



le 16 mai 2011

**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 seconde tranche d'étude**

x **CNR-ISAC (Istituto di Scienze dell'Atmosfera e del Clima - Consiglio nazionale delle ricerche) :**

*Adriana BERNARDI*

*Francesca BECHERINI*

x **INRA (Institut National de la recherche Agronomique) :**

*Fabiola BASTIAN*

*Claude ALABOUVETTE*

x **LRMH (Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques) :**

*Geneviève ORIAL, Faisl BOUSTA, Alexandre FRANCOIS, pôle « microbiologie »*

*Jean-Didier MERTZ, pôle « pierre »*

x **Cercle des partenaires du patrimoine :**

*David GIOVANNACCI, Charlotte LECLAIRE*

x **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*

*Alessandro INGOGLIA*

*Tristan MAHEO*

*Françoise MORIN*

*Alina MOSKALIK-DETALLE*

## I - INTRODUCTION

La compréhension et la maîtrise du phénomène de contamination microbiologique que connaît la grotte de Lascaux depuis plusieurs années nécessitent une connaissance approfondie de la diversité de la microflore présente ainsi que des conditions micro-climatiques qui prévalent à la surface des matériaux sur lesquels se développent les colonies. La compréhension du degré de dépendance du développement des microorganismes vis-à-vis des conditions micro-climatiques et de substrat implique 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,
- la caractérisation dynamique des paramètres du microclimat.

Les colonies fongiques et bactériennes qui contaminent la grotte ré-apparaissent régulièrement, aux mêmes endroits, malgré les traitements et le nettoyage effectués par les restaurateurs. Cette ré-apparition permet de formuler l'hypothèse selon laquelle des conditions particulières microclimatiques et de substrat permettent le développement, sous forme de colonies visibles, de microorganismes qui pré-existent dans la cavité.

La recherche de corrélations entre les paramètres de l'air au voisinage immédiat de la roche avec les propriétés de transfert d'humidité dans le rocher calcaire se base sur des mesures *in situ* ; elle a pour but de comprendre les raisons du développement microbien visible en fonction de modifications thermohygrométriques de l'environnement.

Pour mener à bien cette recherche il convient donc :

- de « dresser l'inventaire », en fonction du temps, des populations microbiennes autochtones de la grotte, à partir d'échantillons prélevés dans des zones apparemment saines et des zones contaminées,
- de doser la matière organique disponible pour les microorganismes et plus spécifiquement les taux de carbone et d'azote organiques,
- enfin de mesurer de manière précise les conditions de température, d'humidité relative et spécifique, du mouvement de l'air près de la surface, ainsi que la température et la teneur en eau des substrats susceptibles de contenir des éléments nutritifs utilisables par les microorganismes. Ces mesures sont pratiquées aux emplacements où sont effectués les prélèvements pour les analyses microbiologiques. Pour ce qui concerne les supports minéraux poreux, la caractérisation de leur comportement et en particulier les paramètres de stockage et de transfert de l'eau viennent compléter les mesures microclimatiques effectuées *in situ*.

Le but recherché est d'assurer un suivi dynamique de l'évolution des caractéristiques de surface et en particulier de la colonisation fongique pour tenter de le corrélérer avec l'évolution des données du micro-climat et du substrat enregistrées grâce aux sondes mises en place dans la couche superficielle de la roche.

La première partie de ce programme a concerné trois zones respectivement nommées PR1, PR2 et PR3 et situées à l'entrée du diverticule axial.

En raison de l'absence de développement de microorganismes visibles à la surface de ces zones et des possibilités limitées de prélèvement à leur surface, le croisement des données microclimatiques et microbiologiques s'est avéré impossible. Dès lors, une réorientation du programme a été approuvée en séance plénière du Comité Scientifique International en juillet 2008. Deux zones de référence ont à nouveau été définies pour faire l'objet de nouvelles investigations.

## 2 – SÉLECTION DES ZONES D'ÉTUDE

Les deux zones, nommées PR4 et PR5, sont situées à l'entrée de la Nef, coté gauche, sous le panneau de l'Empreinte (cf. fig 1). Elles sont contiguës et d'extension métrique.

Les critères ayant prévalu à leur sélection sont :

- la différenciation nette des substrats puisque PR4 correspond à une zone sableuse, « sèche » et jamais affectée par le développement de microorganismes tandis que PR5 est une surface constituée de sédiments sablo-argileux compactés sous la forme d'un dépôt d'épaisseur pluricentimétrique ;
- l'état biologique des surfaces, PR4 étant une zone « inerte » et stable tandis que PR5 est recouverte d'une multitude de tâches noires *a priori* actives ;
- la possibilité d'effectuer des prélèvements périodiques, tous les 3 mois, pour les besoins d'analyses microbiologiques ;
- la possibilité d'adjoindre aux analyses en laboratoire, un suivi photographique périodique traité par analyse d'images.

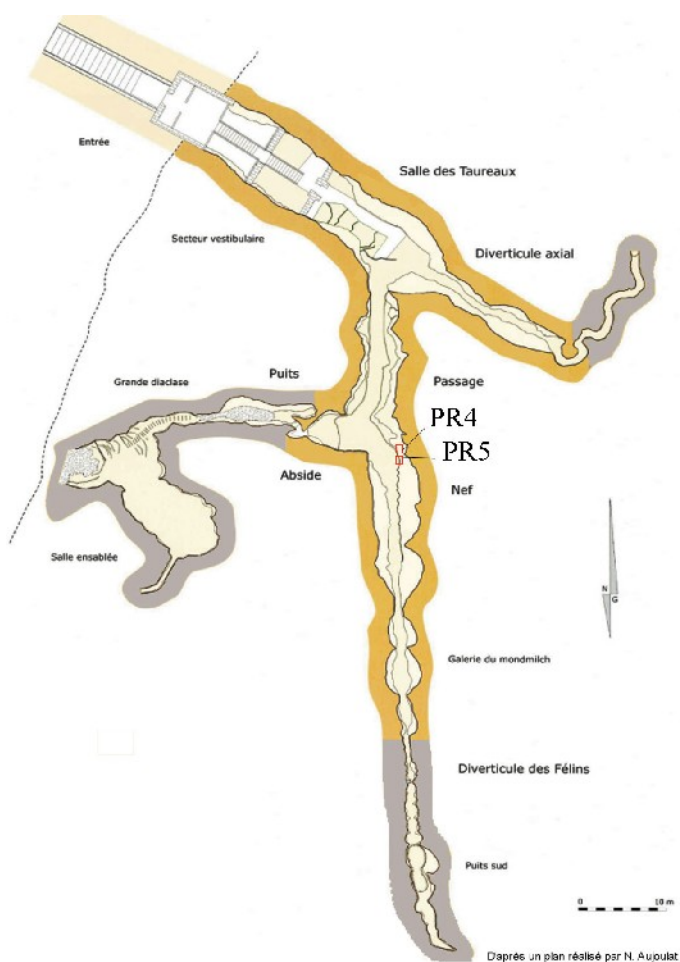


Figure 1 : Localisation des zones choisies pour le programme de recherche

#### *L'équipe des restaurateurs*

Le choix de cette zone a été principalement motivé par le fait qu'une grande quantité de matière pouvait y être prélevée à des fins d'analyses : on ne se situe pas sur des surfaces dites « archéologiques » et le substrat n'est pas trop dur.

Une importante collecte d'informations a d'autre part été faite à cet endroit par notre équipe depuis 2002. La banquette horizontale est régulièrement documentée dans nos chroniques hebdomadaires depuis juillet 2002. Deux zones témoins ont été choisies en 2004 dans cette partie de la cavité en raison de la forte activité biologique à cet endroit : N1, incluant l'actuelle PR5 et N2 comprenant le bison du Panneau de l'Empreinte. Ces zones témoin ont fait l'objet d'une couverture photographique et de relevés graphiques depuis avril 2004. Des essais de nettoyage ont été pratiqués sur N1 à partir de 2006.

#### 3.1 - MODE OPÉRATOIRE

Le mode opératoire initialement prévu était de réaliser trois relevés par zone lors de chacune de nos interventions : relevé des plages blanches (PB), relevé des plages humides visibles (RH) et relevé des taches colorées (TC). C'est le même principe qui a été observé pour les zones PR1-2 et 3.

Pour rappel, une seule information est figurée par relevé, soit six calques par intervention pour les deux zones (à raison de 3 à 4 heures/homme). Cependant, à partir du mois de février 2010, pour répondre à certaines difficultés rencontrées, le relevé des taches colorées a été remplacé par un relevé photographique précis assuré par Stéphane Konik.

Comme pour PR1-2-3, nous avons retenu deux niveaux de notations pour les plages blanches (PB) en distinguant des plages fines (visibles uniquement en lumière rasante, et de hauteur inférieure au millimètre) et des plages épaisses (de hauteur supérieure au millimètre).

De la même manière, pour les relevés hydriques, nous avons distingué les zones mouillées (film hydrique continu et se développant en épaisseur par rapport au substrat), les plages humides (film hydrique discontinu, aspect satiné en lumière rasante) et les zones à l'aspect très sec (aspect poudreux ou mat en fonction des substrats).

Sur les relevés des taches colorées (TC), nous avons représenté d'une part les taches noires en leur donnant à nouveau deux valeurs selon leur densité et d'autre part les taches rouges ou rosées. Les calques obtenus ont été scannés et envoyés au Laboratoire de recherche des monuments historiques après chaque intervention.

Comme pour les PR1, 2 et 3 (+bis), nous avons superposé les calques obtenus afin de chercher d'éventuelles corrélations entre les différents phénomènes observés.

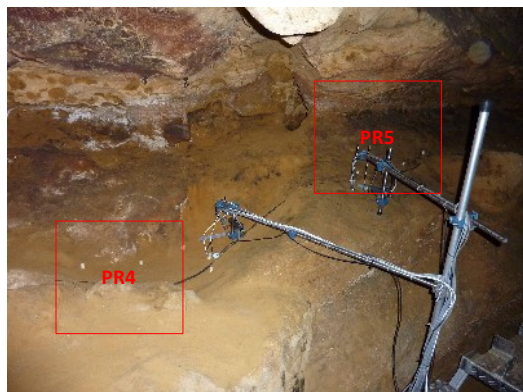
Les cumuls de calques sont faits sur une longue période en suivant un seul phénomène, par exemple la superposition des calques des plages blanches sur toute la durée de l'étude. On peut ainsi déterminer les zones qui ont été contaminées au moins une fois et celles qui ne l'ont jamais été. Le cumul des calques de deux phénomènes permet de mettre en évidence des interactions possibles entre eux. Par exemple, la présence d'une humidité visible importante se superpose à celle de taches colorées (la réciproque ne se vérifiant pas).

#### 3.2 - DIFFICULTÉS RENCONTRÉES

Nous avons eu à faire face à plusieurs difficultés pour documenter PR4 et PR5 (fig. 2 et 3). Tout d'abord, si leur accès peut sembler assez aisé à première vue, la forte pente du sol de la nef a nécessité la mise en place de gradins permettant d'obtenir une bonne planéité. Or l'important appareillage de mesure ainsi que les deux pieds photo qui ont été installés sur ces gradins, nous ont laissé peu de place pour travailler.

Une autre difficulté était due aux photos servant de fond à nos relevés. Elles étaient légèrement déformées. De plus, les substrats de chaque zone étant relativement homogène, et les reliefs peu marqués, il était assez difficile de se repérer pour localiser les phénomènes sur les calques.

Le relevé des taches colorées s'est avéré très long : 2 heures pour PR5 avec un résultat peu satisfaisant. Il a été très difficile d'obtenir un document complet pouvant servir comme point de départ. Malgré une concertation régulière entre les membres de l'équipe, la subjectivité du regard donnait une interprétation différente de chaque phénomène. Patine et taches sombres pouvaient être différemment appréciées selon l'observateur et selon l'humidité relative de la cavité au moment de l'observation.



**Figure 2 :** PR4 et PR5 : les emplacements sont matérialisés in situ par des plots blancs. Pour chacun d'eux, il y a deux compartiments : l'un pour les observations, l'autre, contigu, pour les prélèvements et l'instrumentalisation



**Figure 3 :** PR5 : en cours d'observation. On utilise la lumière rasante pour visualiser les plages humides ou les duvets les plus fins

### 3.3 - BILAN DES RELEVÉS

Sur la durée de l'étude, nous avons réalisé 24 campagnes de relevés pour les plages blanches et les plages humides visibles. Les taches colorées ont été relevées lors des 14 premières campagnes. La prise de vues photographiques par Stéphane Konik a remplacé notre documentation sur calque.

### 3.4 - BILAN DES CHRONIQUES HEBDOMADAIRES ET OBSERVATIONS RÉGULIÈRES

- **Entre 2001 et 2003 :**  
Présence récurrente de plages blanches, quelques rares taches gris pâle.  
Traitements au Vitalub et nettoyages avec Grégomatic.
- **Fin 2004 :**  
Diminution des plages et observation des premières taches noires colonisées par les insectes.  
Nettoyages manuels et avec Grégomatic.
- **Entre 2005 et 2006 :**  
Très peu de plages et de plots blancs mais augmentation des taches colorées.  
Nettoyages.
- **Entre 2007 et 2009 :**  
Absence de plages blanches et lente augmentation des taches colorées.

Les conclusions que l'on peut tirer de l'historique du secteur sont que la forte contamination par les plages blanches de 2001 à 2004 fait progressivement la place à une contamination par les taches colorées. À partir de 2008, la contamination blanche est quasiment nulle et l'évolution des taches noires est très lente.

### 3.5 - LA ZONE PR4

#### 3.5.1 - Description

La zone PR4 (fig. 4 et fig. 5) est localisée sur la banquette gauche de la Nef, à l'entrée. Elle est légèrement à droite du Bison du Panneau de l'Empreinte, visible juste au-dessus. Plus précisément, elle est établie dans un creux précédant, vers le fond, l'amorce de la paroi rocheuse émergente. Au-delà cette dernière est marquée par un pincement profond qui correspond au départ de la voûte en surplomb. Bien que située à proximité du passage aménagé pour circuler dans la Nef (escalier, sol en pente), la zone PR4 semble ainsi relativement à l'abri des perturbations (creux, proximité de la voûte).



Le substrat est constitué de sédiments non compactés, d'aspect sableux, sur de la roche affleurant ponctuellement. Il présente en surface des grains détachés, de tailles différentes : boulettes de terre, particules de chaux (issue de l'épandage de 2001-2002), petits fragments de ciment (provenant du muret maçonné qui cache l'éclairage fixe du champ orné). La zone est traversée par un câble électrique alimentant une des lampes.

Il convient de noter qu'avant l'installation du programme de recherche, la banquette du Panneau de l'Empreinte a souvent été perturbée. Historiquement, elle fait partie des zones qui ont été transformées par les travaux d'aménagements de la grotte pour les visites (creusement des sols et aménagement du système d'éclairage). Dans un passé plus récent, elle a été utilisée pour accéder aux peintures et réaliser les observations rapprochées (N2). Traditionnellement, après chaque station, il était d'usage de lisser à la main les dépôts pour enlever toute trace visible de passage (empreintes de pieds ou autres).



**Figure 4 :** PR4, morphologie de la zone. La hauteur de chaque niveau est de 2 cm environ. La partie la plus haute se situe côté gauche

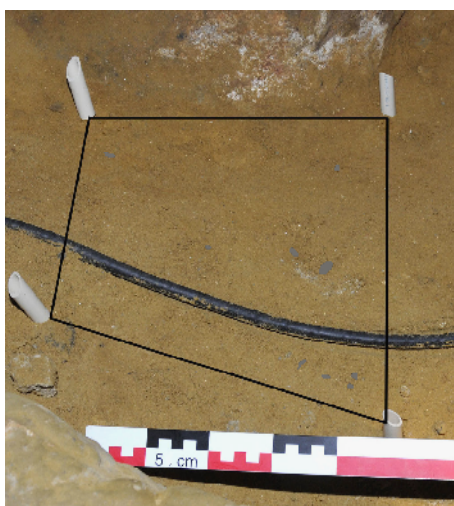


**Figure 5 :** PR4, nature du substrat : sédiments poudreux, assez homogènes

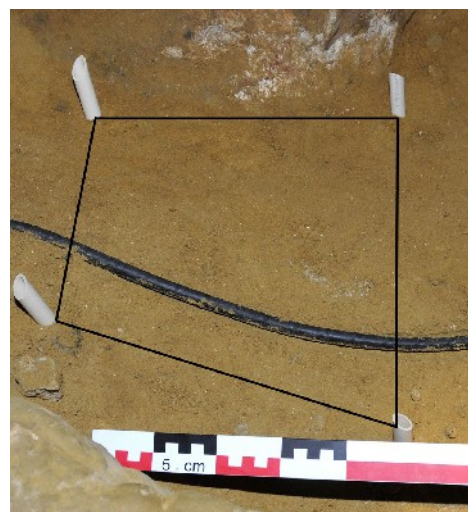
### 3.5.2 - Résultats

La nature du substrat n'a pas permis de relever la présence d'humidité visible qui, si elle existe, est absorbée (fig. 6 et 7). Aucune plage blanche n'a non plus été notée dans cette zone témoin. Les taches colorées, à savoir uniquement des taches roses relativement claires, étaient déjà présentes. Pendant la période d'observation, elles n'ont pas évolué dans cette zone quasiment inactive.

Par contre, après, nous avons noté l'apparition d'une tache grise au centre de la zone (semaine 25 de 2010). Elle n'a pas évolué ni dans sa forme ni dans sa coloration depuis.



**Figure 6 :** PR4 – Relevé des taches colorées



**Figure 7 :** PR4 – fond photo des relevés graphiques

### 3.6 - La zone PR5

#### 3.6.1 - Description

Cette zone est située à droite de PR4, à une distance d'environ un mètre, dans la continuité du plan horizontal de la banquette. Elle est très proche du Panneau de l'Empreinte, mais appartient à une autre section de la Nef, celle du Panneau de la grande Vache Noire, incluse dans un espace voûté beaucoup plus vaste (fig. 8 et 9).

La zone PR5 nous paraît un peu plus exposée aux perturbations que sa voisine car elle est plus proche de la limite verticale de la paroi. Il n'y a pas de relief la séparant du large couloir de circulation de la Nef et sa pente est orientée vers le sol de ce dernier. D'autre part, à cet endroit, le surplomb de la voûte est moins marqué, l'espace est plus ouvert que pour PR4.

Le substrat est constitué de sédiments argileux compactés. L'aspect est plus lisse, même s'il y a aussi des grains détachés, notamment à proximité de la gaine électrique.

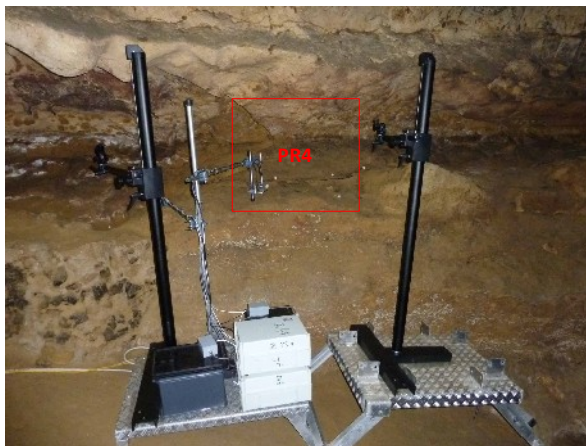


**Figure 8** : PR5, morphologie de la zone. La hauteur de chaque niveau est de 2 cm environ. La partie la plus haute se situe en haut de la photo



**Figure 9** : PR5, nature du substrat : sédiments argileux compactés et homogènes

Pour les mêmes raisons que pour PR4, la surface de cette zone a été perturbée. Elle a reçu des interventions répétitives de nettoyage, mais surtout, cette extrémité de la banquette fut un point d'accès pour circuler au pied du panneau de la Grande Vache Noire, que ce soit pour y effectuer des interventions (traitement et/ou nettoyage) ou des relevés graphiques. Cet accès est difficilement praticable du fait de la proximité du champ orné et du manque de recul par rapport à la paroi. Il ne s'effectue qu'avec le maximum de précaution, et de façon restrictive (fig. 10 et 11).



**Figure 10** : la banquette gauche de la Nef et la localisation de PR5



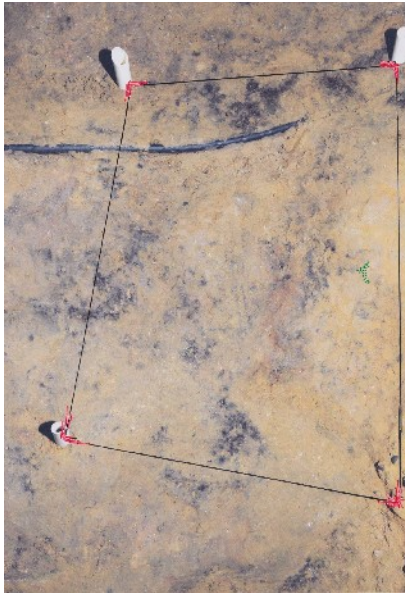
**Figure 11** : la zone PR5 est située au début de la banquette horizontale qui sert d'accès au panneau de la Grande Vache Noire



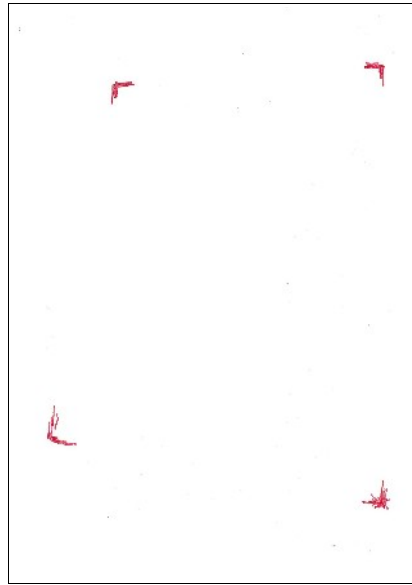
Comme sur PR4, aucun duvet blanc n'a été relevé sur PR5 pendant la durée de l'intervention. En revanche, la nature du substrat a permis de relever la variation des plages humides visibles.

L'évolution des taches colorées a été très lente durant toute la durée de l'étude. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'évolution significative.

### 3.6.2 - Activité des plages blanches



**Figure 12** : PR5, cumul des calques des plages blanches sur le fond photo



**Figure 13** : PR5, idem sur fond blanc

Les relevés ci-dessus [sur le fond photo à gauche (fig. 12) et sans le fond à droite (fig.13) ] correspondent au cumul des calques remplis au cours de la période d'étude. Pas la moindre plage blanche n'a été relevée entre juin 2009 et août 2010. Le résultat est concordant avec la zone PR4.

### 3.6.3 - Activité des taches colorées



**Figure 14** : PR5, cumul des calques des taches colorées sur le fond photo



**Figure 15** : PR5, idem sur fond blanc



Les deux figures ci-dessus (fig.14 et 15) représentent à gauche le cumul des relevés des taches colorées au cours de la période d'étude. Les taches noires apparaissent en noir et les taches roses en gris. On constate que ces taches colorées occupent environ 50% de la surface de la zone et que la superficie des taches noires est plus importante que celle des taches roses. Par ailleurs, on remarque que les deux types de taches ne se superposent pas en général.

### 3.6.4 - Localisation des plages visuellement humides



Figure 16 : PR5, cumul des calques des plages humides sur le fond photo

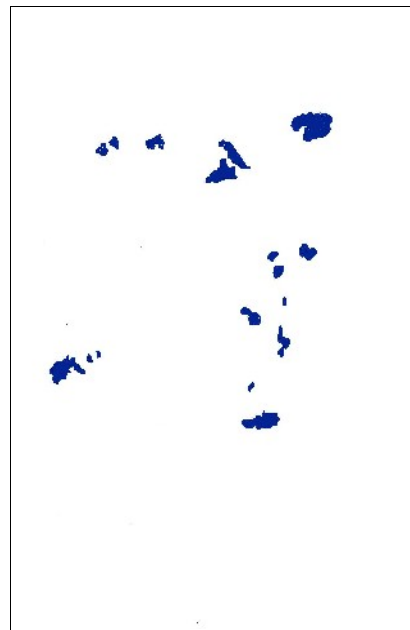


Figure 17 : PR5, idem sur fond blanc

Les figures ci-dessus (fig.16 et 17) correspondent au cumul sur toute la durée de l'étude des relevés des plages humides visibles. La surface notée est peu importante par rapport à la surface totale de la zone et en comparaison avec les relevés effectués sur PR3bis par exemple.

Ces plages ont des formes relativement bien dessinées, fermées et « patatoïdales », sans lien apparent entre elles. Si on les met en relation avec la morphologie de la zone, on se rend compte que leur localisation peut s'expliquer de deux façons différentes. L'eau stagne dans les zones dont le relief est en léger creux : c'est le cas des deux groupes de plages humides encadrées en orange sur la figure 16. Pour le groupe restant qui se développe le long d'une bande verticale à droite de la zone, c'est plutôt le degré d'inclinaison de la pente, plus marqué à cet endroit, qui est en cause.

Les données intéressantes sont plus facilement appréciables en mettant en rapport la surface humide et la surface totale de la zone à chaque intervention. Ces valeurs sont retranscrites dans la figure suivante.

