. <i>Gliomastix</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp.

Tableau 2: principaux genres et espèces bactériens et fongiques révélés par la méthode des suspensions-dilutions

Les bactéries participant aux cycles du carbone, de l'azote, du fer, du manganèse et du soufre ont également été dénombrées. Les groupes bactériens les mieux représentés sont ceux participant à l'ammonification et à la dénitrification qui atteignent des densités de l'ordre de 10^8 UFC.g⁻¹. Les analyses réalisées en 2009 ne montrent pas d'évolution particulièrement marquée pour ces groupes bactériens, à l'exception des bactéries nitriques dont la densité augmente nettement.

Parallèlement les taux de carbone et d'azote ont été appréciés. Le taux de carbone organique est plus élevé pour PR1 que pour les 2 autres zones et le taux d'azote, faible, ne montre pas de

différence entre les 3 zones. L'évolution au cours du temps pour les zones PR2 et PR3 montre une baisse du taux de carbone entre 2007 et 2009 et une stabilité du taux d'azote.

3.2/ Identification des populations microbiennes par la méthode d'extraction directe de l'ADN du substrat.

La méthode moléculaire basée sur l'extraction directe de l'ADN du substrat suivi d'un clonage séquençage des champignons et des bactéries est beaucoup plus sensible que la méthode précédente. Elle a permis de révéler une grande diversité aussi bien au sein des communautés bactériennes que des communautés fongiques. De plus les résultats montrent que les différentes espèces ne sont pas représentées de manière équivalente dans les 3 zones étudiées. Qu'il s'agisse des champignons ou des bactéries la zone PR1 est beaucoup plus pauvre en microorganismes que les zones PR2 et PR3

	PR1		PR2		PR3	
	n = 28		n = 30		n = 30	
	valeur absolue	pourcentage	valeur absolue	pourcentage	valeur absolue	pourcentage
<i>Geomyces sp</i>	16	57				
<i>Paecilomyces sp</i>	2	7				
<i>Geosmithia sp</i>	2	7				
<i>Doratomyces sp</i>	2	7				
<i>Tricholoma sp</i>	1	4			1	3
<i>Basipetospora sp</i>	1	4				
<i>Clavicipitaceae sp.</i>	1	4	10	33	5	17
<i>Tolypocladium sp</i>	1	4	5	17	2	7
<i>Engyodontium sp</i>	1	4	7	23	7	23
<i>Microascus sp</i>	1	4				
<i>Nomuraea sp</i>			3	10	1	3
<i>Isaria sp</i>			1	3	4	13
<i>Lecanicillium sp.</i>			2	7		
<i>Illosporium sp.</i>			1	3		
<i>Fusarium sp</i>			1	3	1	3
<i>Nuclearia sp</i>					5	17
<i>Volutella sp</i>					2	7
<i>Sclerotinia sp</i>					1	3
<i>Niesslia sp</i>					1	3

Tableau 3 : Principaux genres fongiques identifiés par clonage et séquençage de l'ADN extrait des échantillons prélevés dans les zones PR1, PR2 et PR3 en février 2007. Les résultats sont présentés en nombre de clones par phylotype pour chacune des trois zones.

L'indice de Shannon-Weaver a été calculé pour chacune des 3 communautés PR1, PR2 et PR3 afin de comparer leur diversité. La valeur de cet indice, calculé pour les communautés fongiques, est respectivement de 1.89, 2.27 et 2.20 pour les zones PR1, PR2 et PR3. La valeur la plus basse de l'indice correspond à la communauté PR1 dominée par la population *Geomyces sp*. En effet, l'indice est minimal (tend vers 0) lorsque tous les individus du peuplement appartiennent à une seule et même espèce, il est au contraire maximal lorsque les individus sont repartis d'une façon égale dans les différents espèces représentées.