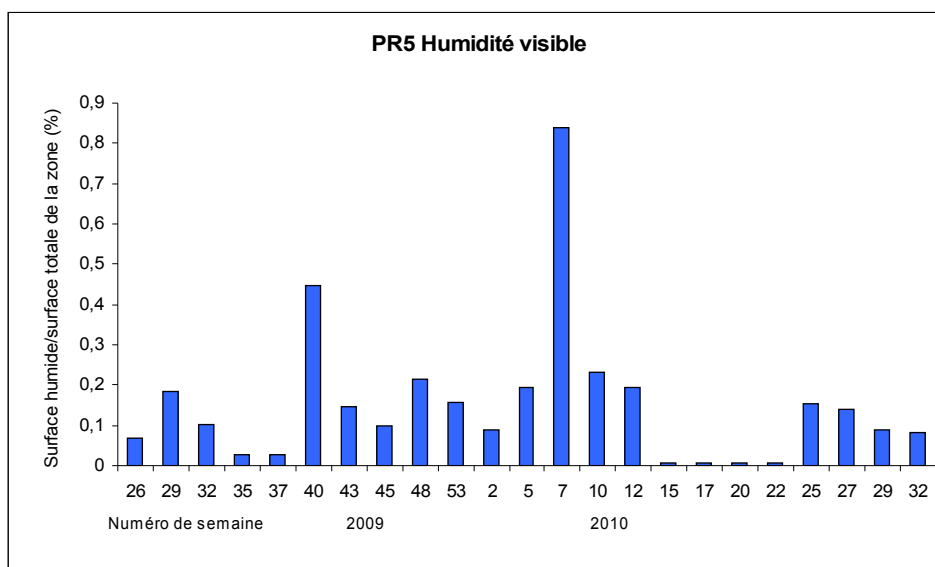
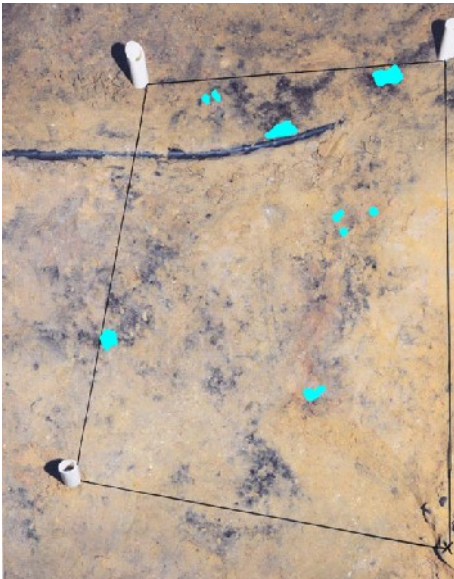
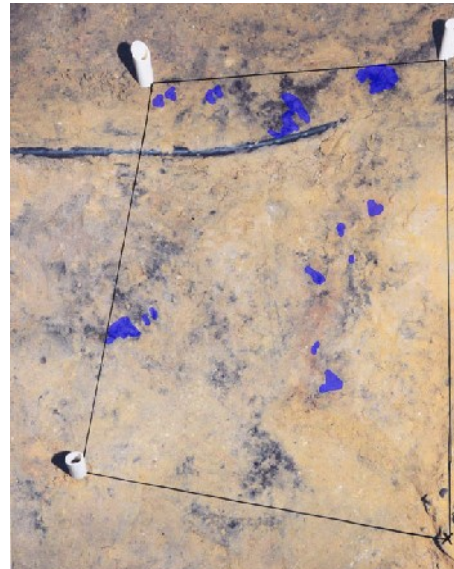


Figure 18 : valeur relative de surface de la zone visuellement humide par rapport à la surface totale de la zone

Cet histogramme permet de mettre en évidence deux saisons. Une saison humide entre la semaine 39 et la semaine 12 et une saison plus sèche entre la semaine 13 et la semaine 38. Cette différence d'humidité visible mise en évidence par les courbes est cependant faible si l'on tient compte de l'unité utilisée et si l'on examine le cumul des calques pour les deux périodes (fig. 19, 20, 21 et 22).



**Figure 19** : PR5, cumul des calques des plages humides de la semaine 13 à la semaine 38



**Figure 20** : PR5, cumul des calques des plages humides de la semaine 39 à la semaine 12



**Figure 21** : PR5, cumul des calques des plages humides de la semaine 13 à la semaine 38 sur fond blanc



**Figure 22** : PR5, cumul des calques des plages humides de la semaine 39 à la semaine 12 sur fond blanc

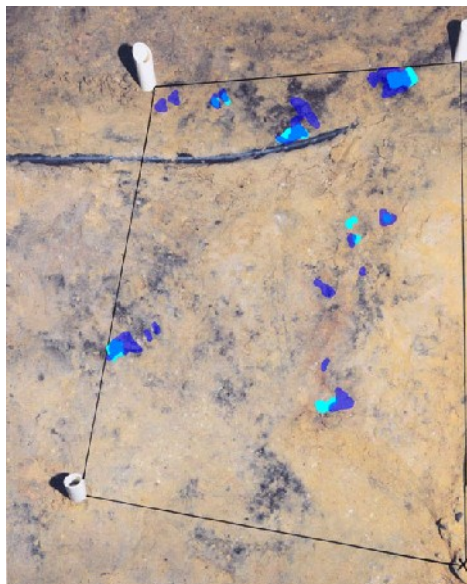


Figure 23 : PR5, superposition des calques de plages humides des saisons sèches (bleu foncé) et humides (bleu clair)

En superposant ces deux cumuls de calques distingués par deux couleurs différentes, on constate que les zones humides relevées en saison humide (semaines 39 à 12), ici en bleu clair, ne se superposent pas directement avec les relevés faits en saison sèche (semaine 13 à semaine 38) en bleu foncé. Les localisations semblent plus nombreuses et dispersées en saison sèche.

### 3.6.5 - Corrélations entre TC et RH



Figure 24 : PR5, cumul des calques taches colorées et de l'humidité sur le fond photo

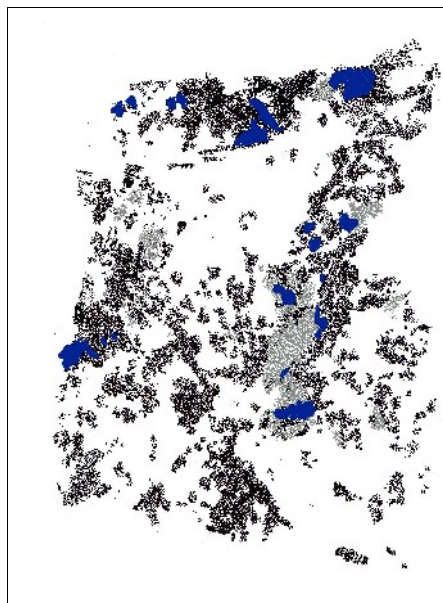


Figure 25 : PR5, idem sur fond blanc

On constate ici (fig. 24 et 25) que les zones humides se superposent toujours aux taches colorées. Dans ce cas précis, elles sont préexistantes aux relevés d'humidité. Par contre, il y a de nombreuses zones tachées où nous n'avons pas observé d'humidité visible pendant la durée du programme.



### 3.6.6 - Évolution des taches colorées

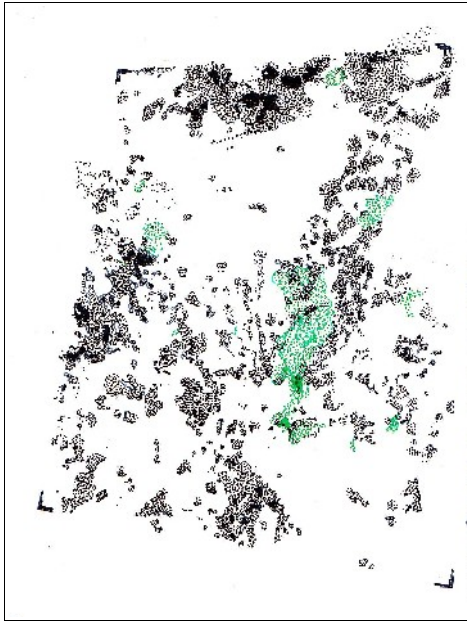


Figure 26 : PR5, relevé des taches colorées en semaine 38-2009

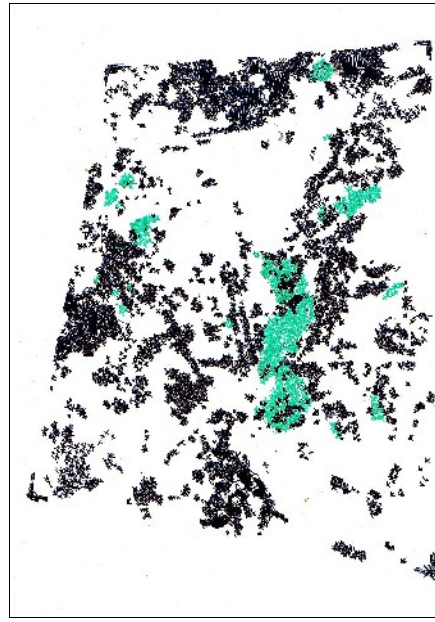


Figure 27 : PR5, idem en semaine 07-2010

Une observation attentive de ces relevés (fig. 26 et 27) permet de constater une densification des taches colorées (noires ou roses). Cette information est cependant à relativiser. En effet, le relevé de la semaine 38 a été fait en période sèche alors que celui de la semaine 07 a été fait en période plus humide et l'humidité a tendance à accentuer les contrastes de couleurs.

Sur le relevé le plus récent, on peut également noter l'apparition de points supplémentaires. Une comparaison précise de la localisation de ces derniers avec le fond photo de départ ne permet pas d'affirmer qu'il s'agit de nouvelles taches.

### 3.7 - CONCLUSION

Cette seconde étape du programme de recherche ne nous a pas permis d'obtenir des résultats aussi significatifs que dans la première. En effet, les deux zones retenues sont très peu évolutives et exemptes de plages blanches. La progression des taches colorées est très lente, difficile à mettre en évidence. Nous n'avons pas pu corréler une activité microbologique avec les zones humides relevées.

Si nous comparons les différents phénomènes observés (PB, TC, RH) à ceux recueillis pour l'ensemble des plans inclinés de la nef pendant la même période (fiches collectives), nous nous rendons compte que les zones PR4 et 5 s'inscrivent dans la même évolution :

- pas de plages blanches visibles (les seules contaminations blanches relevées dans la Nef sont localisées sur les champs ornés, au niveau de la voûte) ;
- des taches noires préexistantes à l'évolution nulle ou très lente (quelques points millimétriques supplémentaires ?). Il y a certes une activité de taches colorées spécifiques dans la Nef (taches jaune-brun, épaisses, en connexion avec une présence de cavernicoles), mais elle concerne un substrat très distinct (soubassement de Mondlmich) et se situe dans une autre zone, (seconde moitié) ;
- des plages humides saisonnières localisées et bien délimitées.



#### 4.1 - MÉTHODOLOGIE DU SUIVI PHOTOGRAPHIQUE DE L'ÉVOLUTION DES SURFACES COLONISÉES

Le suivi photographique a été réalisé par Stéphane KONIK du Centre national de la préhistoire.

##### 4.1.1 - But

Il s'agissait de réaliser des séries de photos des *zones de suivi photographique* (zones témoins, sans aucune intervention, jouxtant les zones réservées aux prélèvements), afin d'obtenir, par traitement d'image, des mesures objectives des variations de surface des recouvrements microbiologiques étudiés. Les photos de suivi dans le temps de chaque zone devaient pouvoir être comparées entre elles. Pour cela elles ont été prises avec le même matériel photographique, comportant toujours les mêmes réglages, avec des cadrages identiques.

##### 4.1.2 - Méthodologie

La difficulté principale de l'opération était de réaliser des cadrages parfaitement identiques d'une prise de vue à l'autre. Pour cela, nous avons équipé chaque zone de suivi d'un pied colonne<sup>1</sup> permettant de fixer l'appareil photo (fig. 28). En raison de l'inclinaison du sol de la Nef, nous avons dû fixer, à l'aide de vis, les pieds colonne sur des supports en inox permettant d'avoir un plan horizontal.

Cependant, il n'était pas possible de laisser un appareil photo fixé en permanence sur chaque pied devant chaque zone de suivi, même dans un boîtier étanche car nous n'aurions pas pu éviter la formation de condensation devant l'objectif.

Tous les automatismes des matériels photographiques (boîtier, flash) ont été débrayés, les réglages manuels ont été utilisés (tableau ci-dessous), la mise au point était, elle aussi, faite manuellement. Pour une répartition plus uniforme de la lumière, nous avons utilisé un flash double pour macrophotographie, avec des réglages manuels (dont l'intensité de l'éclair).



Figure 28 : pied colonne (en noir) devant la zone PR4

Boîtier photo	Nikon D300
Mode	manuel
Vitesse	1/60 s
Ouverture	F/11
Sensibilité	ISO 200
Balance des blancs	Flash
Objectif	Nikkor VR 24-120mm
Focale de l'objectif	24 mm
D-Lighting	non
Réduction bruit ISO	non
Réduction bruit	non
Flash	Kit Nikon R1C1 contrôleur SU 800 et 2 flashes asservis sans câble SB-R 200
Mode flash	Manuel, intensité de l'éclair 1/4
Réglage flash	macro
Synchro flash	1 <sup>er</sup> rideau

Tableau 1 : réglage de l'appareil photo

<sup>1</sup>Pied colonne réf. Manfrotto 806 équipé d'une rotule de fixation de boîtier photo réf. Manfrotto 486 RC2

Les photos ont été prises au format natif (raw) de l'appareil, puis converties au format tiff, reconnu par le logiciel de traitement d'image. Ces conversions ont toutes été réalisées avec le même logiciel<sup>2</sup>.

## 4.2 - ANALYSE D'IMAGES

Une fois les images acquises, un traitement "ad hoc" a été mis au point pour suivre l'éventuelle évolution des colonisations fongiques noires. Les fichiers images sont enregistrés au format TIFF afin de ne pas perdre d'information contrairement au format compilé d'images JPG.

### 4.2.1 - Méthodes d'analyses d'images

#### ✓ Décomposition de l'image

Plusieurs systèmes de décomposition d'images en couleurs existent. Le plus couramment utilisé est le système **RGB** (Red Green Blue). Cependant, la décomposition de l'image dans d'autres espaces permet soit d'accentuer certaines couleurs, comme le système **CMYk** (Cyan Magenta Yellow black), soit de rapprocher les écarts de couleur mesurés aux écarts de couleur tels qu'ils sont perçus par l'œil humain (système **Lab**, CIE 1976).

Dans l'espace couleur **Lab**, le paramètre **L** qui varie de 0 (noir, absence de couleur) à 100 (blanc) indique la clarté tandis que 'a' et 'b' sont les coordonnées de chromaticité. Dans le diagramme de chromaticité, les composantes a et b désignent les sens des couleurs : '+a' va vers le rouge, '-a' vers le vert, '+b' va vers le jaune et '- b' vers le bleu. Le centre du diagramme est alors considéré comme achromatique.

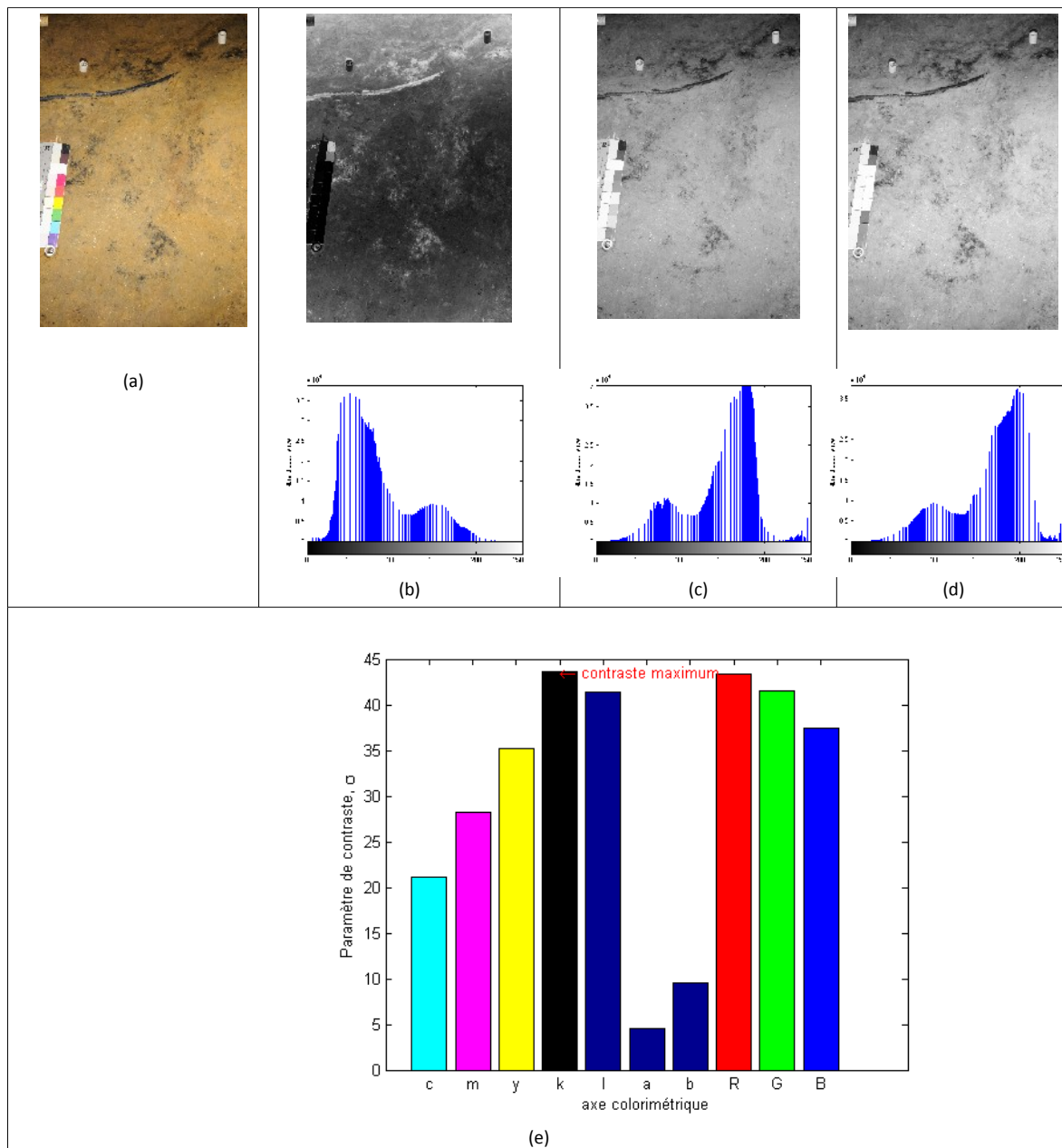
La décomposition est considérée comme optimale lorsque les zones noires (considérées comme colonisées) se distinguent plus clairement que sur l'image en vraies couleurs sans perte d'information, c'est-à-dire lorsque le contraste est maximum. La décomposition de l'image doit donc se faire selon le vecteur chromatique où le contraste est maximum. Cependant, pour une image en couleur, le contraste est défini comme une variation locale de la luminance [Sève 1996]. Une image décomposée selon un vecteur chromatique n'a pas de luminance au sens strict du terme, néanmoins, le contraste sera ici défini comme une variation locale du niveau de couleur. Le moyen le plus simple de mesurer la dispersion de cette luminance est alors de comparer les distributions des niveaux de couleurs selon chaque vecteur chromatique; le vecteur optimal sera celui possédant la distribution à l'écart type maximum. Cette hypothèse n'est valable que pour une distribution continue [Saporta 2006], ce qui est vrai pour toutes les images traitées.

La figure 29 illustre la décomposition de l'image de la zone PR5 et l'histogramme associé :

- a - en vraies couleurs (pas d'histogramme car l'image est la somme de plusieurs images décomposées selon un vecteur chromatique, ici RGB),
- b - dans l'espace CMYk, vecteur noir, k,
- c - dans l'espace Lab, vecteur L,
- d - dans l'espace RGB, vecteur rouge, R.

---

<sup>2</sup> Capture NX édité par le fabricant de l'appareil photo



**Figure 29 :** décomposition de l'image de la zone PR5 dans différents espaces :  
a) en vraies couleurs ;  
b) selon la composante k de l'espace CMYk  
c) selon la composante L de l'espace Lab  
d) selon la composante R de l'espace RGB  
e) variation de l'écart type en fonction de l'axe chromatique

Les décompositions dans les espaces Lab vecteurs L et dans l'espace RGB, vecteur B, sont visuellement équivalentes. Cependant, l'utilisation du paramètre écart-type permet de les différencier facilement avec un meilleur contraste pour le vecteur L. Pour ce type de substrat, la vectorisation des images selon l'axe chromatique k sera systématiquement utilisée. Il en va de même pour la zone PR4. Le traitement d'image sera par la suite appliqué sur cette image qui sera abusivement nommée en "niveau de gris".

✓ **Méthode de traitement de l'image**

Bien que la prise d'image soit sériée au maximum, des mouvements de translations ont lieu pendant la prise des clichés. S'il peut exister un petit mouvement horizontal ou latéral, cette composante est facilement rectifiable par recalage sur les repères physiques fixes qui délimitent chacune des deux zones. La composante verticale, quant à elle, est beaucoup plus gênante car elle induit un effet de zoom avant ou arrière. La correction doit alors prendre en compte ce gain/perte d'information. Une procédure simple d'addition/soustraction d'images pour mesurer les zones colonisées est alors impossible, (chaque pixel ne correspondant plus aux mêmes points d'une image à l'autre).

Par conséquent, la méthode choisie repose sur :

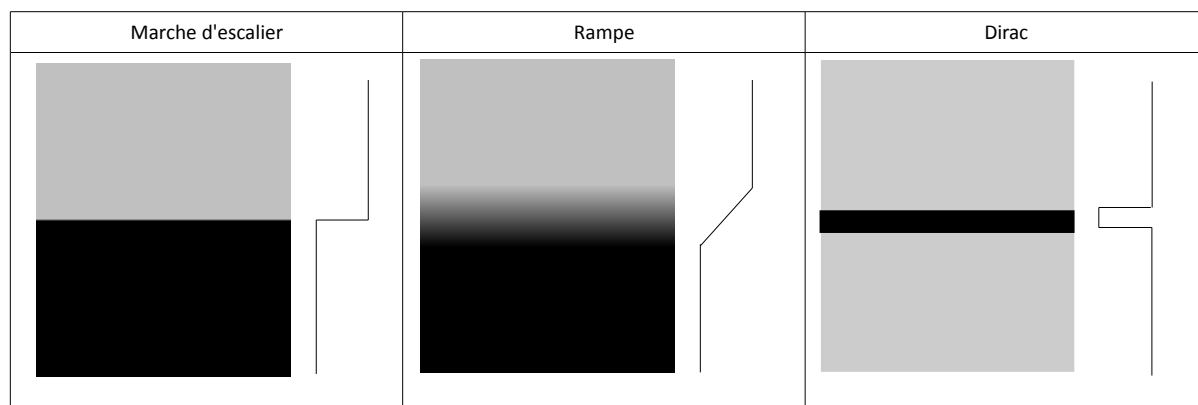
- une reconnaissance de forme pour sélectionner systématiquement la même zone,
- un filtre type passe bas (Barberousse, 2006; De Muynck *et al.*, 2009) pour mesurer les surfaces colonisées sur les zones choisies.

✓ *Reconnaissance de forme*

Des plots blancs en plastique, de 1 cm de diamètre, ont été fixés dans le substrat pour délimiter les zones de suivi. La technique de reconnaissance de forme mise en place va s'appuyer sur ces plots et comprend deux étapes successives :

- segmentation de l'image de référence et de l'image à analyser, par détection des contours ;
- détermination des corrélations entre les deux images et donc reconnaissance de la forme des plots.

Par définition, un contour est une brusque variation de niveau de gris dans une image. Ainsi, si le contour est net entre deux zones de niveaux de gris différents, la variation sera brusque et le contour pourra être défini comme une "marche d'escalier". Au contraire, si le contour est plus flou, la variation sera progressive entre les deux zones et elle ressemblera plus à une "rampe". Enfin s'il s'agit d'une ligne sur un fond uniforme, cette variation brusque sera du type « Dirac », comme illustré sur la figure 30.



**Figure 30** : illustration des variations possibles du niveau de gris en présence d'un contour et images associées









Les techniques pour détecter ces contours vont donc s'appuyer sur une analyse de la variation du niveau de gris, et donc logiquement vers une analyse des gradients et Laplacien.

L'algorithme de Canny (Canny, 1986) est un algorithme qui cherche les contours en testant à la fois la norme et la direction du gradient de l'image en un point. L'image est binarisée en conservant les maxima locaux. Un exemple de la binarisation des plots de la zone PR4 est donné dans le tableau 2.

Cet algorithme présente plusieurs avantages :

- bonne détection des points de contours (notamment pour les contours faibles),
- localisation fiable des points de contours,
- unicité de la détection.

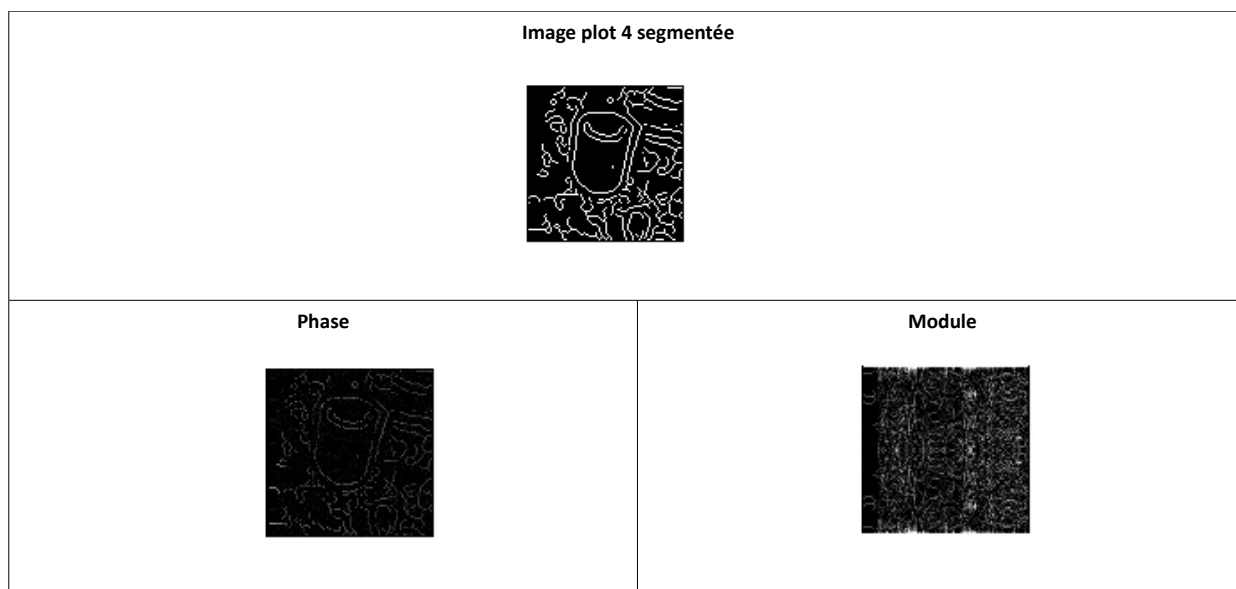


PR4	Plot 1	Plot 2	Plot 3	Plot 4
Images réelles				
Images segmentées (Canny)				

**Tableau 2 :** images des plots et résultat de la segmentation par la méthode Canny pour la zone PR4

Après obtention de la segmentation, le travail consiste en une comparaison statistique entre la photographie de la zone considérée binarisée et les plots. L'efficacité de la technique de reconnaissance de forme doit être invariante par homothétie de faible amplitude car un mouvement vertical de l'appareil photo induit un zoom avant ou arrière de quelques pixels (Castro 1987 ; Lim 1990).

La technique utilisée repose sur le calcul de la corrélation à partir de la transformée de Fourier (Parker 1997 ; Zeb 2007). La transformée de Fourier d'une image se décompose en une image/matrice contenant d'une part le module et d'autre part la phase. L'information contenue dans la phase est d'ordre spatial (les contours) et l'information contenue dans le module est d'ordre colorimétrique (les niveaux de gris et leur fréquence spatiale). La figure 31 illustre la transformée de Fourier inverse de la phase et du module de l'image segmentée du plot 4 (Blanchet, 2001). Ainsi, la recherche de corrélation se fera sur la phase. Cette analyse est indépendante d'une éventuelle variation de la luminosité et d'un éventuel bruit gaussien (bruit dont la distribution est une loi Normale) ou impulsif (texture « poivre et sel » de l'image).



**Figure 31 :** résultats de la transformation de l'image segmentée en phase et en module

L'identification des plots se fait alors à partir des maxima des produits des phases des deux images. La figure 32 illustre le résultat de cette reconnaissance de forme pour la zone PR4. Les plots sont automatiquement reconnus et affichés sur l'image initiale. La zone délimitée par les 4 plots forme alors un quadrilatère, qui constitue la seule zone d'étude pour le traitement d'images.

Concernant la zone PR5, de la même façon 3 plots sont utilisés pour délimiter la région d'intérêt. Un quadrilatère est défini, le quatrième point du quadrilatère correspondant aux coordonnées des deux points extrêmes.

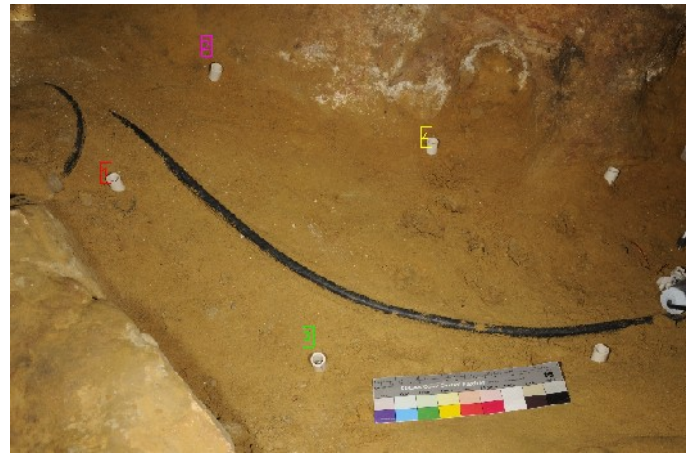


Figure 32 : résultat de la reconnaissance de forme sur PR4

✓ *Mesure de la surface colonisée*

Une fois l'espace de décomposition déterminée, deux méthodes d'analyses peuvent être appliquées pour mesurer la surface colonisée. La première, la plus utilisée, est la méthode de seuillage [Barberousse, 2006; De Muyck *et al.*, 2009], tandis que la seconde est la méthode des nuées dynamiques (Dubosc, 2000; Escadeillas *et al.*, 2007).

✓ *Méthode de seuillage*

Elle est basée sur une méthode classique de traitement de signal des filtres basses/hautes fréquences. Elle permet une binarisation simple et rapide de l'image selon le procédé suivant :

- filtre passe-bas : tous les pixels dont la valeur est inférieure à la valeur seuil sont mis à 1 et les autres à 0,
- filtre passe-haut : tous les pixels dont la valeur est supérieure à la valeur seuil sont mis à 1 et les autres à 0.

Le problème majeur de cette technique demeure la détermination de la valeur seuil. Différentes méthodes mathématiques, robustes, permettent de calculer cette valeur seuil à partir de l'analyse des histogrammes des niveaux de couleur.

Le choix de la méthode utilisée pour déterminer la valeur seuil découle d'une observation de la distribution des niveaux de gris. En effet, celle-ci est bimodale, c'est-à-dire qu'elle présente deux pics (cf. fig. 29), qui sont caractéristiques du fond (le pic le plus large vers les petites valeurs) et des champignons (le pic le plus fin aux grandes valeurs). Pour une telle distribution, la méthode d'Otsu (Otsu, 1979), très largement utilisée, permet de déterminer la valeur seuil de manière efficace. Le principe de cette méthode itérative et probabiliste est assez simple.

Au sein de la distribution des niveaux de gris, la valeur moyenne et la variance autour de cette valeur moyenne sont calculées en amont et en aval de chaque niveau de gris, considéré comme valeur seuil. La distribution contenant 256 niveaux de gris, il y a donc 256 x 2 couples de valeurs moyennes et de variance associés. La valeur seuil sera alors la valeur de niveau de gris pour laquelle la dispersion est minimum (donc la variance inter-classe minimale).

✓ *Méthode des nuées dynamiques*

La méthode des nuées dynamiques, développée par Diday (Diday, 1975) a pour but de fournir une partition en k classes d'individus (k donné *a priori*) denses et bien séparées entre elles. Elle a l'intérêt d'être rapide et de permettre le traitement de très grands jeux de données.

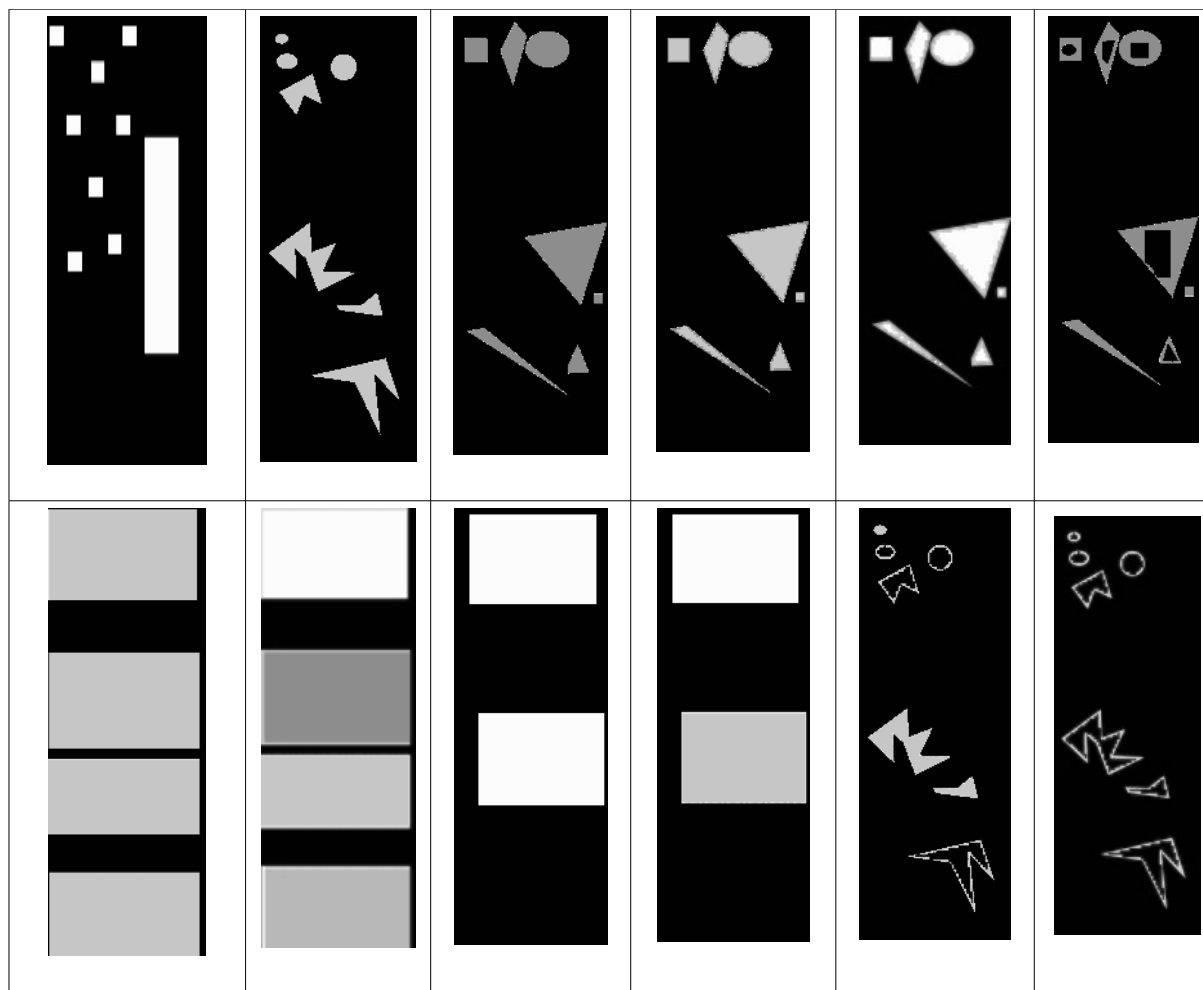
Le principe en est le suivant :

- k noyaux sont estimés ou tirés au hasard parmi une famille de noyaux admissibles appelée espace de représentation,
- chaque point de la population est ensuite affecté au noyau dont il est le plus « proche » : on obtient ainsi une partition en k classes,
- on recalcule les noyaux de cette partition qui représentent le mieux ces classes,
- on recommence le procédé avec les nouveaux noyaux et ainsi de suite.

Des méthodes existantes permettent de déterminer *a priori* la valeur optimale de k. Cependant, dans le cas de notre étude, ce paramètre doit être fixé à 2 : 1 = la surface est colonisée, 2 = la surface n'est pas colonisée. En effet, pour des partitions plus nombreuses, un critère d'identification des zones colonisées devrait être mis au point.

✓ *Choix de la méthode d'analyse d'images*

Le traitement d'image a été appliqué sur des images construites numériquement à partir de surfaces blanches parsemées de différentes figures géométriques (pleines ou « creuses ») constituées de plusieurs niveaux de gris (cf. fig. 33). Les images virtuelles ont un taux de couverture variant de 5% à 78% pour quatre teintes de gris différentes.



**Figure 33 :** images construites numériquement à partir de surfaces blanches parsemées de différentes figures géométriques (pleines ou « creuses ») constituées de plusieurs niveaux de gris

Ces images sont alors traitées par seuillage et par la méthode des nuées dynamiques à 2 niveaux. La figure 34 illustre les variations des surfaces mesurées par ces deux méthodes et l'erreur relative de ces deux méthodes. Sur des surfaces inférieures ou égales à 5% de surface couverte, la méthode par seuillage est plus précise que la méthode des nuées dynamiques à 2 groupes. Pour des valeurs supérieures à 5 %, les deux méthodes sont sensiblement équivalentes.

Par conséquent, la méthode par seuillage est choisie pour le traitement de l'image, la justesse est alors de 1% de la surface (1% correspondant à la différence maximale entre la valeur mesurée et la valeur vraie).

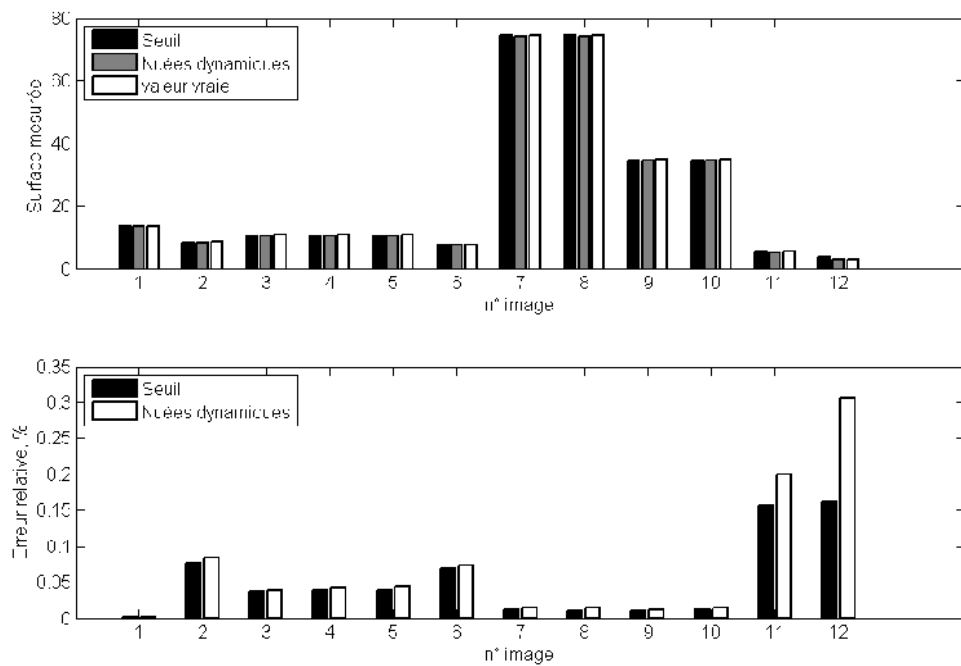


Figure 34 : valeurs des mesures et de leur erreur relative de surfaces par la méthode de seuillage et par la méthode des nuées dynamiques

✓ *Incertitude de la mesure*

La répétabilité et la reproductibilité des mesures sont calculées à partir de 5 photos prises au même moment (l'outil informatique disponible ne permet pas de faire de calcul sur plus de 5 photos, de 72 MO chacune).

La figure 35 illustre les variations de la valeur mesurées pour les zones PR4 et PR5 et les images traitées correspondantes. L'erreur est estimée à partir de l'écart type entre les différentes mesures. La répétabilité des mesures est plus importante sur PR5 que sur PR4, ceci est due aux valeurs mesurées qui sont proches de la justesse de la mesure et à l'effet du zoom plus important sur PR4 où la prise de vue se fait de plus loin.

L'erreur de la mesure totale sera alors la somme des erreurs, erreur liée au calcul et erreur liée à la non parfaite reproductibilité des photos, soit de 1,7 % pour PR5 et de 2% pour PR4.



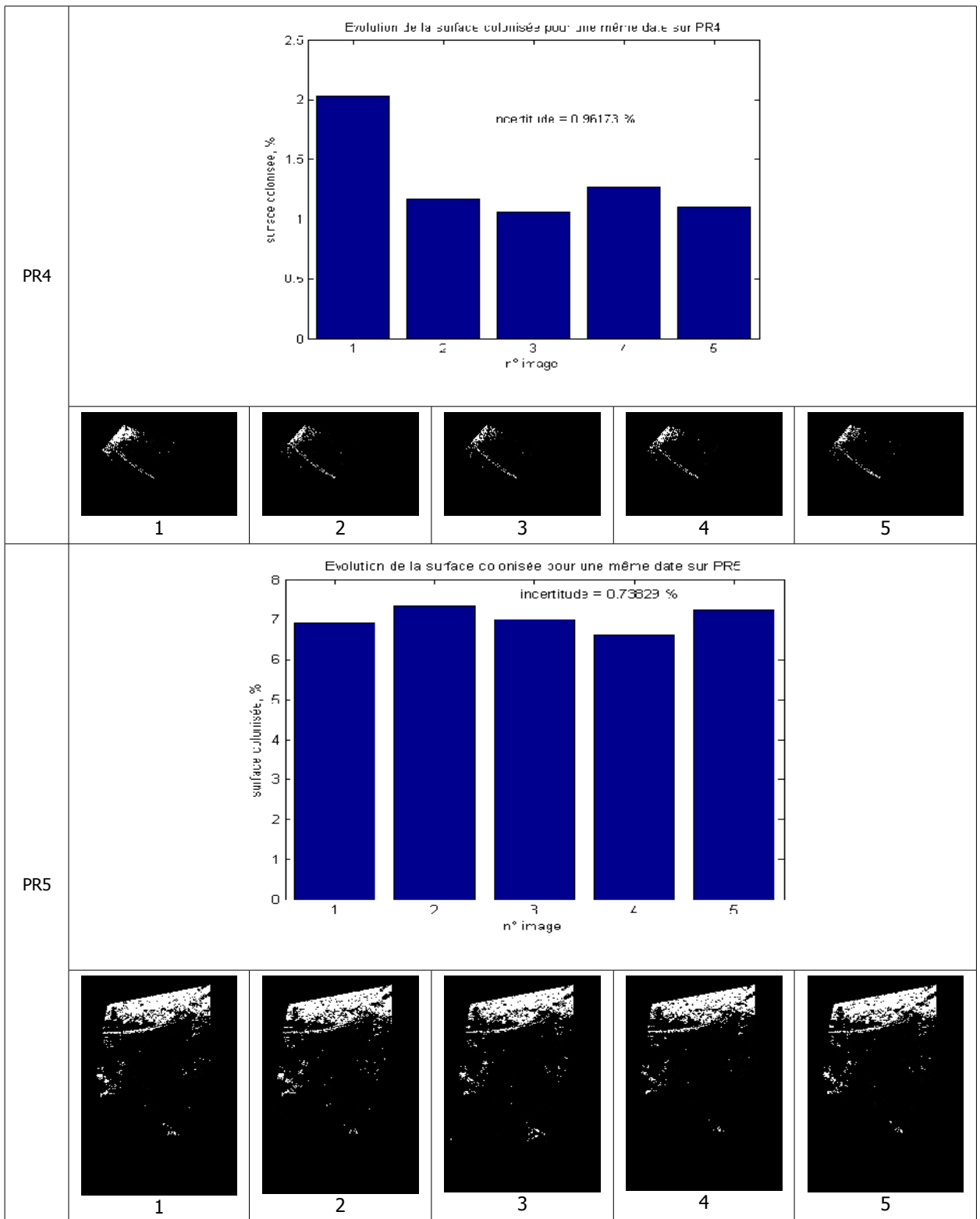
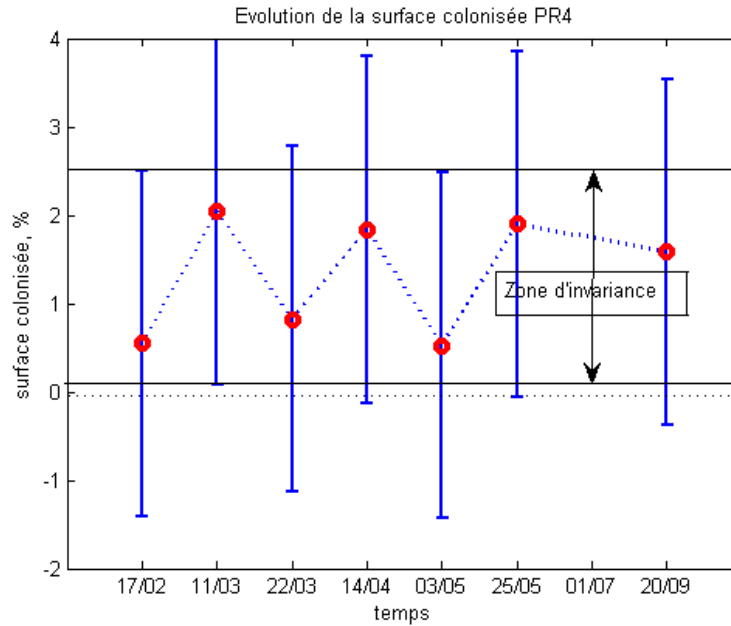


Figure 35 : évaluation de l'incertitude de la mesure par la méthode de seuillage à partir de 5 photos de chaque zone prises au même instant ; sur les reconstitutions, les points blancs représentent les zones apparemment colonisées

#### 4.2.2 - Résultats

La figure 36 illustre les variations de la surface considérée comme colonisée entre février 2009 et septembre 2010 pour la zone PR4.



**Figure 36** : variation de la surface considérée comme colonisée par les champignons sur PR4, le trait continu noir délimite la zone ayant physiquement un sens (les surfaces positives)

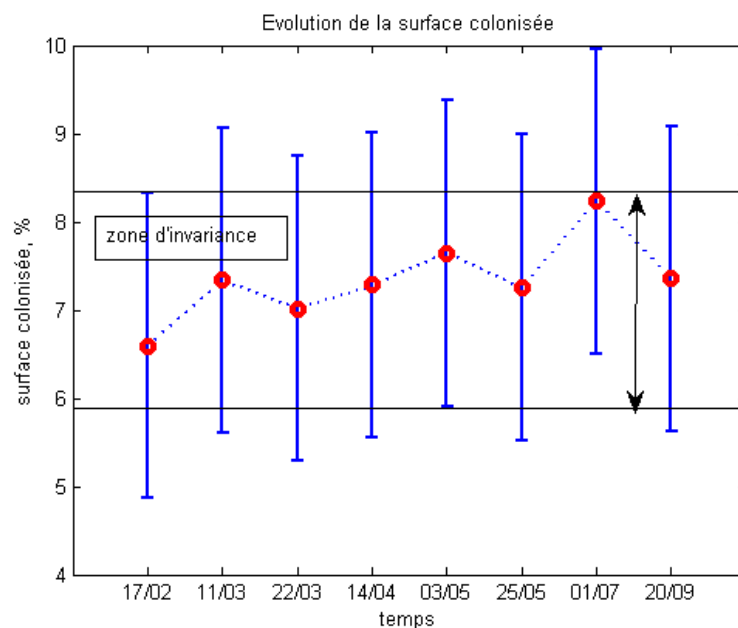
Sur cette zone, la photo du 01/07 n'a pas été prise en compte, la prise d'image n'ayant pas été faite dans les conditions prévues.

Sur la période considérée, les valeurs mesurées sont très faibles voir nulles ; à l'incertitude de mesure près, il n'apparaît pas de variation significative de la surface colonisée. Cette zone n'ayant jamais présentée de colonisation, ce résultat était attendu. Les variations observées sont probablement uniquement dues à la mesure elle-même.

La figure 37 illustre les variations de la surface considérée comme colonisée entre février 2009 et septembre 2010 pour la zone PR5.

Au cours de cette période, les valeurs mesurées varient autour de 7 %, mais il n'apparaît pas de variation significative de la valeur mesurée, à l'incertitude de mesure près.

Ces résultats recourent parfaitement les observations faites par l'équipe des restaurateurs qui documentent l'information sur des calques.



**Figure 37** : variation de la surface considérée comme colonisée par les champignons sur PR5

### 4.3 - CONCLUSION

Au cours de cette étude, la mise au point d'une procédure originale et précise de traitement d'images, à partir d'une reconnaissance de forme et de seuillage, a permis de déterminer les surfaces visiblement colonisées par des champignons. Aucune variation significative de la surface colonisée n'a pu être mesurée.

Le suivi photographique sériel des surfaces colonisées sur une durée plus importante que les six mois présentés dans le cadre du programme ou sur d'autres zones de la cavité, pourrait s'avérer pertinent pour mieux comprendre les mécanismes de propagation de la communauté fongique visible.

*L.R.M.H. - Pôle "Pierre"*

L'un des aspects du programme précédent consistait à préciser l'origine de l'eau et/ou de l'humidité périodiquement observée à la surface des parois. Les très faibles propriétés de perméabilité du substrat rocheux ( $K_k \sim 10^{-18} \text{ m}^2$ ), déduites de l'application des modèles théoriques de Marshall et de Kozeny-Carman, n'ont pas permis de mettre en évidence une réelle différence d'humidité dans les 25 premiers millimètres du rocher. A fortiori, aucun sens de transfert ne peut raisonnablement être mis en exergue compte tenu des vitesses de transfert extrêmement réduites (le débit est de l'ordre de 25 mL/an). Par ailleurs, les conditions de saturation de l'air ambiant dans la cavité suggèrent que plus de 75% du réseau poreux du calcaire est saturé d'eau par simple condition endogène, c'est-à-dire en ne faisant intervenir aucun mouvement liquide. Cet état particulier du substrat rocheux Coniacien très peu poreux (0,5-2%) est en désaccord, au moins partiel, avec l'observation. En effet, un suivi régulier des parois permet d'apprécier des états d'humidité variables des surfaces en fonction du temps. Compte tenu des différences de cinétiques dans les mécanismes de transfert liquide et de coalescence de gouttes d'eau superficielles, il apparaît que les fluctuations d'humidité ne peuvent provenir que de changements infimes et très localisés. Elles sont attribuées à la condensation, imputable au processus de déséquilibre thermo-hydrique entre l'atmosphère intérieure de la cavité et les conditions de température de surface des parois et, pour une plus faible part, au drainage de l'eau liquide par les fissures de la matrice à proximité des joints principaux de l'encaissant.