	PR1		PR2		PR3	
	n = 51		n = 53		n = 52	
	valeur absolue	pourcentage	valeur absolue	pourcentage	valeur absolue	pourcentage
<i>Pseudomonas sp.</i>	38	75	2	4		
<i>Achromobacter sp.</i>	6	12	5	9	3	6
<i>Bacterium S13012</i>	2	4				
<i>Bacterium FK2</i>	1	2				
<i>Ochrobactrum sp.</i>	1	2	1	2	1	
<i>Rhizobium sp.</i>	1	2	1	2	3	6
<i>Agrobacterium sp</i>	1	2				
<i>Stenotrophomonas sp</i>	1	2	1	2		
<i>Alcaligenes sp.</i>			7	13	8	15
<i>Afipia sp.</i>			5	9	12	23
<i>Pocheonia sp.</i>			2	4	4	8
<i>Collimonas sp</i>			3	6		
<i>Brevundimonas sp.</i>			2	4	5	10
<i>Phyllobacterium sp.</i>			2	4	1	2
<i>Tetrathiobacter sp.</i>			2	4	1	2
<i>Sphingopyxis sp.</i>			2	4		
<i>Chitinophaga sp</i>			2	4		
<i>Pseudosphingobacterium sp</i>			1	2	1	2
<i>Pedobacter sp.</i>			1	2	1	2
<i>Sphingomonas sp.</i>			1	2	1	2
<i>Candidatus sp.</i>			1	2	1	2
<i>Legionella sp</i>			1	2		
<i>Pseudochrobacterium sp.</i>			1	2		
<i>Endosymbiont sp.</i>			1	2		
<i>Aminobacter sp.</i>			1	2		
<i>Mesorhizobium sp.</i>			1	2		
<i>Nostoc sp.</i>			1	2		
<i>Pedomicrobium sp</i>			1	2		
<i>Escherichia coli</i>			1	2		
<i>Pseudodevosia sp</i>			1	2		
<i>Methylobacterium sp</i>			1	2		
<i>Mesorhizobium sp.</i>			1	2		
<i>Streptomyces sp.</i>			1	2		
<i>Paenibacillus sp.</i>					3	6
<i>Pusillimonas sp.</i>					2	4
<i>Burkholderia sp.</i>					1	2
<i>Inquilingus sp.</i>					1	2
<i>Devosia sp</i>					1	2
<i>Mycoplana sp.</i>					1	2
<i>Cytophaga sp.</i>					1	2

Tableau 4 : Principaux genres bactériens identifiés par clonage et séquençage de l'ADN extrait des échantillons prélevés dans les zones PR1, PR2 et PR3 en février 2007. Les résultats sont présentés en nombre de clones par phylotype pour chacune des trois zones.

L'indice de diversité de Shannon-Weaver a été calculé pour les 3 banques de clones représentatives des communautés PR1, PR2 et PR3. Les valeurs de cet indice s'échelonnent de

0.98 pour PR1, à 3.16 et 2.58 pour PR2 et PR3 respectivement. La faible valeur enregistrée pour PR1 est expliquée par la forte représentation de *Pseudomonas sp.* (75%) dans cette zone.

La comparaison de la microflore présente au niveau des zones PR1, PR2 et PR3 montre très clairement que les populations bactériennes et fongiques de la zone PR1 diffèrent significativement de celles des zones PR2 et PR3. Les différences portent à la fois sur la diversité des espèces présentes et sur la fréquence des espèces communes aux différentes zones.

3.3/ Caractérisation de la structure des communautés microbiennes révélée par la méthode de T-RFLP suivie d'une analyse en composantes principales.

La méthode d'identification par clonage séquençage à partir de l'ADN extrait du substrat donne la composition totale de la microflore présente, mais ne permet pas de suivre l'évolution de cette microflore. Pour ce faire une autre méthode a été employée.

Sur les graphiques ci-dessous, chaque ellipse représente la structure de la communauté bactérienne (16S) ou fongique(18S) de chacune des 3 zones. Lorsque les ellipses sont superposées, la structure des communautés est comparable (sous réserve d'une vérification statistique).

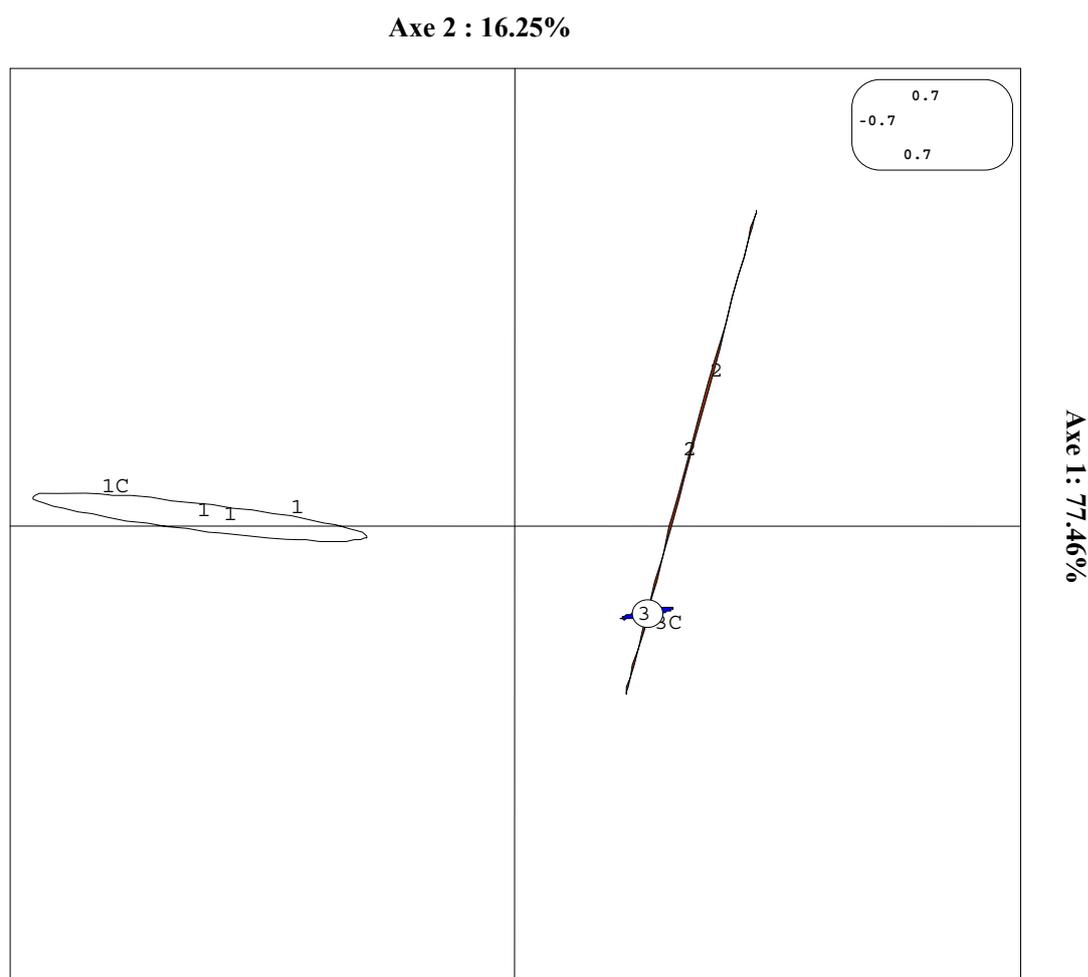


Figure 1 : Représentation graphique de l'analyse en composantes principales effectuée avec les données de T-RFLP à partir de S16 des trois zones, prélèvement de février 2007. Les ellipses représentent les intervalles de confiance de 95%.