Les caractéristiques voisines des substrats des zones PR1, PR2 et PR3 ne peuvent donc pas présenter de variation significative de la teneur en eau.

En revanche, entre les deux zones PR4 et PR5, les teneurs en eau devraient a priori être fondamentalement différentes du fait :

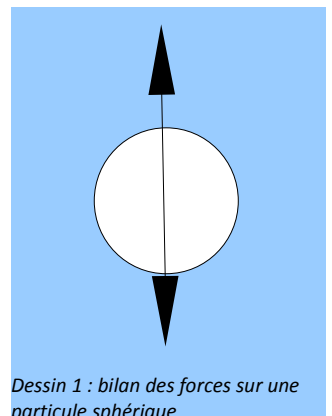
- de leur différence visible de composition; PR5, plus riche en argile, devrait contenir une plus grande quantité d'eau,
- de leur différence de compaction; le caractère plus compact de PR5 devrait favoriser la condensation endogène. La plus grande proportion d'argiles sur cette zone induit une distribution porale plus dispersée dans les petits pores (sub-micrométriques). L'accroissement de la microporosité favorise une plus grande sensibilité du matériau aux variations de l'humidité relative de l'air.

L'étude de la teneur en eau dans ces deux zones passe donc obligatoirement par une quantification des minéraux les plus sensibles aux fluctuations d'humidité, c'est-à-dire les minéraux argileux. Les éventuelles variations mesurées dans ces zones, à l'aide des capteurs mis au point pour la première phase de l'étude, pourraient alors être mieux comprises. Ces mesures devraient permettre de vérifier l'impression visuelle de relative « sécheresse » de la zone PR4 par rapport à la zone PR5.

## 5.1 - QUANTIFICATION DES ARGILES

### 5.1.1 - Loi de Stokes

La technique de séparation des argiles repose sur les propriétés de sédimentation des solutions colloïdales. En effet, la vitesse de sédimentation des particules dans un liquide donné est directement dépendante de leur dimension. Pour expliquer ce phénomène, prenons l'exemple d'une particule sphérique plongée dans l'eau (dessin 1). Immergée dans un liquide, la particule subit la gravité, donc une force verticale vers le bas, dépendante (en dehors des constantes que sont l'accélération de pesanteur et la masse volumique de l'eau) de sa masse et la réaction de l'eau, la poussée d'Archimède, dépendante du volume d'eau déplacé.



La différence entre ces deux forces, notée F, induit une accélération (deuxième loi de Newton). Il apparaît alors une force de trainée s'opposant au mouvement, notée T. Lorsque la somme ces forces est nulle, soit  $F+T=0$ , l'accélération est nulle et la vitesse devient donc constante : c'est la loi de Stokes (Landau,1971) :

$$v = 2 / 9 . [ ( r_p - r_w ) . g * R^2 ] / \mu$$

- R, le rayon apparent de la particule,
- $\mu$ , la viscosité dynamique du fluide,
- g, l'accélération de la pesanteur,
- r, la masse volumique, w pour l'eau et p pour la particule.

Cette loi est valable pour des particules sphériques de diamètre inférieur à 0,1 mm et est généralisée à toutes les particules inférieures à 100  $\mu\text{m}$ .

Du fait des charges électrostatiques de surface qui caractérisent les feuillets d'argiles, ces minéraux présentent une grande capacité à s'agglomérer en flocons, lattes ou tiges, toujours de dimension micrométrique. Ainsi, dans un mélange de terre/sable en solution, les particules d'argile moins denses et plus petites se sédimentent plus lentement. Dispersées dans une solution aqueuse, la chute des particules d'argiles suit la loi de Stokes sous réserve qu'elles ne soient pas agglomérées avec d'autres particules de nature différente (floculation). La technique de séparation des minéraux argileux de leur gangue est donc capitale pour estimer de manière quantitative la fraction inférieure à 2  $\mu\text{m}$ , conventionnellement attribuée aux argiles.

### 5.1.2 - Protocole de séparation

Le protocole de séparation mis au point pour séparer les argiles des autres phases minérales constitutives des échantillons prélevés dans la grotte de Lascaux repose sur la répétition de cycles de lavage-décantation et l'utilisation de la loi de Stokes :

- a) après broyage afin de bien séparer mécaniquement les différentes phases tout en limitant la fragmentation des grains, la poudre est mise en solution. Ce mélange est alors placé dans une cuve à ultrasons pour favoriser la décohésion et améliorer la dissociation par vibration.
- b) les flacons sont ensuite placés 24h dans une centrifugeuse basse fréquence pour bien homogénéiser le mélange. Le mélange est alors mis au repos.
- c) la phase de sédimentation commence. À partir de la loi de Stokes, il est aisé de calculer le temps de parcours des particules micrométriques dont des argiles. Celle ci seront situées, au bout de 5h, dans les 5 premiers centimètres de la solution. Ce mélange eau-argile est alors prélevé à l'aide d'une pipette courbe. Cette solution est ensuite placée à l'étuve. Une fois l'évaporation accomplie, la manipulation est reprise au point a, afin de procéder à des cycles de lavage-décantation successifs pour éliminer les autres particules susceptibles de floculer avec les argiles. Malgré la présence d'éléments (Fe, Mn...) qui forment des oxydes et favorisent la floculation, cette procédure n'a été reproduite que deux fois. Elle a été jugée suffisante compte tenu de la stabilité de la solution argileuse.
- d) le résidu poudreux final est pesé.

### 5.1.3 - Résultats

Le résultat des analyses est résumé dans le tableau 3. Bien que les deux échantillons issus représentatifs de PR4 et PR5 soient structurellement très différents, leur teneur en argile n'est pas fondamentalement différente. La zone PR4 bien que composée à presque 50% d'argile, permet difficilement d'extraire un échantillon cohérent. Ceci implique que les plaquettes d'argile ne constituent pas de véritable matrice associant les grains de quartz (sable) entre eux, contrairement à PR5 dont les propriétés plastiques peuvent macroscopiquement être appréciées.



Il existe donc une valeur-seuil comprise entre les deux proportions d'argile calculées qui modifie fondamentalement l'état de ces substrats.

	PR4	PR5
% argile (% massique)	42	68

Tableau 3 : teneur en argile (fraction <2µm) sur les zones d'étude

D'un point de vue qualitatif, la nature des minéraux argileux identifiée lors de la première phase du programme reste valable. Le cortège argileux est représenté majoritairement par des smectites présentant un caractère gonflant, des kaolinites et dans une moindre mesure par des illites.

## 5.2 - SUIVI DE LA TENEUR EN EAU

Au cours de cette étude, deux techniques de mesure de la teneur en eau ont été utilisées :

- des mesures discontinues, par carottage et prélèvement de matière à sec, puis mesure de masse avant et après étuvage,
- des mesures continues, réalisées à l'aide de sondes capacitives.

Les sondes capacitives mises en place sont celles des zones PR1 et PR2. Leur principe de fonctionnement et la procédure d'implantation ont été décrites lors du précédent rapport ; par conséquent, seuls les étalonnages nécessaires à leur bon fonctionnement dans les nouveaux substrats seront décrits ici.

### 5.2.1 - Détermination de la teneur en eau par carottage

La technique de mesure de teneur en eau massique par carottage est destructive mais constitue à l'heure actuelle la technique la plus précise pour déterminer une teneur en eau dans un substrat consolidé.

En effet, seuls des prototypes, comme ceux mis en place dans la cavité dans le cadre du présent programme, permettent de mesurer ce paramètre en continu. Mais la réponse de ces capteurs est fortement dépendante de la qualité de l'interface capteur/roche et de sa reproductibilité *in situ* et en laboratoire, pour l'étalonnage.

Les carottes sont prélevées à sec à l'aide de l'embout d'un carottier, puis la masse de l'éprouvette  $W_e$  est alors notée. Après étuvage à 60°C pour évaporer la phase liquide et lorsque la masse de l'échantillon ne varie pas de plus de 0,1% sur 24h, l'éprouvette est considérée comme sèche, de masse  $W_s$ .

La teneur en eau massique de l'échantillon,  $q$ , est alors calculée comme étant égale à :

$$q = (W_e - W_s) / W_s$$

La figure 38 illustre les variations de la teneur en eau massique pour les zones PR4 et PR5. **Les teneurs en eau sont proches de 20% pour PR5 et de 10% pour PR4. Cette différence est attribuée à la différence de concentration en argiles dans les deux zones.**

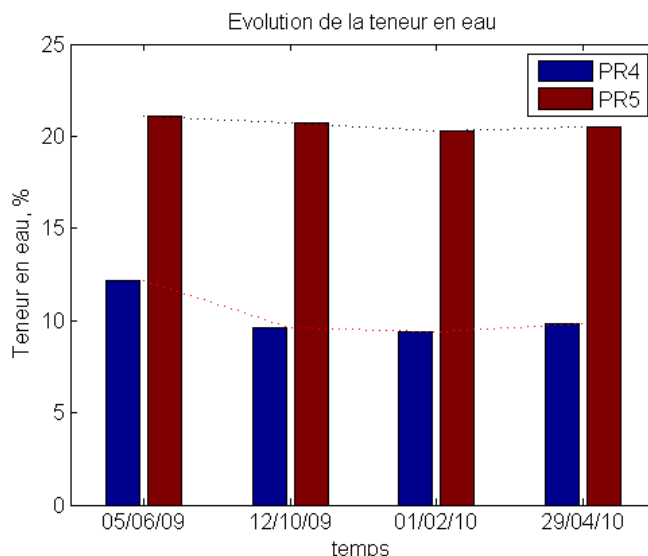


Figure 38 : variation de la teneur en eau massique sur les zones PR4 et PR5

La relative baisse de la teneur en eau dans les deux zones entre juin et octobre 2009 est très probablement imputable à la technique de prélèvement (le volume prélevé est légèrement différent entre juin et les prélèvements suivants).

En octobre 2009, il a été possible de dresser un profil de la teneur en eau, comme illustré sur la figure 39, pour PR4 et PR5. Pour les deux zones, la teneur en eau en position médiane (respectivement à 9 mm pour PR4 et 15 mm de profondeur pour PR5) est la teneur maximale, tandis que la teneur minimale se trouve en « profondeur » (15 mm pour PR4 et 21 mm pour PR5). Cette différence peut s'expliquer par un niveau de compaction et/ou de composition différente.

Les teneurs en eau déterminées en laboratoire à 97% et à 100 % d'humidité relative sont inférieures à celles mesurées *in situ*. Les teneurs en eau à 97% et 100% sont obtenues en « asséchant » complètement les carottes, puis en les ré-exposant à une atmosphère de 97% ou 100% d'humidité.

La différence entre la teneur en eau à la saturation (100% d'HR) et la teneur mesurée *in situ* est constante pour PR4 et varie entre 4 et 8% pour PR5. L'eau ne pouvant arriver de l'encaissant jugé « imperméable », cette différence est probablement imputable à la coalescence de gouttes d'eau en surface (par condensation et/ou par ruissellement d'eau provenant des parties supérieures, ruissellement induit par la condensation et/ou par infiltration dans les veines). Il faut donc considérer que les teneurs en eau calculées sur les échantillons dans les conditions d'humidité de la cavité excèdent la quantité d'eau théorique « absorbable » par la matière minérale.

Pour PR4, les courbes des teneurs en eau à 97% et 100% sont parallèles selon le profil. Ceci induit que les volumes accessibles par des rayons supérieurs à 35 nm sont distribués de façon homogène sur tout le volume – ce rayon est caractéristique de la condensation endogène pour une humidité relative supérieure à 97% dans les conditions de température et de pression de la grotte.

Cette distribution n'est plus homogène pour PR5 car les courbes ne sont pas parallèles entre elles avec la profondeur. Cette évolution correspond à un plus faible volume accessible à l'eau en profondeur et un plus grand en surface. Dans cette zone, une compaction différentielle du substrat plus importante en profondeur peut être invoquée.

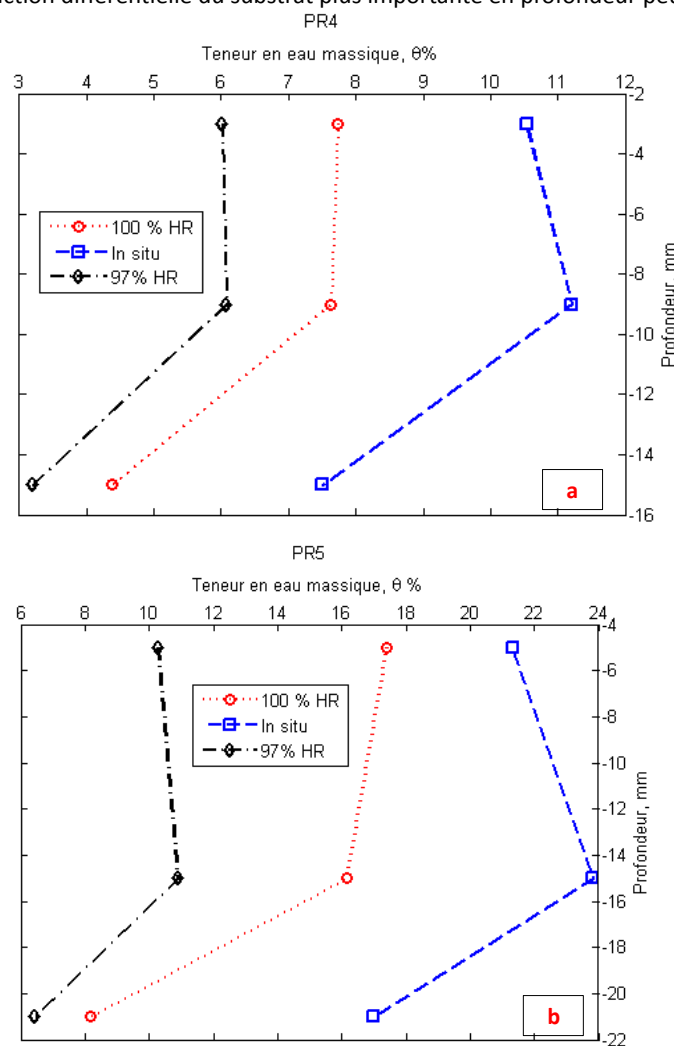


Figure 39 : variation de la teneur en eau selon le profil pour les zones PR4 (a) et PR5. En bleu, variation in situ, en rouge pour une atmosphère saturée en eau et en noir pour une atmosphère à 97% d'humidité relative

## 5.2.2 - Détermination de la teneur en eau par suivi continu

Le déplacement des capteurs, mis au point conjointement par le LRMH et la société Tollis, des zones PR1 2 et 3, sis dans l'encaissant de la roche, vers les zones PR4 sableuse et la zone PR5 argileuse, a nécessité un ré-étalonnage.

Le protocole utilisé a déjà été présenté lors du précédent rapport. Par conséquent, seuls les courbes d'étalonnage seront données ici. Du fait du caractère pulvérulent du substrat de la zone PR4, il est impossible de donner une valeur de la teneur en eau au sens strict du terme. En effet, le prélèvement du substrat in situ a induit une modification de la compacité de l'échantillon. Par conséquent, pour ce substrat le paramètre mesuré en continu sera la masse d'eau comprise dans le volume de mesure, et non plus le rapport volume d'eau sur le volume accessible.

La figure 40 illustre les variations de la réponse du capteur Tollis en fonction de la masse d'eau contenue dans l'échantillon pour PR4 et de la teneur en eau pour PR5.

Pour les deux capteurs, la courbe peut être séparée en deux phases distinctes :

- la première phase pour les fortes teneurs en eau avec une variation linéaire assez lente,
- le seconde phase pour les teneurs en eau plus faible, avec une variation linéaire plus rapide du signal.

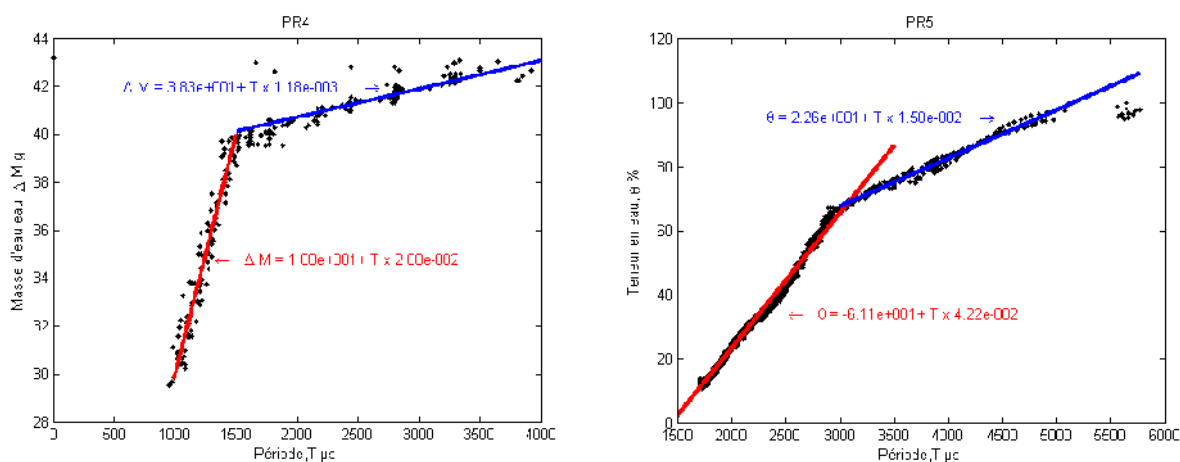


Figure 40 : courbe d'étalonnage des capteurs Tollis pour les zones PR4 et PR5

Cette césure dans la réponse du capteur provient probablement de la rétraction du substrat lors de son assèchement, les deux substrats présentant une concentration élevée en argile.

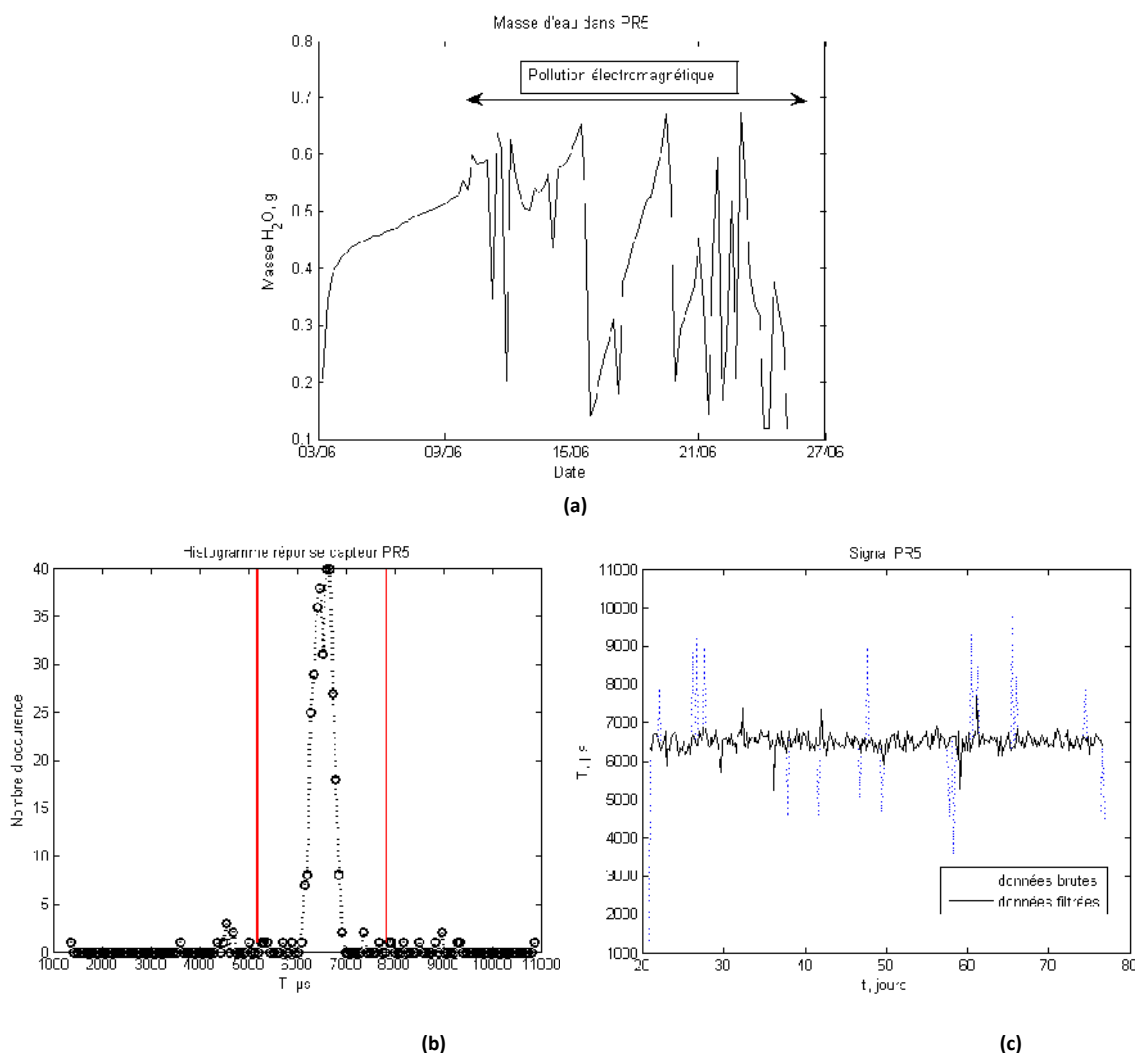
Dans les conditions environnementales de la grotte, et pour une humidité relative oscillant entre 95% et 100%, les teneurs en eau mesurées se situent dans la phase linéaire lente, à savoir la courbe bleue pour les deux capteurs.

## 5.2.3 - Mesure in situ

Les capteurs ont été mis en place début juin 2009. À partir du 10 juin, une pollution électromagnétique importante est apparue et a obligé à retirer les capteurs pour les « blinder » (figure 41). La technique la plus simple était de diminuer la sensibilité des sondes en diminuant la résistance en parallèle dans le circuit électronique de base.

Cette technique a été utilisée sur les précédentes zones, et a été ré-utilisée ici. Un ré-étalonnage des sondes s'est avéré nécessaire avant leur remise en place dans la cavité. La source de cette pollution électromagnétique n'a pas pu être déterminée, les câbles électriques et autres groupes électriques étant hors circuit dans la zone d'étude.

La réponse des capteurs reste cependant assez bruitée (comme l'illustre la figure 41) et un filtrage des données brutes est donc effectué pour accroître le rapport signal sur bruit. Le filtre mis en place repose sur l'hypothèse que les variations de la masse d'eau dans le substrat seront faibles et qu'ainsi les réponses des capteurs devraient rester dans la phase linéaire lente des courbes. Cette hypothèse repose sur la grande stabilité de la source de l'eau substratique dans la cavité, à savoir la condensation endogène.



(b)  
**Figure 41 : réponse du capteur PR5**  
 a) Réponse avant blindage  
 b) Histogramme de la réponse du capteur  
 c) Signal PR5 avant et après filtrage des données

En effet, la phase précédente du programme a démontré que l'eau dans les substrats provenait pour une très large majorité de la condensation endogène. L'humidité relative dans la grotte est très stable dans la gamme [95% 100%], la teneur en eau dans les substrats devrait être importante (>80 %) et assez stable.

Les données rejetées seront alors les données n'étant pas comprises dans le pseudo-intervalle de confiance à 95 % autour de la mesure moyenne temporelle. Le terme pseudo-intervalle est utilisé car en toute rigueur, un intervalle de confiance n'est pas défini sur des variables dynamiques, mais sur des variables aléatoires. Cependant, les mesures étant ici très stables, cet artifice permet de filtrer facilement et efficacement les données.

Ce filtre a été appliqué aux deux zones. La figure 42 illustre alors la variation de la masse d'eau dans ces deux zones pour la période comprise entre juillet 2009 et mai 2010.

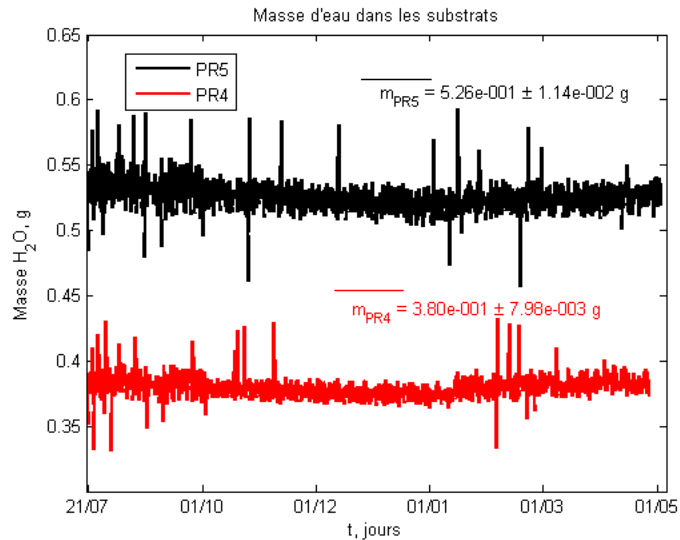


Figure 42 : variation de la masse d'eau sur les zones PR4 (en rouge) et PR5 (en noir)

Par zone, à l'incertitude de mesure près, il n'apparaît pas de variations significatives de la masse d'eau. La masse d'eau de la zone PR5 est supérieure à celle de la zone PR4, avec un rapport constant de 1,4 entre ces deux masses.

Ces mesures sont concordantes avec celles effectuées par carottage, le rapport entre les deux masses étant ici légèrement inférieur. Cette différence peut s'expliquer de différentes façons :

- l'incertitude de la mesure en continu est supérieure à la celle par carottage, la réponse du capteur est très dépendante de l'intimité du contact entre le capteur et le substrat,
- les mesures ne sont pas effectuées au même endroit, il peut y avoir des variations morphologiques locales du substrat. Ici, l'influence est plus certainement de second ordre.

### 5.3 - CONCLUSION

La teneur en argile a été déterminée sur les deux zones : la zone PR5 contient 62 % d'argile et la zone PR4 42 %, ces valeurs devant être considérées comme des valeurs par excès compte tenu du protocole d'évaluation. Les teneurs en eau dans ces deux zones sont quant à elles constantes, et proches de 20% pour PR5 et 10 % pour PR4. La teneur en eau semble être subordonnée à la proportion d'argile dans chaque zone, proportion constante au cours du temps en absence d'apport exogène de matière. **Ainsi, dans le temps imparti de l'étude, les paramètres mesurés ne varient pas de façon significative.**



### CNR - ISAC

Comme pour les zones 1,2 et 3, les paramètres étudiés en utilisant les instruments « ad hoc » ont été : la température de l'air et de la roche, l'humidité relative de l'air qui associée à la température de l'air permet le calcul des autres variables (i.e. humidité spécifique, point de rosée de l'air... etc.), la condensation superficielle et l'agitation de l'air.

#### 6.1 - INSTRUMENTS UTILISÉS

Les températures de l'air et de la roche ont été mesurées avec une sonde de température Pt100, de résolution 0,001°C et de précision 0,01 °C. Pour la température superficielle de la roche, une nouvelle sonde a été utilisée présentant les mêmes caractéristiques que la précédente.

Pour les mesures d'humidité relative, un nouveau psychromètre a été développé afin d'avoir une précision maximale de 0,2 à 0,3 % permettant de s'affranchir des perturbations liées aux déplacements d'air. Le ventilateur du psychromètre fonctionne pendant quelques minutes, jusqu'à stabilisation du système. L'humidité relative de l'air est alors déduite par un calcul prenant en compte les températures dites « sèche et humide » (ces températures sont enregistrées pendant une dizaine de minutes à l'aide du microprocesseur associé).

Pour la ventilation, un anémomètre à fil chaud, dont le signal est amplifié pour atteindre une précision de 10 à 20 mm/sec, a été mis au point.

La condensation superficielle a été soit calculée indirectement à partir des paramètres microclimatiques locaux, soit en utilisant un nouveau capteur appelé « dew sensor ».

Les principaux paramètres (température de l'air, de la surface de la roche, agitation de l'air, humidité relative, pression) ont été relevés de façon automatique puis enregistrés par une centrale d'acquisition connecté via Internet à un ordinateur au CNR, afin de télécharger les données en temps réel et ainsi de contrôler le bon déroulement des opérations.

Les autres paramètres physiques importants pour l'analyse du microclimat (température de rosée de l'air et de la surface, rapport de mélange, humidité relative) ont été calculés via les formules mathématiques validées par le comité de normalisation CEN. Cette norme est en cours de développement<sup>3</sup>.

Tous ces données collectées et/ou calculées ont été élaborées avec des programmes spécifiques, présentées dans des graphiques, puis discutées et interprétées.

<sup>3</sup>(A. Bernardi fait partie de la commission de normalisation et est membre du « mirror group » italien pour le CEN)

## 6.2 - Résultats du monitoring

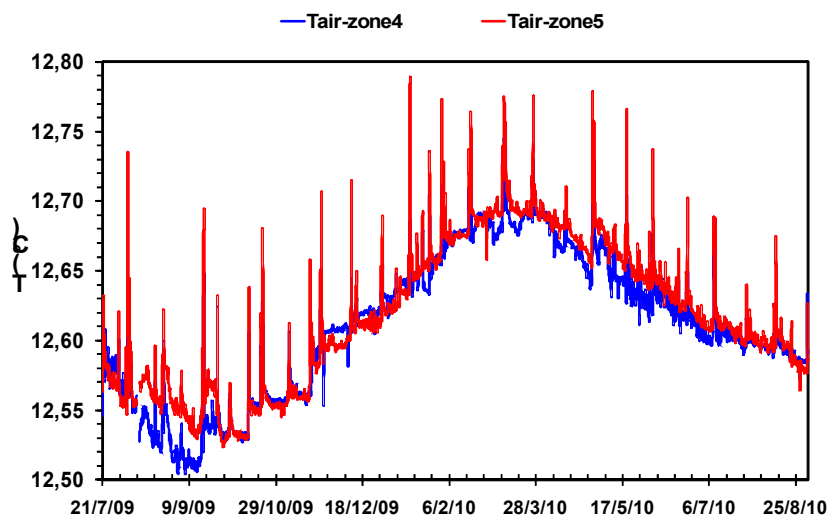
Le suivi microclimatique de la grotte de Lascaux, compte tenu du milieu, présente beaucoup de difficultés. En particulier, ce projet de recherche s'est déroulé pendant une période de repos de la grotte, ce qui en a limité l'accès et rendu difficile les possibilités d'intervention sur les instruments, en cas de défaillance. Ces problèmes ont entraîné des lacunes dans la continuité de l'acquisition des données.

Néanmoins les données acquises ont été suffisantes pour caractériser les 2 zones et mettre en évidence les différences entre elles.

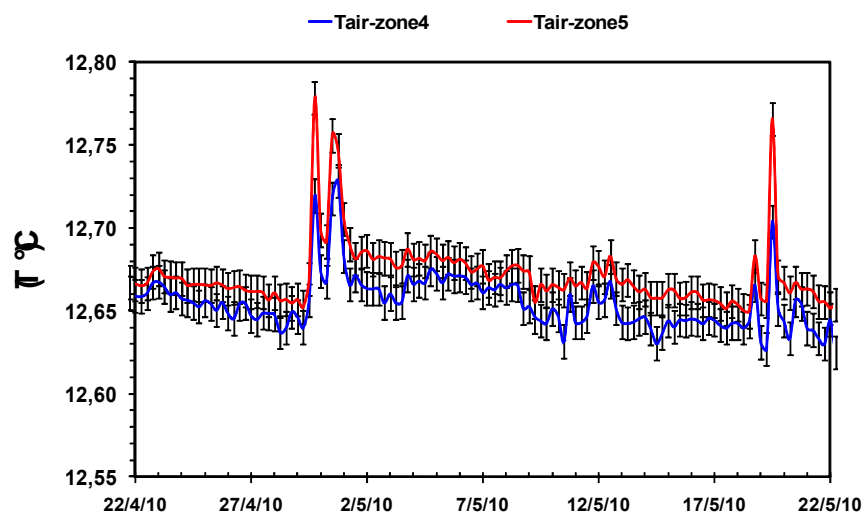
### 6.2.1 - Température de l'air, de la roche et de la surface

L'analyse des données de la température de l'air ( $T_{\text{air}}$ ) à proximité des 2 zones choisies a montré, durant toute la période d'étude, qu'elle se maintenait dans une plage située entre 12,50 et 12,78 °C.

La figure 43 montre la température de l'air durant toute la période et met en évidence le déphasage déjà connu (environ 6 mois) de l'onde thermique par rapport à l'extérieur.



La zone 5 présente souvent des pics qui se manifestent surtout vers midi ou quelque fois à 18h. En général on peut dire que les deux zones ont une température très proche si on exclut les maxima, pour la plupart liés aux fréquentations de la grotte. Ainsi, à l'incertitude de mesure près, et en excluant ces points « aberrants », les différences sont minimales entre ces deux zones, surtout en été (cf. fig. 44 et 45).



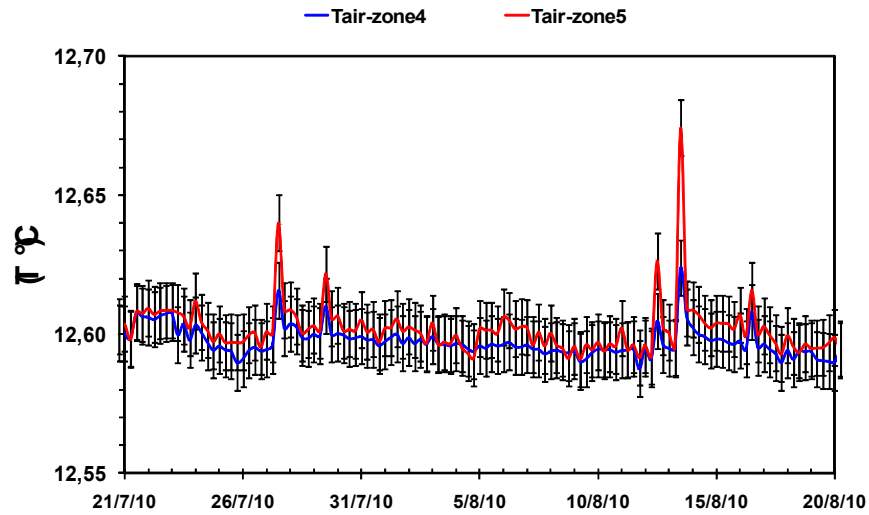


Figure 45 : suivi de la température de l'air en été avec les erreurs de mesures

La température de la roche dans les deux zones est très proche pendant toute la période. Elle présente seulement des variations de quelques centièmes de degré, comme on peut le voir sur la figure 46, et elles correspondent à celles de l'air déjà observées.

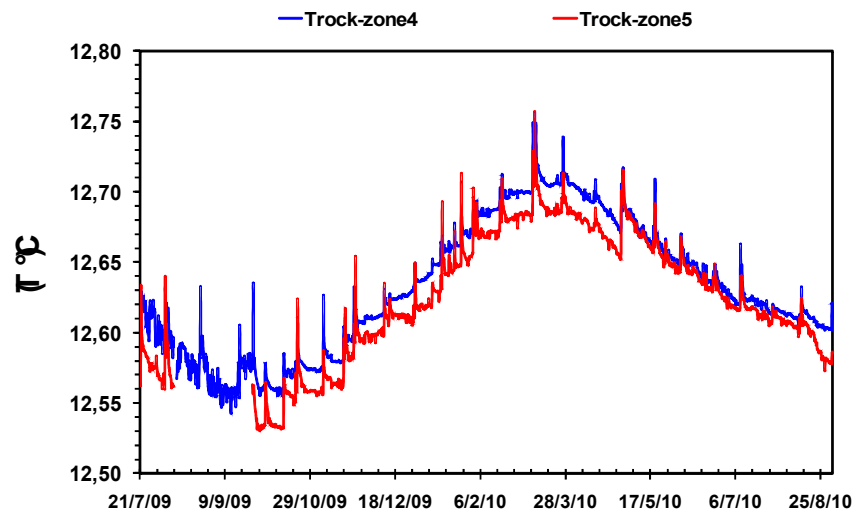


Figure 46 : suivi de la température de la roche dans les zones 4 et 5 pendant toute la période de mesures

C'est seulement pendant l'hiver et au début du printemps que les deux courbes se distinguent un peu plus et mettent en évidence une différence de température de 1 à 2 centièmes de degré, supérieure pour la zone 4 (cf. fig. 47 et 48).

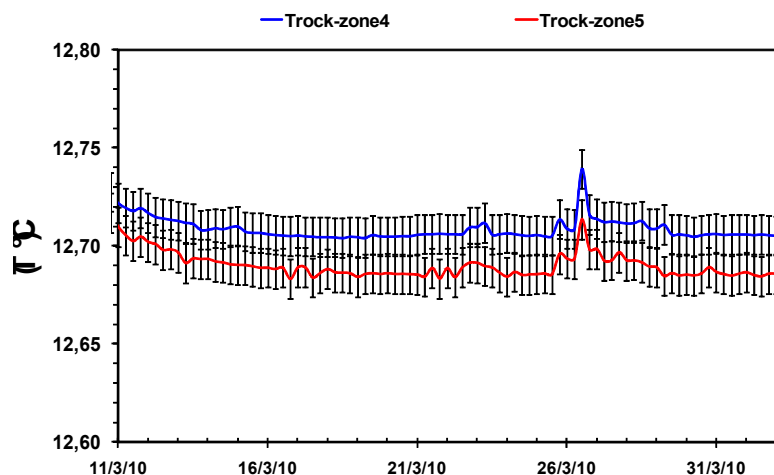


Figure 47 : évolution de la température de la roche dans les zones 4 et 5 en hiver/début printemps avec les erreurs de mesures

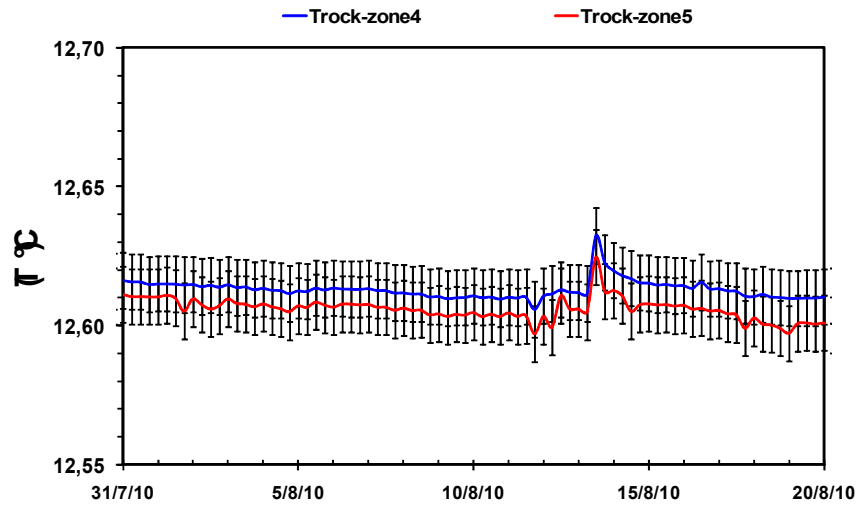


Figure 48 : évolution de la température de la roche dans les zones 4 et 5 en été avec les erreurs de mesures

Si on compare la zone 5 et la zone 4bis (qui correspond à un point supplémentaire de température, ajouté ultérieurement sur la zone 4 pour tester les différents matériaux), on peut observer que la température de la roche de cette zone est supérieure, pendant toute l'année, de quelques centièmes de degrés par rapport à celle de la zone 5, ce qui permet de conclure que  $T_{\text{Roche 4bis}} > T_{\text{Roche 5}}$  (cf. fig. 49, 50 et 51).

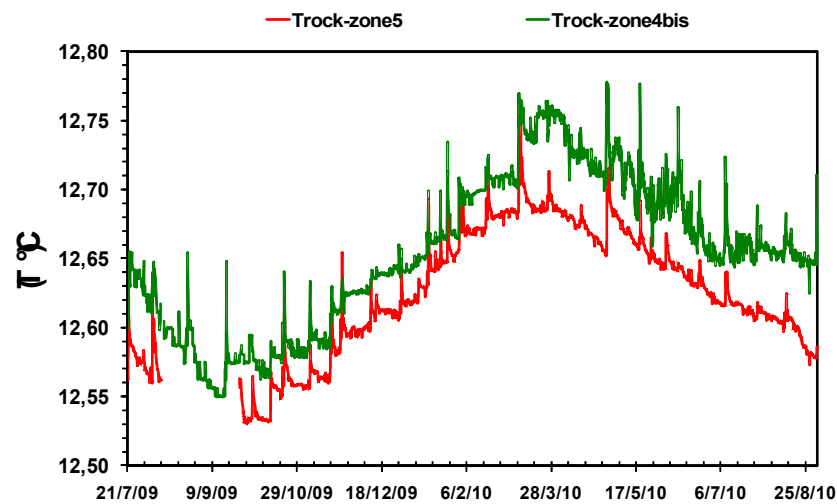


Figure 49 : évolution de la température de la roche dans les zones 4bis et 5 pendant toute la période

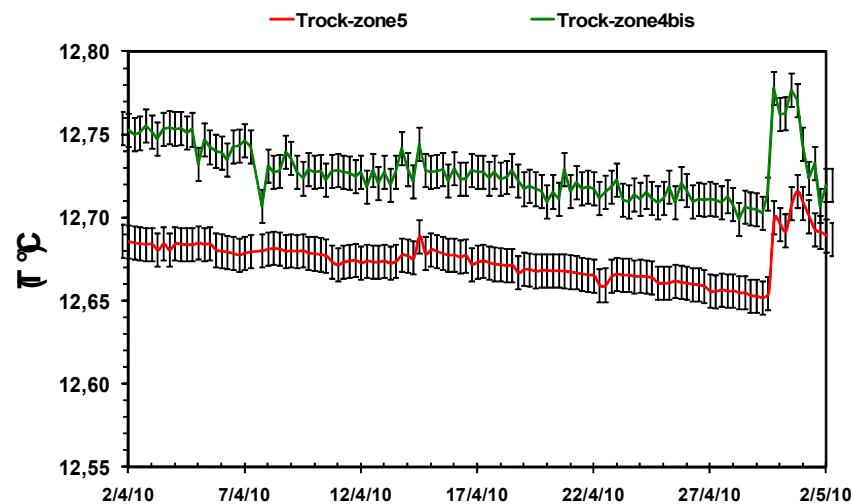


Figure 50 : évolution de la température de la roche dans les zones 4bis et 5 en printemps avec les erreurs de mesure

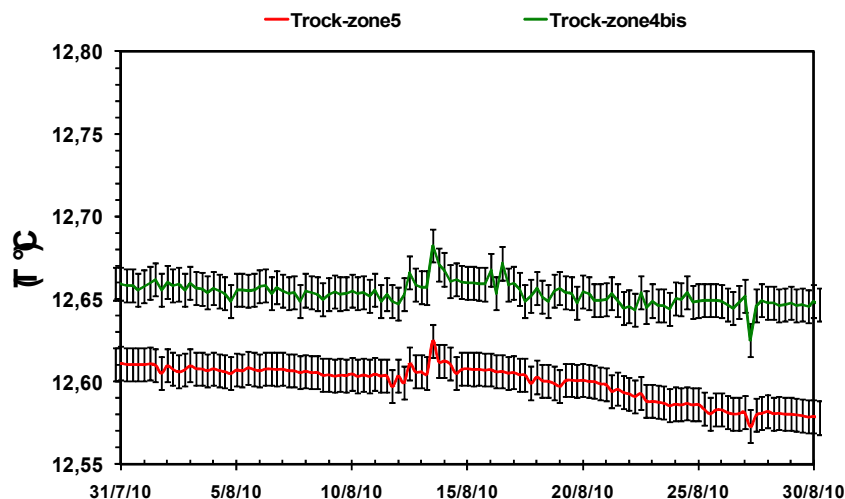


Figure 51 : évolution de la température de la roche dans les zones 4bis et 5 en été avec les erreurs de mesure

L'analyse des données montre que la température de surface ( $T_s$ ), à proximité des 2 zones choisies, se maintient, durant toute la période d'étude et pour les deux points de mesure, entre 12,56 et 12,73 °C. Le comportement est très similaire à celui observé avec les températures de la roche : les températures des zones 4 et 5 sont très proches, en particulier à partir du printemps jusqu'à l'été ; la température de la zone 4bis, elle, est supérieure d'un peu plus de quelques centièmes à celle de la zone 5 (cf. fig. 52, 53 et 54).

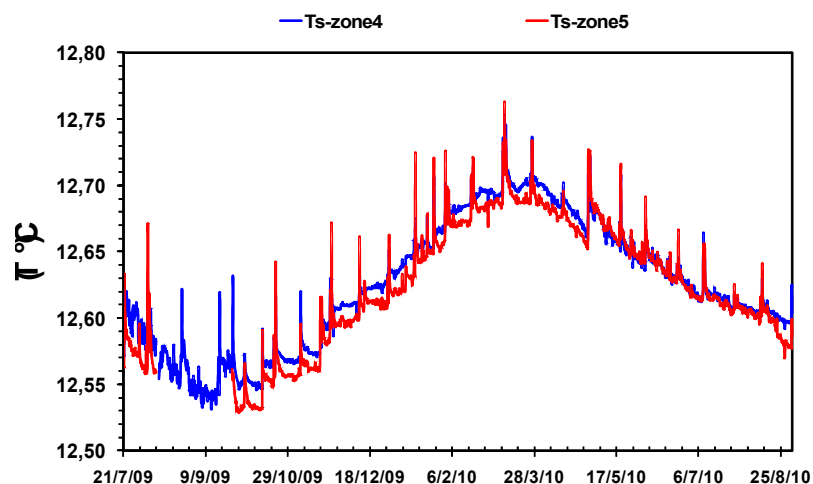


Figure 52 : évolution de la température de la surface dans les zones 4 et 5 pendant toute la période

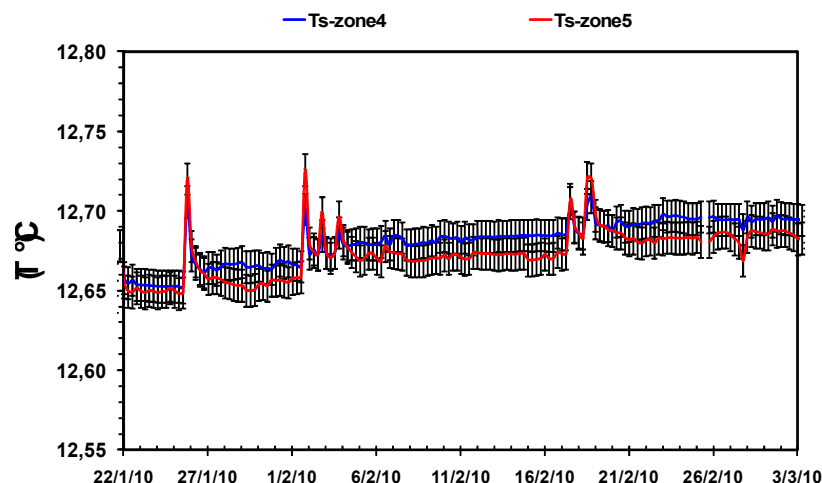


Figure 53 : évolution de la température de la surface dans les zones 4 et 5 en hiver avec les erreurs de mesure



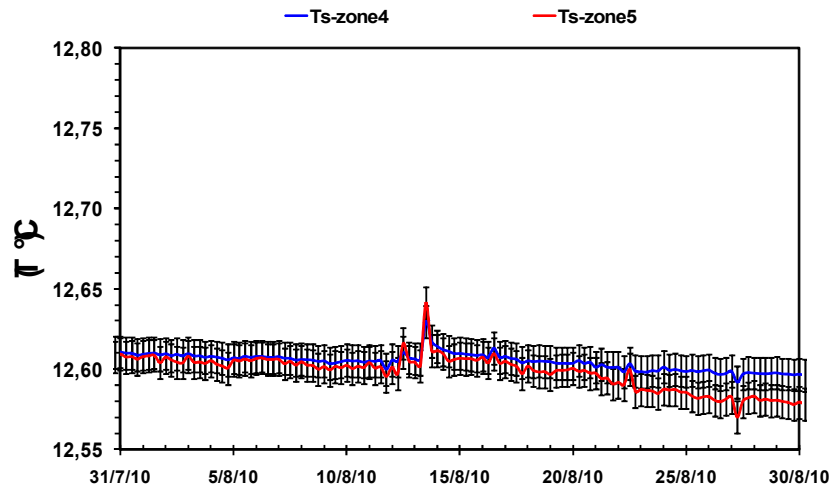


Figure 54 : évolution de la température de la surface dans les zones 4 et 5 en été avec les erreurs de mesure

Si on compare les températures de surface des zones 4 bis et 5, on observe qu'elles sont très voisines, surtout à partir du printemps et jusqu'à l'été (cf. fig. 55, 56 et 57).