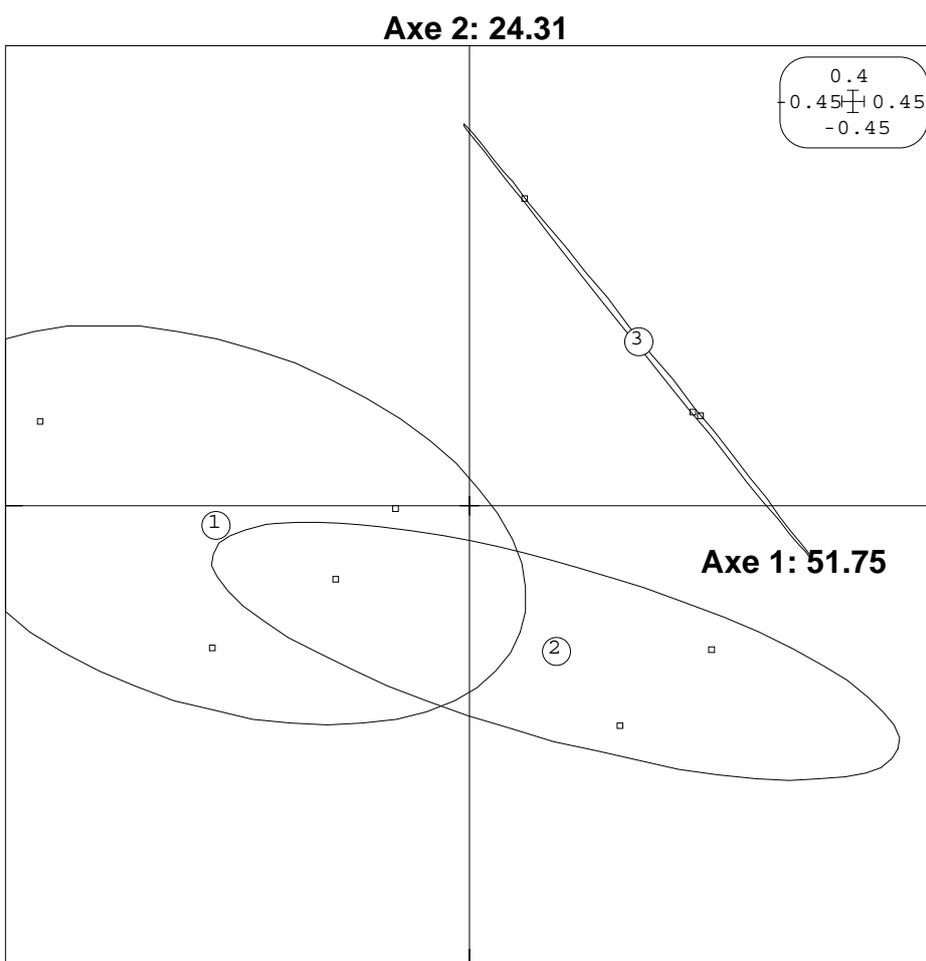
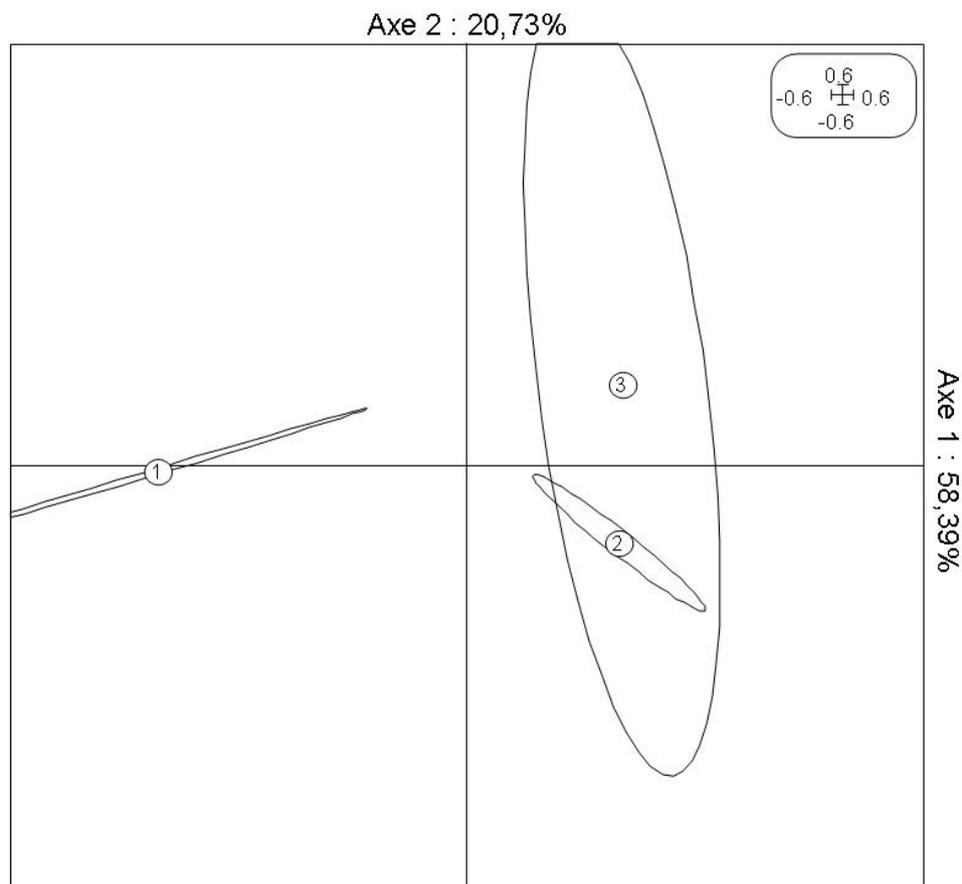


Figure 2: Représentation graphique de l'analyse en composantes principales effectuée avec les données de T-RFLP de 18S des trois zones prélevées en février 2007 (en haut) puis en juillet 2008 (en bas) *Les ellipses représentent les intervalles de confiance de 95%.*

L'analyse de la structure des communautés bactériennes et fongiques à T0 regroupe les zones 2 et 3 et les différencie nettement de la zone 1.

Les résultats obtenus à partir des prélèvements de juillet 2008 montrent que la structure des communautés microbiennes de chacune des 3 zones étudiées est significativement différente.