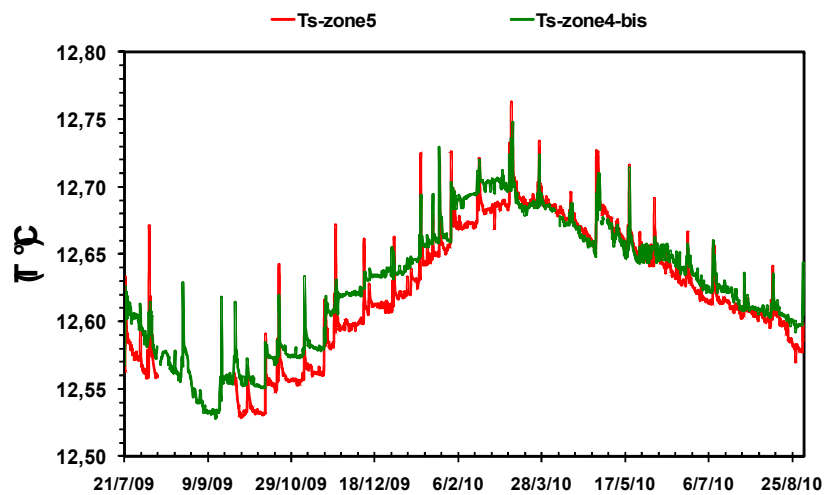


Figure 55 : évolution de la température de la surface dans les zones 4bis et 5 pendant toute la période

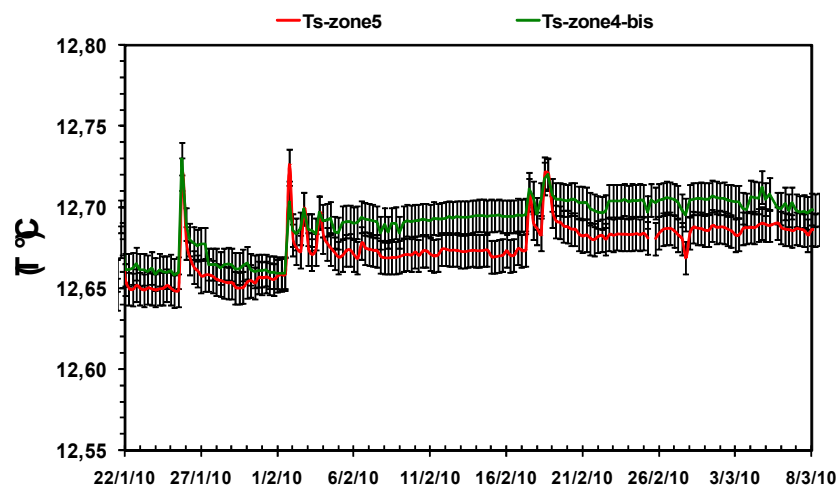


Figure 56 : évolution de la température de la surface dans les zones 4bis et 5 en hiver avec les erreurs de mesure

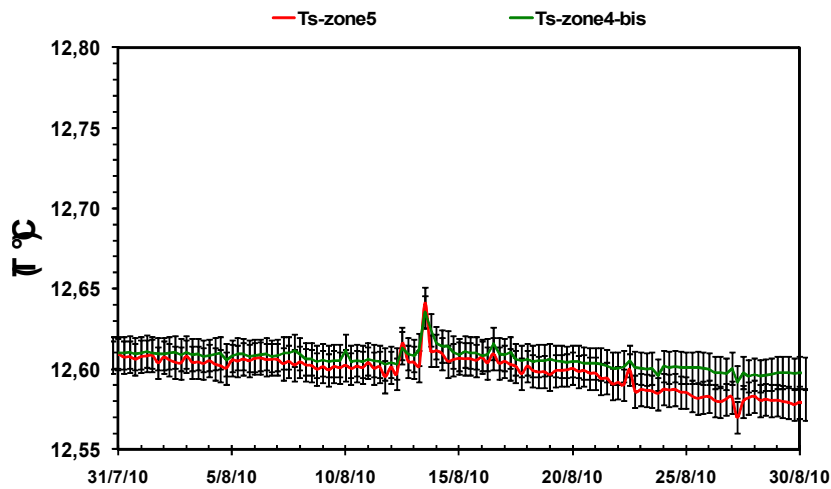


Figure 57 : évolution de la température de la surface dans les zones 4bis et 5 en été avec les erreurs de mesure

En conclusion les Ts 4 et 4bis sont toutes les deux légèrement supérieures (quelques centièmes) à la celle de la zone 5 jusqu'au début du printemps, tandis qu'après, les 3 courbes Ts4, 4bis et 5 peuvent être considérées comme identiques. Les courbes des trois températures dans les deux zones 4 et 5 sont visibles sur les figures 58 et 59.

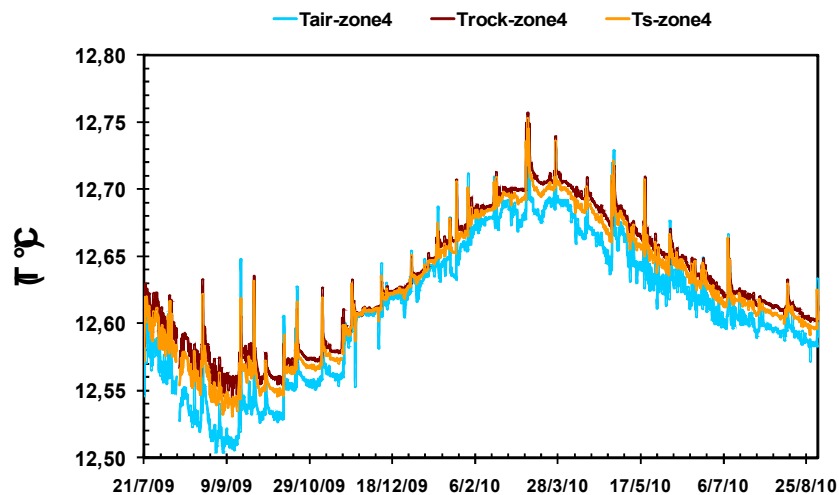


Figure 58 : évolution des températures de l'air de surface et de la roche dans la zone 4 pendant toute la période

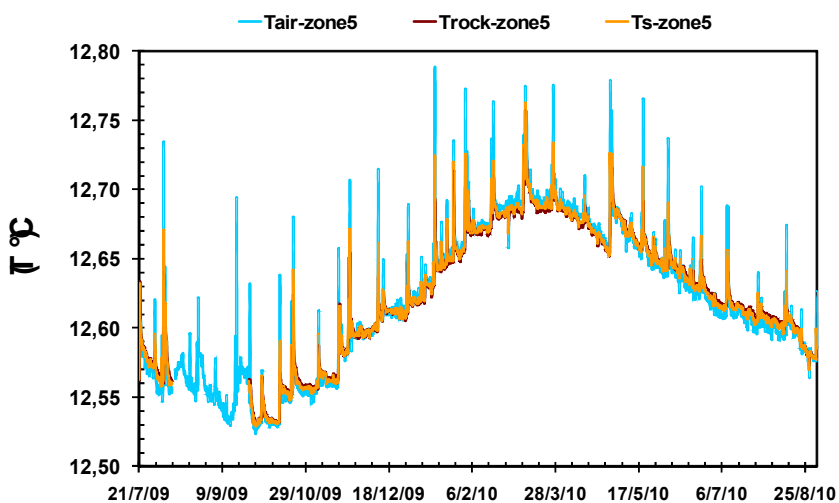


Figure 59 : évolution des températures de l'air de surface et roche dans la zone 5 pendant toute la période

## 6.2.2 - Humidité relative de l'air

L'humidité relative (RH) de l'air, à proximité de la surface des zones 4 et 5, a toujours eu des valeurs supérieures à 98,7%, pendant toute la période de mesure. Les valeurs enregistrées montrent qu'elles sont en moyenne toujours très proches pour les deux zones, à l'incertitude de mesure près. Cette constatation s'avère très évidente à l'examen de la figure 60, de même si on se concentre sur une période plus restreinte comme l'hiver (fig. 61), le printemps (fig. 62) et l'été (fig. 63).

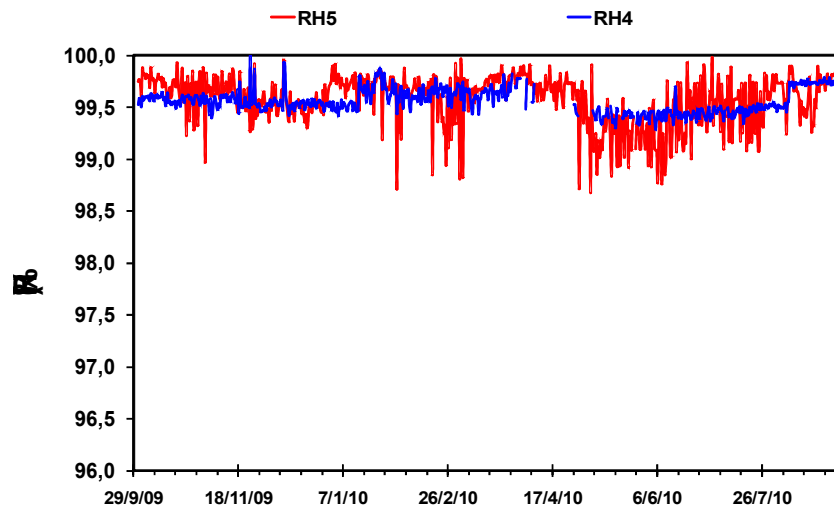


Figure 60 : évolution de l'humidité relative dans les 2 zones pendant toute la période

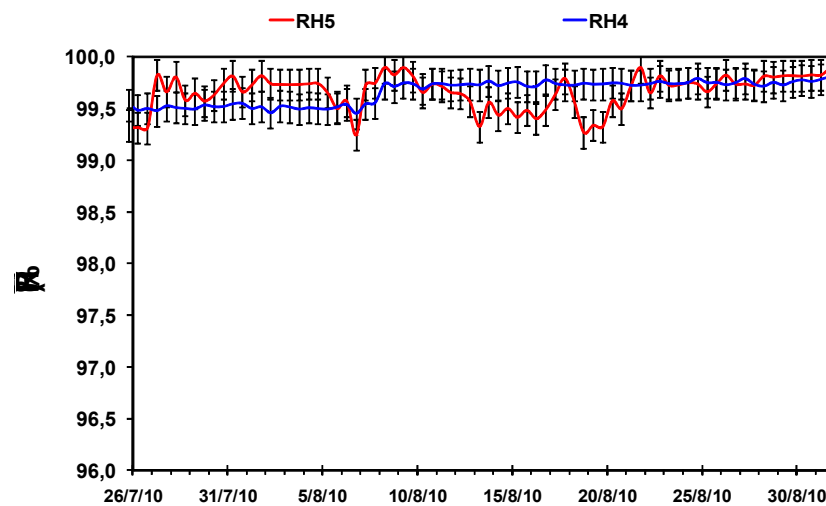


Figure 63 : évolution de l'humidité relative dans les 2 zones durant l'été

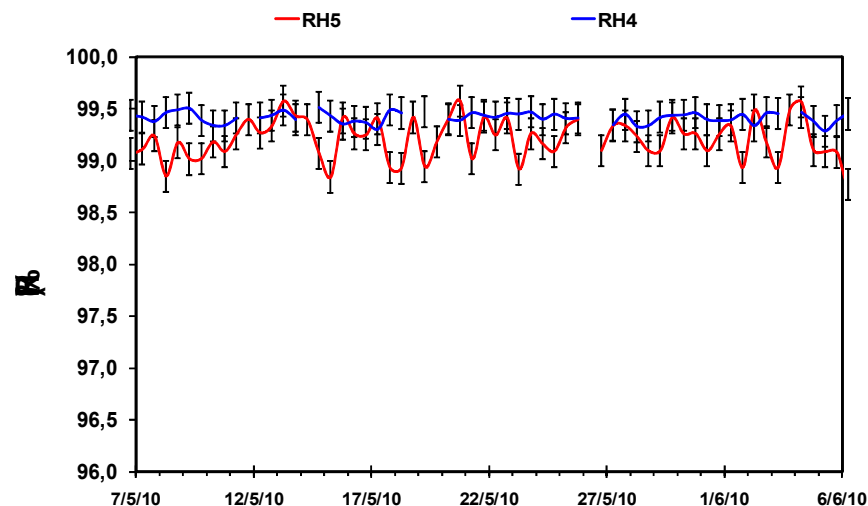


Figure 62 : évolution de l'humidité relative dans les 2 zones durant le printemps

En revanche les variations d'humidité sur la zone 5 sont plus importantes que sur la zone 4, surtout en été. On observe une grande variabilité qui atteint au maximum 1% d'HR.

En conclusion, l'humidité relative dans ces 2 zones montre qu'en moyenne :  $HR_{PR4} \sim HR_{PR5}$ , mais que la variabilité dans la zone 5 est plus importante que dans la zone 4.

### 6.2.3 - Rapport de mélange de l'air

Le rapport de mélange (RM) montre une concentration de vapeur d'eau dans l'air entre 8,4 et 9,0 g/kg pendant toute la période d'étude. Les deux zones présentent une totale similitude (fig. 64) de comportement du point de vue de la concentration d'eau présente dans l'air. Cela signifie que la variabilité de l'humidité relative observée est uniquement due aux variations de la température. Donc on peut affirmer que :

$$RM_{PR4} \approx RM_{PR5}$$

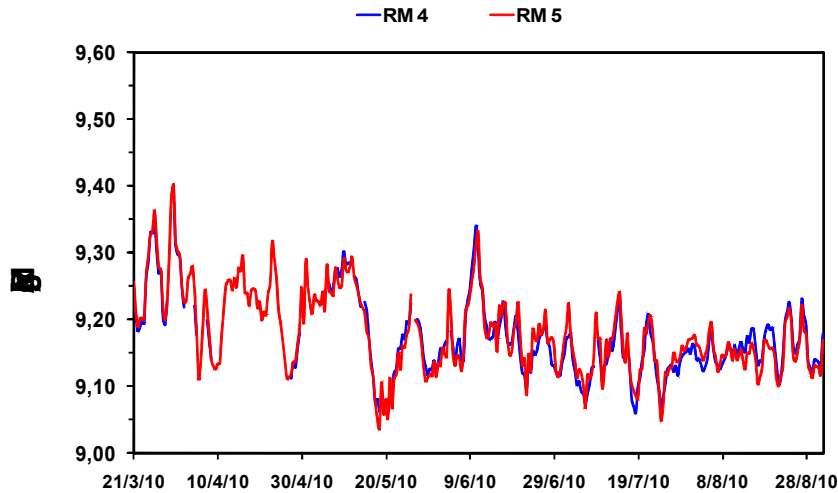


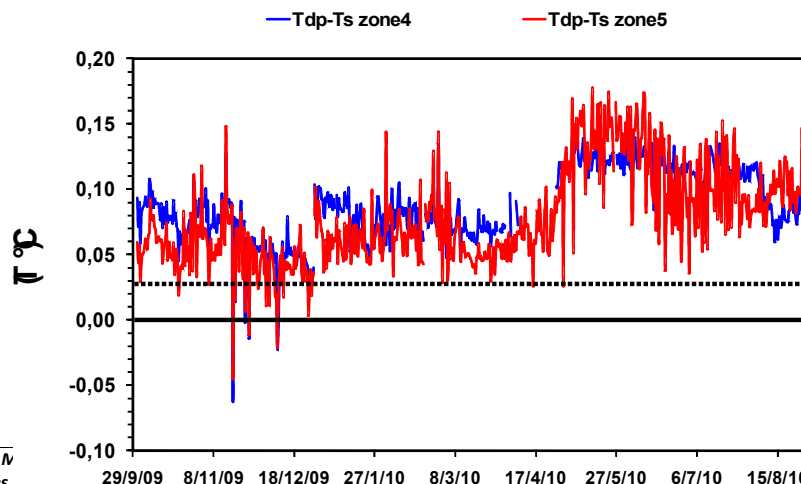
Figure 64 : évolution du rapport de mélange dans les 2 zones pendant toute la période

### 6.2.4 - La condensation superficielle

Un paramètre important pour comprendre le lien avec un éventuel développement microbologique est la présence de condensation superficielle.

Pour cette raison le phénomène a été partiellement suivi à travers deux méthodes différentes: une mesure indirecte (en calculant la condensation superficielle grâce à des formules qui utilisent les valeurs des paramètres thermohygrométriques de l'air et de la surface) et une mesure directe en utilisant le « dew sensor ».

Les données enregistrées durant la période d'étude dans les 2 zones montrent que le phénomène de condensation ne se produit presque jamais (fig. 65), c'est-à-dire que la différence entre le point de rosée ( $T_{dp}$ ) et la température superficielle ( $T_s$ ) ne descend presque jamais au-dessous du zéro. Ce phénomène n'est mis en évidence, par les deux méthodes, qu'au cours de deux mois hivernaux. Durant cette période, la méthode indirecte semble montrer plus d'épisodes de



condensation mais il faut garder à l'esprit que l'incertitude due au mode de calcul est supérieure à celle de la mesure directe.

Sur la figure 66, les mesures avec le Dew sensor mettent en évidence quelques épisodes de condensation.

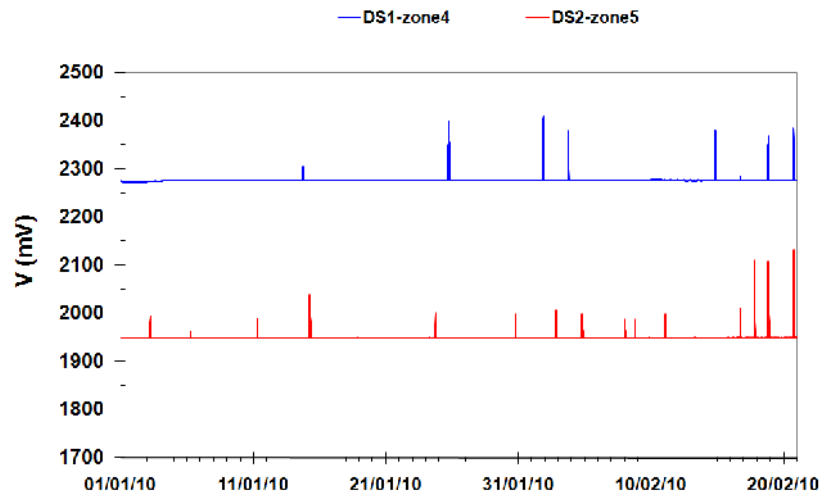


Figure 66 : suivi du phénomène de condensation par le Dew Sensor

### 6.2.5 - Le mouvement de l'air près des 2 surfaces

Les mouvements d'air dans les deux zones ont été au-dessous du seuil instrumental de détection de 10-20 mm/sec pendant toute la période de mesures.

### 6.3 - CONCLUSION

Les instruments utilisés, bâtis "ad hoc" ou spécifiquement modifiés pour pouvoir fonctionner dans un milieu « extrême » comme celui d'une grotte, se sont révélés suffisamment précis (malgré quelques défaillances) pour mettre en évidence des variations réelles thermiques, de l'ordre du centième de degré et des variations réelles d'humidité relative de l'ordre de quelques dixièmes de pour cent.

Malgré les difficultés inhérentes à ce type de mesures expérimentales dans un milieu difficile, l'analyse du microclimat dans les zones 4 et 5 a montré une très bonne stabilité générale. Les différences entre les 2 zones sont généralement occasionnelles. Les phénomènes de condensation sont pratiquement absents.

De manière générale, la situation peut être résumée dans le tableau suivant qui permet d'avoir une vision globale du microclimat de cet environnement.

	Automne 2009	Hiver 2010	Été 2010	Printemps 2010
Humidité relative	4 ~ 5	4 ~ 5	4 ≥ 5	4 ≥ 5
Température de l'air	4 ~ 5	4 ~ 5	5 ~ 4	5 ≥ 4
Température de la surface	4 ~ 5 4 <sub>bis</sub> ~ 4 4 <sub>bis</sub> ≥ 5	4 ≥ 5 4 <sub>bis</sub> ~ 4 4 <sub>bis</sub> ≥ 5	4 ≥ 5 4 <sub>bis</sub> ~ 4 4 <sub>bis</sub> ~ 5 4 <sub>bis</sub> ≥ 5 après 25/08)	4 ~ 5 4 <sub>bis</sub> ~ 4 4 <sub>bis</sub> ~ 5
Température de la roche	4 ≥ 5 (jusqu'à 15/10) 4 ~ 5 (après 15/10) 4 <sub>bis</sub> ~ 4 4 <sub>bis</sub> ≥ 5	4 ≥ 5 4 <sub>bis</sub> ~ 4 4 <sub>bis</sub> ≥ 5	4 ~ 5 4 ≥ 5 (après 25/08) 4 <sub>bis</sub> > 4 4 <sub>bis</sub> > 5	4 ≥ 5 (jusqu'à 29/04) 4 ~ 5 (après 29/04) 4 <sub>bis</sub> > 4 4 <sub>bis</sub> > 5
Mouvement de l'air	//	//	//	//
Condensation indirecte	absente	présente 4 ~ 5	absente	absente (5 possibles événements)
Dew sensor	absente	présente 4 ~ 5	absente	absente



*L.R.M.H. - Pôle "Microbiologie"***7.1 - MÉTHODE**

La méthode utilisée au cours de cette 2ème tranche du programme est la même que celle adoptée au cours de la 1ère partie. Les principes et techniques d'analyse de la flore microbienne des sols sont toutefois rappelés et détaillés ci-après. La flore tellurique est très variée et comprend différents types de micro-organismes tels que les bactéries, les champignons, les algues mais aussi des protozoaires et des virus. Pour caractériser la flore d'une terre, plusieurs paramètres biologiques nécessitent d'être mesurés : richesse du sol, taux de germes présents et identification des espèces majoritaires. Les techniques d'analyses disponibles au LMRH ont permis de dénombrer la flore bactérienne et fongique, par l'ensemencement sur milieu nutritif et d'identifier les colonies développées, sur des critères morphologiques (moisissures) et biochimiques (galerie API pour les bactéries). La flore bactérienne reste toutefois complexe. Certains germes possèdent des fonctions physiologiques importantes qui permettent de les classer en groupes fonctionnels. À l'intérieur de ces groupes, les réactions s'organisent en séries complexes et imbriquées (oxydation, réduction, minéralisation, synthèse...) qui forment des chaînes ou cycles plus ou moins fermés (Doumergues, 1970), tels que les cycles de l'azote et du soufre. Certains de ces germes ont été dénombrés grâce à l'utilisation de milieux spécifiques. Enfin, la richesse du sol en matière organique a été déterminée par dosage des éléments Carbone et azote (N) par le Laboratoire des Eaux de Besançon ainsi que le taux des ions nitrates, sulfates et chlorures.

**7.1.1 - Échantillonnage**

Les deux zones d'études retenues pour la suite du projet, ont été choisies pour leur différences d'une part substratique, mais d'autre part, pour leur état de colonisation de surface différent. Les principales caractéristiques d'ordre microbiologique sont rappelées ici :

- PR4 : substrat pulvérulent et sableux qui n'a jamais connu d'épisodes de colonisation fongique visuelle,
- PR5 : substrat argileux, compact, présentant des zones colonisées par des champignons de couleur noire.

Le programme d'étude s'est articulé autour de quatre campagnes de prélèvements, distantes d'environ 3 mois, qui reflètent ainsi les différentes saisons de l'année (été, automne, hiver, printemps). Le premier échantillonnage a été réalisé le 6 juin 2009, les campagnes suivantes ont eu lieu les 13 Octobre 2009, le 1<sup>er</sup> février 2010 et le 29 avril 2010. En sus de ces campagnes fixes, il était convenu de déclencher d'autres interventions en fonction de l'alerte donnée par l'équipe de restaurateurs sur la régression et/ou l'apparition de contaminations visibles sur les zones choisies. Aucune modification de surface n'ayant été signalée, il n'y a pas eu d'autres prélèvements.

Chaque campagne d'échantillonnage s'organise de façon identique, par le prélèvement de trois échantillons distincts sur chacune des deux zones, constitués d'environ 10 g de terre – les zones PR4 et PR5 présentant beaucoup de matière disponible. La localisation de chaque prélèvement est reportée sur un calque.

**7.1.2 - Protocole**

Les micro-organismes sont en quantité trop importante dans un échantillon pour être quantifiés à partir du prélèvement de base. La préparation d'une suspension-dilution dans une eau stérile du substrat à analyser est alors nécessaire et sert à ensemencer différents milieux de cultures spécifiques pour la numération de la flore hétérotrophe et de milieux dits sélectifs vis-à-vis des groupes fonctionnels. Ces mises en culture donnent une numération indirecte par défaut, puisqu'elle ne permet de comptabiliser que les germes viables qui vont se développer en donnant des colonies visibles. On parle alors de germes cultivables. Sur milieu solide, la numération de la flore hétérotrophe est exprimée en Unités Formant Colonies (UFC) par gramme de matière analysée. La culture en milieu liquide permet de comptabiliser les germes viables par l'établissement du nombre le plus probable de germes présents en rapport aux tables statistiques de Mac Grady.

Une suspension mère est préparée en ajoutant 3,33 g de terre des trois échantillons de sédiments prélevés sur une même zone, soit l'équivalent de 10 g de sédiment final à 90 mL d'eau peptonée. Ce milieu, contenant de la peptone, est un bouillon qui permet de pré-enrichir l'échantillon avant l'ensemencement de l'inoculum sur les différents milieux. Une gamme de dilutions en série (de 10 en 10) est réalisée à partir de la suspension mère dans de l'eau physiologique stérile jusqu'à la dilution  $10^{-7}$ .

Les ensemencements sont effectués dans les deux semaines qui suivent l'échantillonnage, afin de minimiser les pertes de matière vivante. Néanmoins, pour le prélèvement de juin 2009, les analyses ont été retardées de deux mois, délai nécessaire pour finaliser l'étude des prélèvements de la 1<sup>ère</sup> tranche sur les zones PR2 et PR3.

#### 7.1.2.1 - Numération et identification de la flore hétérotrophe

##### ✓ Bactéries

Le dénombrement et l'identification de la flore bactérienne s'effectue par différentes étapes d'ensemencements et de repiquages sur des milieux nutritifs, dont la liste est présentée ci-dessous :

- milieu « Extrait de terre (ET) » : composé à partir d'éléments extraits de la terre, ce milieu est additionné d'agar. Il permet la croissance des germes du sol ;
- milieu « Gélose Nutritive (GN) » : milieu d'isolement non sélectif, il permet le développement de l'ensemble des bactéries ;
- milieu « Dox-Czapek (DOX) » : utilisé pour isoler la flore tellurique, il permet le développement des bactéries ainsi que des moisissures ;
- milieu « Bunt et Rovira (BN) » : ce milieu peut être additionné de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ). Il permet alors de détecter les bactéries qui dissolvent les carbonates, révélées par la présence de halos de dissolution.