Le déplacement des zones sur le plan d'ACP montre que la structure de la communauté de la zone PR2 s'est éloignée de la structure des communautés de la zone PR3 et s'est rapprochée de la structure de la zone PR1.

Discussion

Ce programme ambitieux a permis d'obtenir un certain nombre de résultats intéressants, bien qu'il n'ait pas répondu à toutes nos attentes. De nombreuses difficultés d'ordre méthodologiques, qui ne seront pas discutées dans ce rapport, n'ont pas permis d'obtenir tous les résultats souhaités. Sans entrer dans le détail, il faut souligner ici que les analyses microbiologiques ont été rendues délicates par le volume très limité de matériel prélevé à la surface des supports. Cette quantité limitée de matériel n'a pas permis de répéter les analyses et n'a donc pas permis un traitement statistique des résultats.

Pour ce qui est de la caractérisation du support rocheux, les conclusions sont claires. Dans les zones étudiées les caractéristiques de la roche de l'encaissant sont-elles que le transfert d'eau à travers la roche est quasiment impossible ou tellement lent qu'il ne constitue pas un paramètre conditionnant la prolifération des microorganismes à la surface.

L'activité de l'eau dans les écaïlles et/ou les dépôts à la surface desquels se développent les microorganismes est essentiellement déterminée par les conditions microclimatiques qui règnent à l'interface de l'atmosphère de la grotte et de la paroi. Même à l'échelle réduite à laquelle les mesures ont été effectuées les paramètres du microclimat varient au cours du temps. Ainsi lors de l'hiver 2007/2008, les paramètres thermo-hygrométriques ont permis de distinguer nettement les 3 zones étudiées. La zone 2 a toujours présenté un niveau d'humidité relative supérieur à celui de la zone 1. Les paramètres du microclimat de la zone 2 la rapprochent de ceux de la zone 3, bien que cette dernière présente des phénomènes de condensation plus fréquents.

Cette différence de microclimat à la surface des 3 zones d'étude peut être rapprochée des différences de colonisation microbienne. En effet, la zone 1 « la plus sèche » est celle qui visuellement présente la colonisation microbienne la plus faible et qui, à l'analyse, présente la densité et la diversité microbienne les plus faibles. Les zones 2 et 3 quoique situées de part et d'autre du diverticule axial sont plus semblables entre elles, à la fois pour ce qui est des paramètres microclimatiques et de la colonisation microbienne.

Ces différences d'ordre microclimatiques se sont atténuées au cours de la période d'étude, et les paramètres mesurés à la surface de la zone PR1 se sont rapprochés de ceux mesurés à la surface de la zone PR2. Ce rapprochement des paramètres microclimatiques a justifié les prélèvements effectués en juillet 2008 pour savoir s'il avait entraîné une modification de la structure des communautés microbiennes. En effet, une évolution de la diversité microbienne est possible même en absence de toute modification visuelle de la colonisation de surface. Les résultats de l'analyse de la structure des communautés fongiques montre effectivement une évolution par rapport au point T0, évolution qui peut être corrélée à l'évolution des paramètres microclimatiques. En effet la structure des communautés fongiques de la zone Pré se rapproche de la structure des communautés de la zone PR1, comme le font les paramètres microclimatiques. La poursuite des mesures des paramètres du microclimat montre que ceux-ci varient au cours du temps de telle sorte que lors de l'hiver 2008/2009 les zones étudiées ne montrent plus les différences observées durant l'hiver précédent.

Il convient de remarquer qu'au cours de cette période aucune modification importante de la colonisation de surface n'a été enregistrée. Cette stabilité des colonisations de surface peut être

corrélée avec l'absence de modifications importantes des paramètres microclimatiques. Les analyses microbiologiques effectuées sur des prélèvements effectués en juillet 2009 confirment la stabilité des communautés et des activités microbiennes.

Ces observations tendent à confirmer les hypothèses de travail à savoir que les conditions microclimatiques à la surface des parois sont primordiales pour contrôler le développement microbien. A T0, les 3 zones choisies pour présenter des niveaux de colonisation différents présentaient des paramètres microclimatiques différents. Par la suite les modifications qui ont affectées le microclimat ont été de trop faible intensité pour modifier la colonisation de surface qui est restée globalement stable.

C'est afin de confirmer nos hypothèses de travail qu'il a été décidé de mesurer les paramètres du microclimat et de suivre les colonisations microbiennes à la surface de deux autres zones choisies parce qu'elles reposent sur des supports différents, l'un plus argileux, l'autre plus sableux.