Pour le dénombrement des germes, 100  $\mu\text{L}$  de la suspension-dilution est déposée puis ensemencée sur milieu gélosé. La manipulation est répétée trois fois pour un même facteur de dilution, ainsi que pour l'ensemble des milieux cités. Après incubation à 30°C pendant 48h, la numération des colonies peut être effectuée sur les boîtes des cultures qui présentent un nombre de colonies compris entre 30 et 300. Le taux de germes final est alors égal au nombre moyen de colonies trouvé sur les 3 boîtes, multiplié par le facteur de dilution.

*NB : l'ensemencement du milieu « Bunt et Rovira » est différent, il s'effectue dans la masse : 1 mL de suspension est introduit dans le milieu.*

L'identification des germes bactériens est réalisée à partir des colonies développées sur les milieux GN et ET. Chaque colonie présentant un aspect macroscopique singulier (taille, forme, surface rugueuse ou lisse, couleur, etc) est repiquée sur un milieu GN vierge, afin d'obtenir une culture pure de la souche.

L'identification des espèces va apporter un complément utile à la numération. Cette identification repose sur la comparaison de divers caractères phénotypiques (morphologiques, biochimiques, physiologiques) des souches à étudier, vis-à-vis de souches de référence (Busse, 1996). La première étape d'identification bactérienne consiste à réaliser la coloration de Gram qui différencie deux grands groupes de bactéries : les Gram positifs, notés Gram + (colorés en violet) et les Gram négatifs, notés Gram - (en rose), la séparation des germes s'opère en fonction de la nature de la membrane cellulaire. Cette étape permet également d'observer la morphologie des bactéries, et de définir s'il s'agit de coques (bactéries de formes rondes), de bacilles (en bâtonnets), ou d'autres types moins conformes.

Une fois la coloration de Gram effectuée, l'automatisation des méthodes d'identification, utilisant des galeries comme le système API, a l'avantage de standardiser les critères biochimiques recherchés et par suite d'améliorer la reproductibilité des résultats. Cette gamme propose 16 produits d'identification réunissant les caractères biochimiques et les tests de dégradation des sucres et des protéines. La quasi totalité des groupes bactériens est couverte avec plus de 550 espèces différentes ce qui permet d'avoir la meilleure réponse concernant les espèces présentes.

##### ✓ Moisissures

La culture des champignons doit être réalisée sur un milieu adapté qui doit répondre à un certain nombre de qualités (Pitt, 1999) :

- inhiber la croissance des bactéries (adjonction d'antibiotiques) ;
- être suffisamment nutritif pour permettre la croissance des champignons à croissance difficile ;
- limiter ou supprimer la croissance des espèces à développement envahissant ;
- ralentir la croissance radiale des colonies pour éviter leur chevauchement.

Les milieux de culture gélosés les plus couramment utilisés (Malt Agar, Potato Dextrose Agar) ont des teneurs en eau élevées et favorisent incontestablement les espèces hygrophiles. D'une façon générale le choix des conditions de culture doit correspondre au plus près aux facteurs environnementaux du site étudié. Le non respect de ce principe peut entraîner des résultats faux et une interprétation erronée. L'utilisation simultanée de plusieurs milieux permet de révéler le maximum d'espèces et de les différencier selon les conditions de développement.

Les analyses ont été effectuées sur deux milieux :

- milieu « Malt Agar » : milieu nutritif riche sur lequel se développe l'ensemble des microorganismes (bactéries et moisissures). Aussi, les cultures présentant majoritairement des bactéries, l'utilisation d'un autre milieu contenant un antibiotique a été préférée ;
- milieu « OGY – Oxytétracycline Glucose Yeast agar » : contenant un antibiotique (l'oxytétracycline) qui empêche la croissance des bactéries. Ce milieu permet le développement de l'ensemble des moisissures.

De même que pour les bactéries, les milieux gélosés sontensemencés avec 100 µL de suspensions-dilutions, à raison de 3 boîtes par facteur de dilution. Le dénombrement s'effectue selon le même principe c'est à dire que seules les cultures qui présentent entre 15 et 150 colonies sont dénombrées, après une incubation de 5 jours à 24°C. Sur ces mêmes cultures, les colonies, peu nombreuses, sont souvent isolées les unes des autres et peuvent être identifiées par examen microscopique. Si toutefois, des doutes subsistent sur certaines colonies, celles-ci sont isolées sur milieu MG, et identifiées de nouveau.

L'identification des moisissures repose sur des critères morphologiques. Un prélèvement de la souche est déposé dans une goutte de bleu de lactophénol, entre lame et lamelle. Le montage est observé au microscope optique au grossissement x 400. Les différentes structures morphologiques (grosseur du thalle, forme et taille des conidies) sont examinées et comparées aux clés d'identification de différents ouvrages spécialisés qui permettent l'identification des moisissures (Onions, 1981; Botton, 1990 ; Domsch, 2007).

✓ Algues

La présence d'algues dans les sols représente une part mineure de la microflore. Toutefois, pour les dénombrer et les identifier, l'utilisation d'un milieu spécifique est nécessaire. Le milieu BG11 (Blue-Green Medium) a été utilisé au cours de programme.

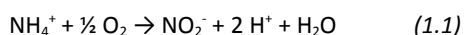
#### 7.1.2.2 - Numération des germes participant aux groupes fonctionnels

Les espèces participant aux cycles biologiques sont majoritairement des bactéries autotrophes. La numération de ces germes s'effectue à l'aide de milieux spécifiques liquides dont la lecture repose sur des tests biochimiques. Pour déterminer la concentration, on établit une sorte de statistique de viabilité des espèces avec définition du nombre le plus probable de germes présents. Les chiffres obtenus sont alors rapportés aux tables statistiques de Mac Grady qui permettent l'évaluation du nombre le plus probable de germes par gramme d'échantillon, les résultats seront exprimés en nombre de germes / g de sédiment pour simplifier la lecture.

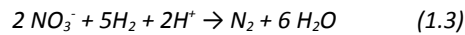
L'ensemble des milieux de culture a permis d'étudier les germes participant aux cycles de l'azote, du soufre, du manganèse et du fer. Ces différents milieux, ainsi qu'un bref descriptif des communautés microbiennes ciblées sont détaillés ci-dessous.

✓ Cycle de l'azote

- **Ammonification** : les germes ammonifiants participent à la décomposition des produits azotés organiques animaux ou végétaux en ammoniac ( $\text{NH}_3$  ou l'ion équivalent  $\text{NH}_4^+$ ). Le processus d'ammonification est peu spécifique des microorganismes puisque beaucoup d'espèces y interviennent, dont les genres les plus connus sont : *Achromobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, etc. (Doumergues, 1970).
- **Nitrification** : ce processus consiste à la transformation de l'azote ammoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ) en nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) par l'intermédiaire de deux réactions, la nitrosation (réduction de l'ammoniac en nitrites, cf. équation (1.1)) et la nitratisation (transformation des nitrites en nitrates, équation (1.2)), effectuées respectivement par les espèces *Nitrosomas sp.* et *Nitrobacter sp.* (Meier, 2007) ;



- **Dénitrification** : processus biochimique au cours duquel la flore microbienne réduit les nitrates et les nitrites à l'état de produits gazeux (azote moléculaire, oxyde nitreux) reconstituant ainsi une partie de la réserve atmosphérique (cf. équation (1.3)). Les microorganismes impliqués sont *Thiobacillus denitrificans*, *Micrococcus denitrificans*, ainsi que d'autres espèces appartenant aux genres communs *Pseudomonas* et *Achromobacter*. (Doumergues, 1970; Meyer, 2004)



Remarque : lorsque la flore ammonifiante et dénitrifiante est présente à un taux équivalent dans le sol, le cycle est considéré comme équilibré.

- ✓ Cycle du soufre
  - **Minéralisation du soufre** : réduction des constituants organiques soufrés en sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S).
  - **Oxydation du soufre** : transformation de l'hydrogène soufré (H<sub>2</sub>S) minéralisé en sulfates (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) notamment par les bactéries appartenant au genre *Thiobacillus*.
- ✓ Cycle du fer et manganèse
  - **Oxydation du fer** : ce processus d'origine biologique est bien établi dans les eaux, mais reste peu étudié dans les sols. Il est réalisé par des ferro-bactéries qui oxydent le fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>).
  - **Oxydation du manganèse** : le manganèse est présent dans les sols sous différentes formes (ions Mn<sup>2+</sup>, oxydes de manganèse MnO<sub>2</sub> ou sous forme complexée avec d'autres substances). Les bactéries oxydant le manganèse appartiennent à des genres différents dont les plus courants sont *Aerobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* etc. (Doumergues, 1970)

L'ensemencement des milieux est réalisé en ajoutant 0,5 mL ou 1 mL d'inoculum dans chaque tube, à raison de 3 tubes par facteur de dilution. La lecture fait l'objet d'un protocole différent pour chaque milieu, qui repose sur l'adjonction de réactifs et dont la lecture s'effectue par le biais de réactions positives ou négatives. Les résultats sont rapportés en nombre de germes (le plus probable) par gramme de sédiment.

## 7.2 - RÉSULTATS

Les échantillons des 4 campagnes de prélèvements des 2 zones ont été analysés au laboratoire de microbiologie. Nous obtenons pour chaque zone, deux types d'informations : des données quantitatives sous forme de taux de microorganismes présents dans les sédiments échantillonnés et des données qualitatives avec la réalisation de l'inventaire des espèces bactériennes et fongiques isolées.

### 7.2.1 : Zone PR4 - substrat sableux sans contamination fongique visible

#### 7.2.1.1 - Dénombrement

Les résultats des dénombrements de la flore hétérotrophe obtenus au cours des 4 campagnes sont présentés sur la figure 67. Le taux de bactéries, obtenu à partir du milieu GN, peu sélectif, est constant au cours du temps autour d'une valeur moyenne de 10<sup>8</sup> UFC/g de sédiment, valeur représentative d'un sol commun. Les mêmes résultats sont obtenus sur les milieux plus spécifiques des germes du sols, c'est-à-dire ET et DOX, sur lesquels la flore atteint également 10<sup>8</sup> UFC/g de sédiment au cours des 4 campagnes. Aucune bactérie participant à la dissolution des carbonates n'est détectée (milieu Bunt et Rovira).

Les moisissures, dénombrées à l'aide du milieu OGY sont présentes à un taux moyen de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> UFC/g de sédiment. La prédominance des bactéries par rapport aux champignons est normale et le rapport entre les deux familles est représentatif d'une flore tellurique.

Enfin, aucun développement d'algues n'a été observé au cours des 4 analyses (milieu BG11).

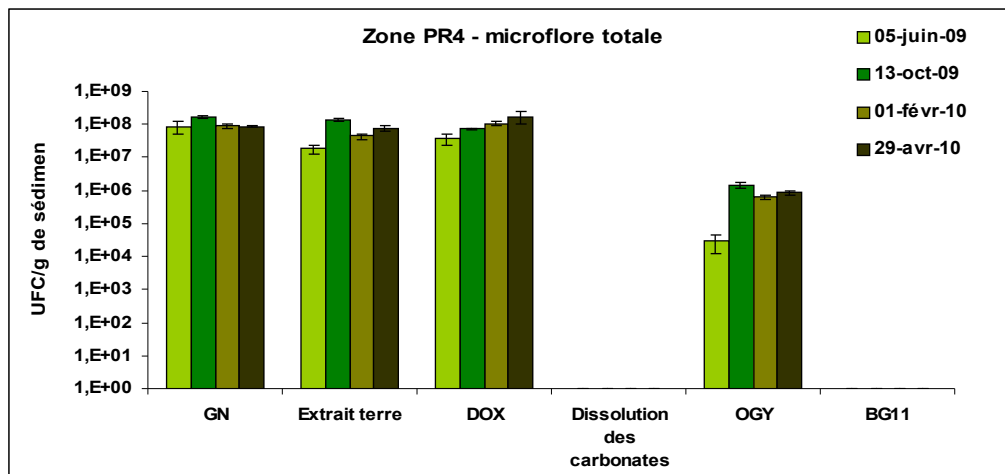


Figure 67 : taux de microorganismes en UFC / g de sédiment de la zone PR4 pour les 4 campagnes de prélèvements

Le dénombrement des germes participant aux groupes fonctionnels est présenté sur la figure 68. Les germes du cycle de l'azote sont très présents. Les ammonifiants atteignent un taux de  $10^8$  germes/g de sédiment, taux équivalent à la flore totale hétérotrophe dénombrée dans la précédente tranche d'étude. Le nombre de germes dénitrifiants est moins élevé ( $\sim 10^6$  germes/g de sédiment) mais l'équilibre entre les 2 catégories est assuré. Il n'y aurait donc ni enrichissement, ni appauvrissement du sol en azote. Enfin, les germes participant à la nitrosation (ferments nitreux) et à la nitratisation (ferments nitriques) sont peu présents. Le taux des ferments nitreux est très faible voire nul (taux  $< 10$  germes/g de sédiment), alors que celui des ferments nitriques est supérieur et avoisine les  $10^3$  germes / g de sédiment, au cours des 4 prélèvements. Les écarts entre les résultats des différentes campagnes ne sont pas considérés comme significatifs. Les germes appartenant au cycle du soufre (minéralisants et oxydants) sont présents en très faible quantité dans la terre. Les oxydants présentent un taux plus élevé, avec un pic détecté en octobre 2009, à  $10^3$  germes/g de sédiment. Toutefois, les valeurs obtenues au cours des 4 campagnes restent dans des taux proches et relativement faibles. Enfin, les oxydants du fer et du manganèse présentent des taux inférieurs à 10 germes/g de sédiment. Ces germes sont à l'état de traces dans le sol.

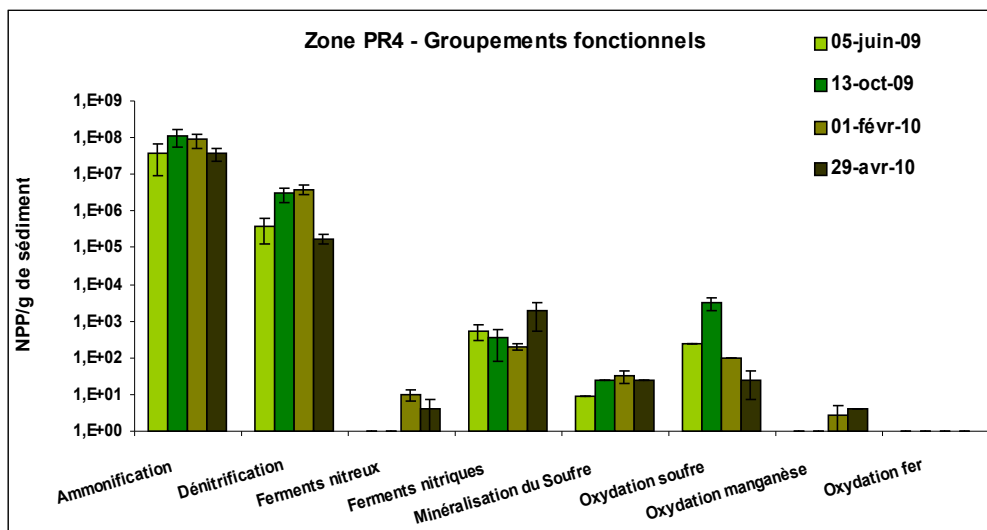


Figure 68 : taux des germes participant à des groupes fonctionnels, en Nombre de germes le Plus Probable (NPP) / gramme de sédiment de la zone PR4, pour les 4 campagnes de prélèvements

Les germes participant aux processus biochimiques des cycles de l'azote et du soufre sont les deux grands groupes de germes présents dans les sédiments de la zone PR4. Ils présentent des taux classiques, caractéristiques des échantillons de sols. Par ailleurs, il est important de souligner que l'ensemble des numérations effectuées sont constantes au cours des 4 campagnes de prélèvements, aucune différence significative n'est relevée.

En conclusion, les numérations effectuées sur l'ensemble des milieux mettent en évidence la présence d'une population microbienne très homogène. Le nombre de germes est constant au cours du temps (c'est-à-dire identique pour les 4 campagnes), et la flore est composée de bactéries hétérotrophes et autotrophes qui participent principalement aux cycles de l'azote et du soufre, ainsi que de moisissures.

### 7.2.1.2 - Identification des germes

L'identification des germes bactériens et fongiques repose sur des critères biochimiques et morphologiques, dont le protocole est décrit au paragraphe 7.1.2.

#### ✓ Bactéries

Le tableau 4 décrit l'ensemble des espèces identifiées au cours de chaque prélèvement, chaque ligne du tableau correspondant à une même espèce. Les pourcentages indiquent la proportion de chaque espèce identifiée par rapport à la totalité des germes isolés au cours de la même analyse. De même, le taux de la microflore totale dénombrée sur milieu GN est rappelé pour chaque campagne en haut de chaque colonne. Les espèces sont classées en fonction des résultats des colorations de Gram, c'est-à-dire en 2 grandes familles de bactéries, les Gram positifs et les Gram négatifs.

Bactéries	5 Juin 2009	13 Octobre 2009	1er Février 2010	29 Avril 2010
Taux microflore totale	8,59E+07	1,68E+08	8,97E+07	8,63E+07
Gram -	<i>Rhizobium radiobacter</i> 10% <i>Ochrobactrum anthropi</i> 10%  <i>Brevundimonas diminuta</i> 10%  <i>Alcaligenes sp.</i> 10% <i>Sphingobacterium spiritivorum</i> 10%	<i>Rhizobium radiobacter</i> 23% <i>Ochrobactrum anthropi</i> 15% <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 4% <i>Brevundimonas diminuta</i> 27% <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4%	<i>Rhizobium radiobacter</i> 36%  <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 8%  <i>Pseudomonas sp.</i> 26% <i>Alcaligenes sp.</i> 2%  <i>Stenotrophomas maltophilia</i> 8% <i>Burkholderia cepacia</i> 8%	<i>Rhizobium radiobacter</i> 11% <i>Ochrobactrum anthropi</i> 39% <i>Sphingomonas paucimobilis</i> 7%   <i>Pasteurella sp.</i> 13% <i>Oligella urethralis</i> 3% <i>Moraxella sp.</i> 4% BG- NE 1%
Gram +	<i>Bacillus sp.</i> 40%	Micrococcaceae 4% <i>Bacillus sp.</i> 23%	<i>Bacillus sp.</i> 12%	Mycobacteriaceae 1% <i>Bacillus sp.</i> 21%

Tableau 4 : espèces bactériennes identifiées lors des 4 campagnes de prélèvements - Zone PR4

D'une manière générale, sur la zone PR4, les espèces identifiées au cours des 4 prélèvements et rapportées dans le tableau sont des germes classiques et représentatifs de la flore tellurique. La flore est composée de *Bacillus* et d'autres germes communs : *Rhizobium sp.*, *Ochrobactrum sp.*, *Pseudomonas sp.*, etc. Le nombre de types différents de bactéries oscille entre 6 et 9 sur les 4 campagnes, et les espèces identifiées sont sensiblement identiques dans le temps. Il est nécessaire de préciser que nous parlerons ici de type bactérien, car il s'avère parfois difficile de pousser l'identification des germes jusqu'au nom de l'espèce. Le cas échéant, nous restons au genre, voire à la famille de bactéries telle que les Mycobacteriaceae ou les Micrococcaceae. Par ailleurs, les BG-Non Enterobactéries, sont des bactéries bacilles gram négatif appartenant à la famille des Non Enterobactéries qui n'ont pas pu être identifiées par galerie API.

Ce tableau permet également d'obtenir des données semi-quantitatives sur le pourcentage des espèces présentes. Nous constatons qu'au mois de juin 2009, les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont omniprésentes dans l'échantillon. Un rappel sur les conditions d'analyse de cet échantillon doit être effectué. En effet, comme précisé au cours du protocole, les analyses de dénombrement et d'identification ont été réalisées 2 mois après l'échantillonnage, une perte de matière vivante ainsi que la prédominance d'espèces plus résistantes, telles que les bactéries du genre *Bacillus*, sont des hypothèses à prendre en considération.

Une autre représentation des résultats par camembert (cf. fig. 69) permet de mettre en évidence les espèces majoritaires et communes (même couleur) au cours du temps.



Cette deuxième représentation met en exergue la prédominance des *Bacillus* en juin 2009, ainsi que sa décroissance contrebalancée par la présence d'autres germes.

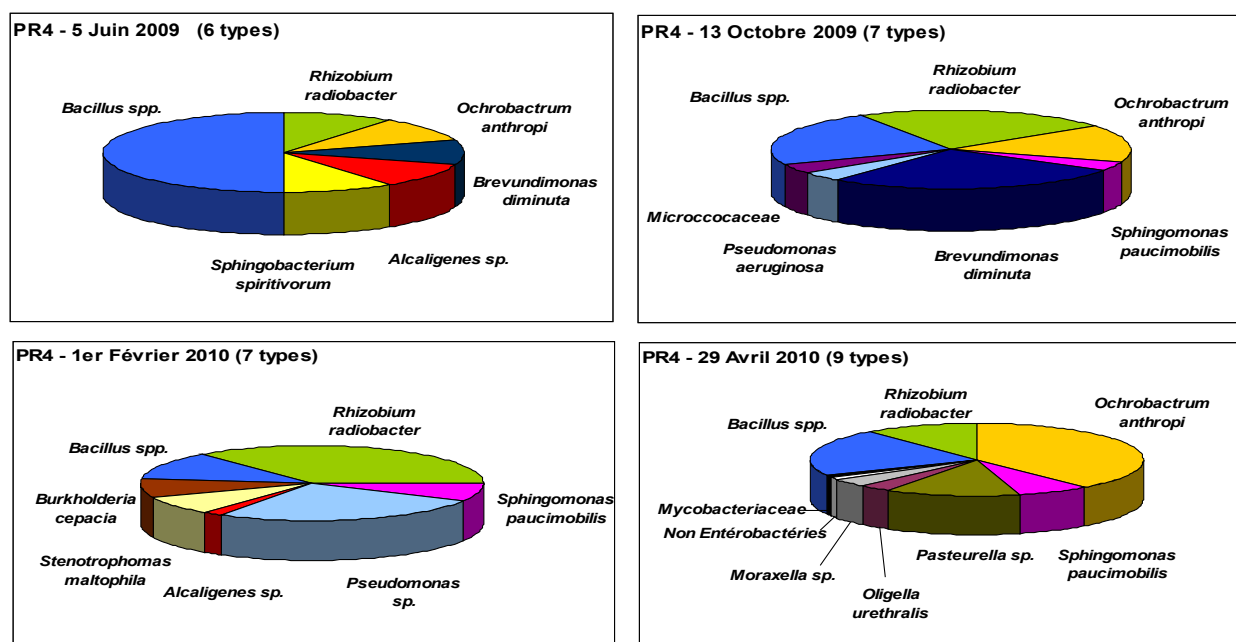


Figure 69 : représentation des espèces bactériennes au cours des 4 campagnes de prélèvements – Zone PR4

#### ✓ Moisissures

L'identification des moisissures repose uniquement sur les observations microscopiques des structures fongiques. Le tableau 5 présente l'ensemble des espèces identifiées au cours des 4 analyses de terre. En premier lieu, le taux de moisissures ainsi que le nombre d'espèces est plus faible pour le prélèvement de juin 2009, pour les raisons citées auparavant. Les moisissures identifiées sont représentatives des germes du sol, et ont déjà été retrouvées lors de différents prélèvements effectués dans la grotte, il s'agit des genres *Fusarium* (colonie blanche), *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* et *Trichoderma*.

Micoorganismes	5 Juin 2009		13 Octobre 2009		1er Février 2010		29 Avril 2010	
Taux de la flore fongique (en UFC/g de sédiment)	2,88E+04		1,48E+06		6,27E+05		8,50E+05	
Espèces	<i>Fusarium sp.</i> 45%	<i>Aspergillus sp.</i> 10%	<i>Penicillium sp.</i> 25%	<i>Cladosporium sp.</i> 10%	<i>Fusarium sp.</i> 2%	<i>Aspergillus sp.</i> 5%	<i>Penicillium sp.</i> 1%	<i>Cladosporium sp.</i> 2%
					<i>Acremonium sp.</i> 32%	<i>Verticillium sp.</i> 18%	<i>Ulocladium sp.</i> 16%	<i>Gliomastix sp.</i> 10%
					<i>Trichoderma sp.</i> 2%			
						<i>Trichoderma sp.</i> 2%		
							<i>Fusarium sp.</i> 4%	<i>Aspergillus sp.</i> 5%
							<i>Penicillium sp.</i> 1%	<i>Cladosporium sp.</i> 2%
							<i>Cladosporium sp.</i> 1%	<i>Acremonium sp. 1</i> 26%
							<i>Acremonium sp. 1</i> 24%	<i>Verticillium sp.</i> 10%
							<i>Verticillium sp.</i> 38%	<i>Ulocladium sp.</i> 8%
							<i>Ulocladium sp.</i> 14%	<i>Gliomastix sp.</i> 10%
							<i>Gliomastix sp.</i> 12%	<i>Gliomastix sp.</i> 10%
							<i>Trichoderma sp.</i> 1%	<i>Trichoderma sp.</i> 12%
							<i>Acremonium sp. 2</i> 1%	<i>Fusarium sp. 2</i> 3%
							<i>Fusarium sp. 2</i> 3%	<i>Geomyces sp.</i> 2%

Tableau 5 : noms et pourcentages des espèces fongiques identifiées au cours des 4 campagnes de prélèvements - Zone PR4

En second lieu, *Acremonium sp.* apparaît comme espèce dominante en octobre 2009 (32%) et conserve un pourcentage important au cours des deux derniers prélèvements (25% et 38%) avec une diversification des espèces appartenant au même genre. En effet, deux espèces du genre *Acremonium*, présentant des formes de colonies distinctes sur gélose, mais semblables au microscope ont été identifiées. Comme les identifications ne permettent généralement pas d'aller jusqu'à l'espèce, nous les avons différenciés en les nommant *Acremonium sp.1* et *Acremonium sp.2*. L'absence de cette moisissure au mois de juin peut être en partie expliquée par la perte de matière au cours des deux mois de stockage des échantillons. Nous pouvons également remarquer une diversification des espèces de *Fusarium*, avec l'apparition de *Fusarium solani* en avril 2010. Les autres moisissures recensées sont caractéristiques de la flore du sol - tels que les genres *Verticillium*, *Ulocladium* et *Gliomastix* - et le nombre de genres reste constant au cours de 3 dernières campagnes (8 genres).

Les camemberts représentés sur la figure 70 reflètent les conclusions abordées ci-dessus, et mettent en évidence d'une part la prédominance du genre *Acremonium* et d'autre part, l'homogénéité de la flore fongique au cours de l'année d'étude.

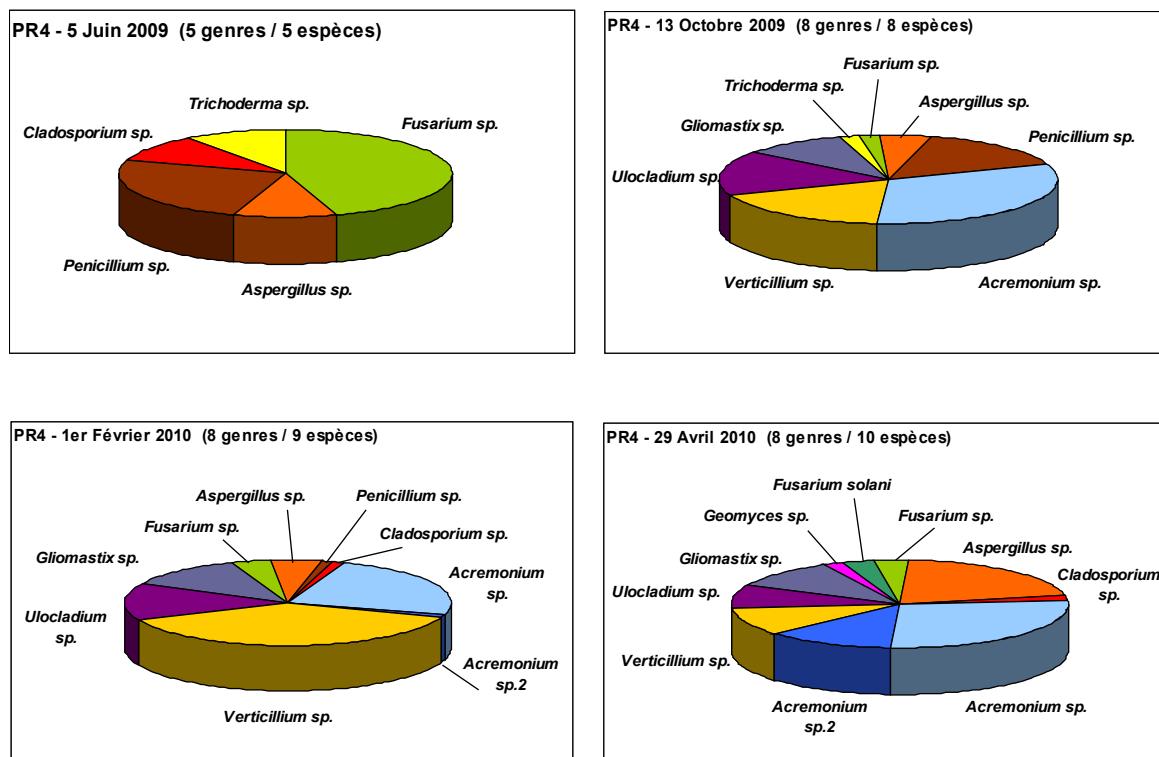


Figure 70 : représentation des espèces fongiques au cours des 4 campagnes de prélèvements – Zone PR4

### 7.2.1.3 - Conclusion sur la zone PR4

Pour conclure, le spectre microbien de la zone PR4 a été identifié et dénombré. La flore est composée de bactéries et de moisissures à des taux couramment retrouvés dans les sols. Les espèces identifiées sont communes des germes telluriques et relativement peu diversifiée (9 types bactériens et 8 genres fongiques). De plus, la flore reste homogène au cours du temps.

## 7.2.2 : Zone PR5 - substrat argileux recouvert de tâches noires

### 7.2.2.1 - Dénombrement

Les résultats des dénombrements des sédiments de la zone PR5 sont présentés sur la figure 71. Les informations rapportées sont identiques à la zone PR4. La microflore bactérienne, dénombrée à l'aide du milieu GN, présente un taux de  $10^8$  UFC/g de sédiment. Ce taux reste constant dans le temps, avec une légère diminution en avril 2010, mais qui n'est pas significative. Les milieux ET et DOX confirment les résultats obtenus sur GN, avec un taux de bactéries avoisinant les  $5.10^7$  UFC/g de sédiment. De même que pour PR4, aucune bactérie participant à la dissolution des carbonates n'est dénombrée.

Les spores de moisissures sont présentes à des quantités moyennes de  $10^5$  à  $10^7$  UFC/ g de matière, taux relativement classique des germes du sols. Les écarts constatés en juin 2009 et février 2010 ne sont pas considérés comme significatifs.

Enfin, les algues sont absentes du cortège microbien de la zone PR5.

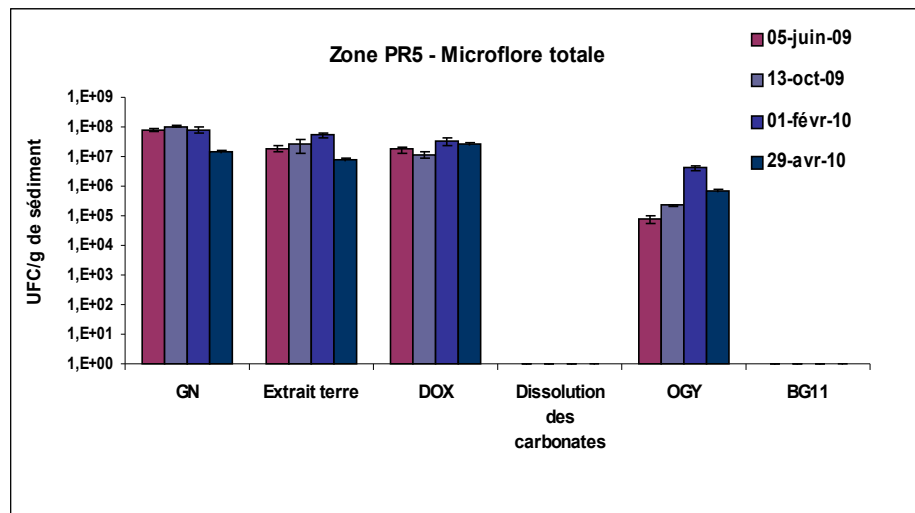


Figure 71: taux de microorganismes en UFC / g de sédiment de la zone PR5 pour les 4 campagnes de prélèvements

Les germes participant aux différents groupes fonctionnels sont dénombrés, les résultats sont présentés sur la figure 72. Les ammonifiants ainsi que les dénitrifiants atteignent des valeurs moyennes respectives de  $10^7$  et  $10^5$  germes/g de sédiments – les valeurs restant constantes au cours des 4 campagnes. Ces taux sont identiques à ceux retrouvés dans les sédiments de PR4 et indique un bon équilibre du sol en azote. Les germes participant à la formation de nitrites (ferments nitreux) sont faiblement représentés, alors que les ferments nitriques (formation de nitrates par *Nitrobacter sp.*) présentent des taux supérieurs, dont la valeur moyenne est comprise entre  $10^3$  et  $10^4$  germes/g de sédiment.

Les minéralisants et oxydants du soufre présentent des taux faibles (< 100 germes/g de sédiment), avec une fois de plus, la présence d'un pic détecté en octobre 2009, à  $10^4$  germes/g de sédiment. L'origine de ce pic n'est à ce jour pas expliqué. Enfin, les germes participant à l'oxydation du fer sont absents, les oxydants du manganèse sont à l'état de traces (< 10 germes/g de sédiment).

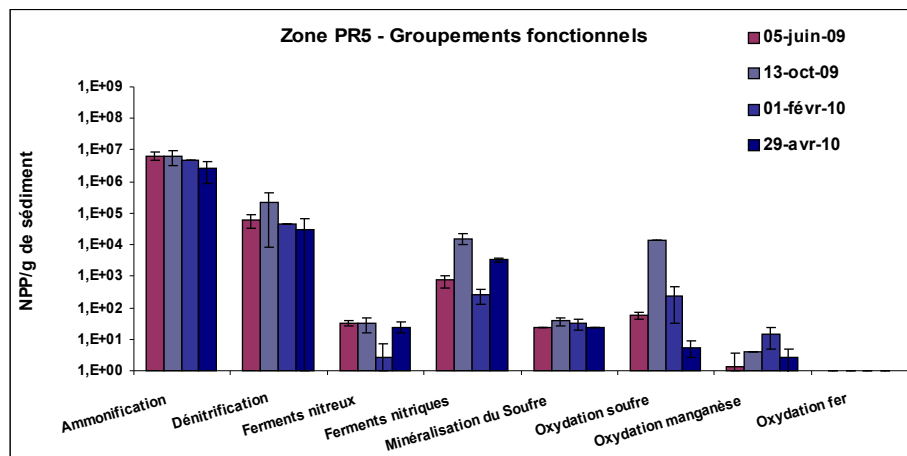


Figure 72 : taux des germes participant à des groupes fonctionnels, en nombre de germes le plus probable (NPP) / gramme de sédiment de la zone PR5, pour les 4 campagnes de prélèvements

La caractérisation du taux microbien sur la zone PR5 peut être qualifiée de normale. La microflore totale (bactéries et champignons) présente un taux classique caractéristique des sols. Les germes participant aux groupes fonctionnels atteignent également des taux communs. Enfin, l'ensemble des numérations est constant au cours des 4 prélèvements, mis à part le pic des oxydants du soufre relevé en octobre 2009.

### 7.2.2.2 - Identification des germes

#### ✓ Bactéries

Les espèces identifiées à partir de la suspension de terre de la zone PR5 sont regroupées dans le tableau 6. Il indique pour chaque campagne de prélèvements, le nom des espèces bactériennes – une même espèce par ligne. Nous pouvons très facilement remarquer l'omniprésence du genre *Bacillus* en juin 2009, pour les raisons déjà évoquées auparavant (résistance de ce type bactérien). Ainsi, il est préférable de s'attarder sur les autres campagnes d'analyses. La flore microbienne est constituée de germes des sols (*Rhizobium radiobacter*, *Alcaligenes sp.*, *Pseudomonas sp.*, etc.) relativement peu diversifiée (un maximum de 7 types bactériens). Cette flore homogène au cours du temps constitue le spectre bactérien de la zone PR5. La représentation en camembert accentue l'omniprésence des *Bacillus* et met également en exergue la faible diversité des espèces identifiées (cf. fig. 73).

Nous pouvons par ailleurs constater que les espèces identifiées fluctuent d'une campagne à l'autre. En effet, excepté les *Bacillus* et *Rhizobium sp.*, les germes apparaissent puis disparaissent au gré des campagnes. Il reste néanmoins difficile de parler d'évolution de la flore puisque peu de germes sont isolés et que ces espèces sont identiques aux germes isolés sur la zone PR4.

Bactéries	5 Juin 2009		13 Octobre 2009		1er Février 2010		29 Avril 2010	
Taux microflore totale (UFC/g de sédiment)	8,07E+07		1,05E+08		8,23E+07		1,50E+07	
Gram -			<i>Rhizobium radiobacter</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Moraxella sp.</i> <i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	6% 15% 6% 8%	<i>Alcaligenes sp.</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Pseudomonas sp.</i> BG- Non Entérobactéries	26% 24% 10% 4%	<i>Rhizobium radiobacter</i> BG- Non Entérobactéries <i>Pasteurella sp.</i> <i>Oligella urethralis</i>	6% 8% 35% 30%
Gram +	<i>Bacillus sp.</i>	100%	<i>Bacillus sp.</i>	65%	<i>Mycobacteriaceae</i> <i>Micrococceae</i> <i>Bacillus sp.</i>	21% 9% 6%	<i>Bacillus sp.</i>	21%

Tableau 6 : espèces bactériennes identifiées au cours des 4 campagnes de prélèvements - Zone PR5

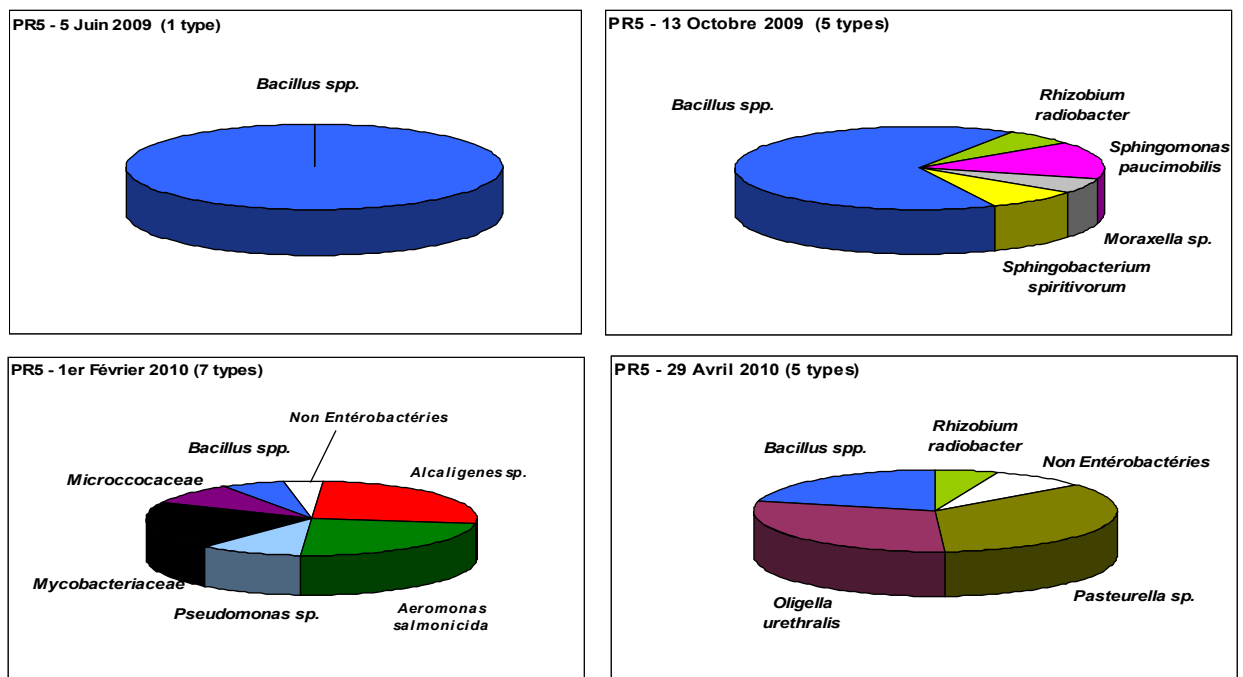


Figure 73 : représentation des espèces bactériennes au cours des 4 campagnes de prélèvements – Zone PR5

✓ **Moisissures**

De même, les moisissures développées sur milieu OGY ont été isolées puis identifiées. Les espèces sont rapportées dans le tableau 7, ainsi que sur la figure 74.

Comme nous l'avons déjà constaté pour l'ensemble des campagnes, le taux de spores ( $7,6 \cdot 10^4$  UFC/g) ainsi que le nombre d'espèces est plus faible en juin 2009. Les espèces identifiées (*Fusarium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Verticillium sp.* et *Penicillium sp.*) sont des germes du sol. À partir du deuxième prélèvement (octobre 2009), le genre *Acremonium* apparaît et conserve la prédominance sur les autres espèces au cours des deux dernières analyses. Il est également important de souligner la diversification des espèces au sein de ce genre avec le développement de 4 espèces différentes d'*Acremonium* en février 2010. De même, plusieurs espèces de *Fusarium* ont également été identifiées.

Pour conclure, la flore reste toutefois peu diversifiée, puisque le nombre de genres oscille entre 4 et 7 - seules les espèces se diversifient dans le temps. Enfin, les camemberts mettent en évidence la prédominance du genre *Acremonium* et *Ulocladium*, deux espèces dont les colonies sont de couleur noire.

Moisissures	5 Juin 2009	13 Octobre 2009	1er Février 2010	29 Avril 2010
Taux (en UFC/g de sédiment)	7,60E+04	2,23E+05	4,07E+06	6,73E+05
Espèces	<i>Fusarium sp.</i> 45% <i>Cladosporium sp.</i> 10% <i>Verticillium sp.</i> 35%  <i>Penicillium sp.</i> 10%	<i>Fusarium sp.</i> 8% <i>Cladosporium sp.</i> 2% <i>Verticillium sp.</i> 8% <i>Acremonium sp.</i> 42% <i>Ulocladium sp.</i> 30% <i>Penicillium sp.</i> 5% <i>Gliomastix sp.</i> 5%	<i>Fusarium sp.</i> 4% <i>Cladosporium sp.</i> 1% <i>Verticillium sp.</i> 2% <i>Acremonium sp.1</i> 27% <i>Ulocladium sp.</i> 12%  <i>Acremonium sp.2</i> 38% <i>Acremonium sp.3</i> 15% <i>Acremonium sp.4</i> 1%	<i>Fusarium sp.</i> 1% <i>Cladosporium sp.</i> 2% <i>Acremonium sp.1</i> 44% <i>Ulocladium sp.</i> 18%  <i>Acremonium sp.2</i> 31%  <i>Fusarium solani</i> 3% <i>Fusarium sp.2</i> 1%

Tableau 7 : noms et pourcentages des espèces fongiques identifiées au cours des 4 campagnes de prélèvements – Zone PR5

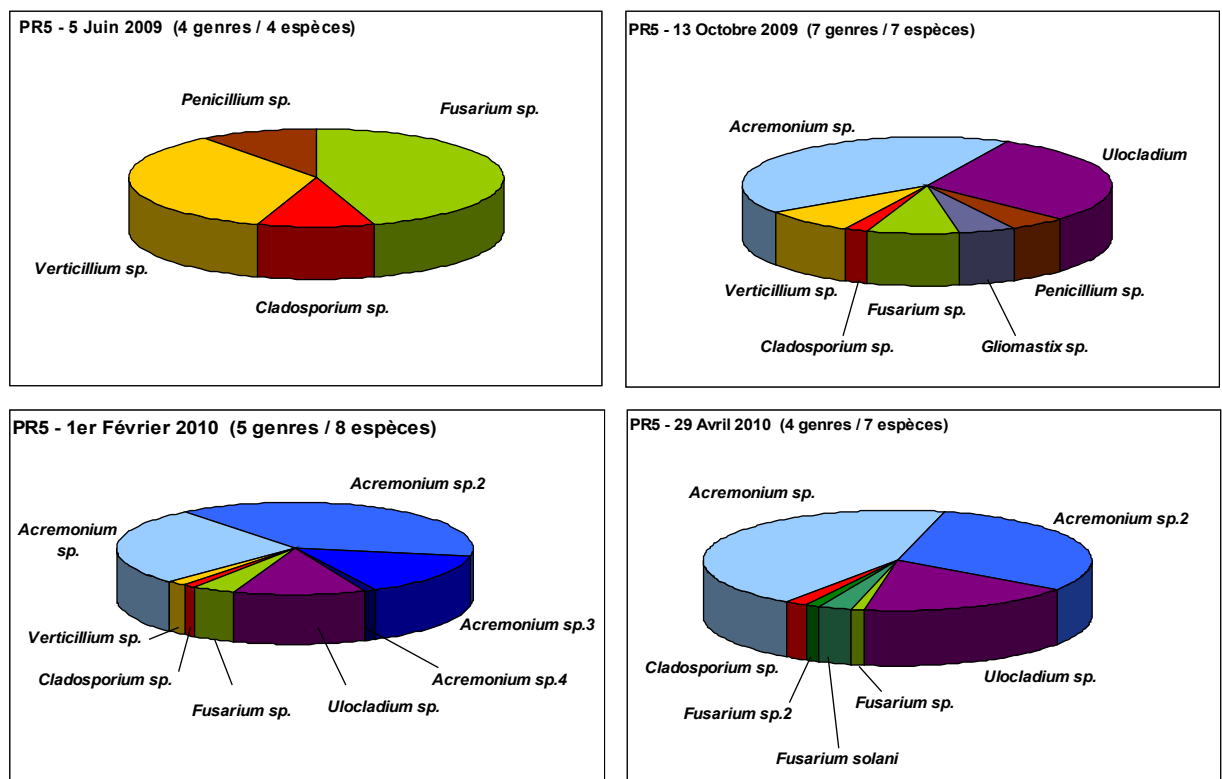


Figure 74 : représentation des espèces fongiques au cours des 4 campagnes de prélèvements – Zone PR5

### 7.2.2.3 - Conclusion sur la zone PR5

La flore microbienne de la zone PR5 est composée de bactéries autotrophes et hétérotrophes et de moisissures, à un taux représentatif des écosystèmes des sols. La flore reste, malgré tout, peu diversifiée, les espèces identifiées (bactéries et moisissures) sont des germes fréquemment rencontrés dans ce type de substrat.

### 7.2.3. - Comparaison des zones PR4 - PR5

À l'origine de ce programme, les deux zones ont été volontairement sélectionnées pour leurs différences notables d'épisodes de colonisation fongique en surface. La mise en relation des données, présentées précédemment de façon séparée sur chaque zone d'étude, va permettre de comparer les spectres microbiens à partir desquels nous tenterons de formuler des hypothèses sur les différences de colonisation de surface actuelles.

#### 7.2.3.1. Comparaison de la microflore hétérotrophe

Les taux relatifs à la numération des flores bactériennes et fongiques sont rappelés sur la figure 75. Pour les deux zones ces taux sont équivalents et demeurent stables au cours du temps. La flore bactérienne est de  $10^8$  UFC/g de sédiment, la flore fongique est comprise entre  $10^5$  et  $10^7$  UFC/g de sédiment. Ces données sont représentatives des analyses couramment effectuées sur les sols.

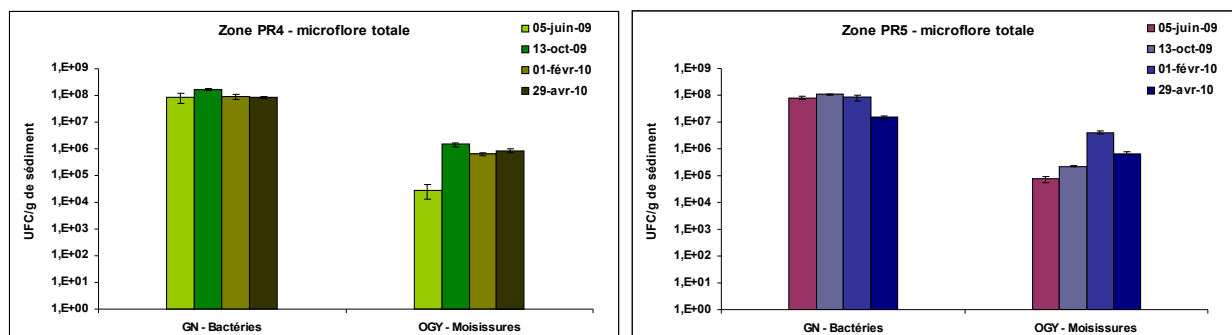


Figure 75 : comparaison de la microflore hétérotrophe pour les zones PR4 (à gauche) et PR5 (à droite)

#### 7.2.3.2 - Comparaison des germes des groupes fonctionnels

Les numérations des germes entrant dans les cycles spécifiques de l'azote et du soufre sont exposées figure 76. Les germes oxydants du fer et du manganèse n'ont pas été reportés sur les graphiques, puisqu'ils ne sont présents qu'à l'état de traces dans le sol, sur les deux zones.

D'une manière générale, les profils sont similaires entre les deux zones, aucune évolution majeure (augmentation ou diminution) n'est constatée dans le temps.

Les germes ammonifiants et dénitrifiants sont sensiblement plus nombreux sur la zone PR4 que PR5, à un facteur 10 près :

- ammonifiants :  $10^8$  UFC/g de sédiment pour PR4 contre  $10^7$  UFC/g de sédiment pour PR5;
- dénitrifiants : valeurs moyennes de  $10^6$  UFC/g de sédiment pour PR4,  $10^5$  UFC/g de sédiment pour PR5.

À l'inverse, les bactéries qui participent à la nitrification – ferments nitreux et nitriques – sont en quantité supérieure sur PR5 que sur PR4. Les germes participant au cycle du soufre sont en proportions égales dans les deux zones, avec la présence d'un pic des oxydants constaté sur les deux zones au même moment, c'est-à-dire en octobre 2009.

Ces résultats mettent en évidence de faibles différences quant aux numérations des différentes communautés bactériennes entre les deux zones. De plus, il est nécessaire d'ajouter qu'aucune évolution en nombre de ces communautés n'est constatée dans le temps pour les deux zones.



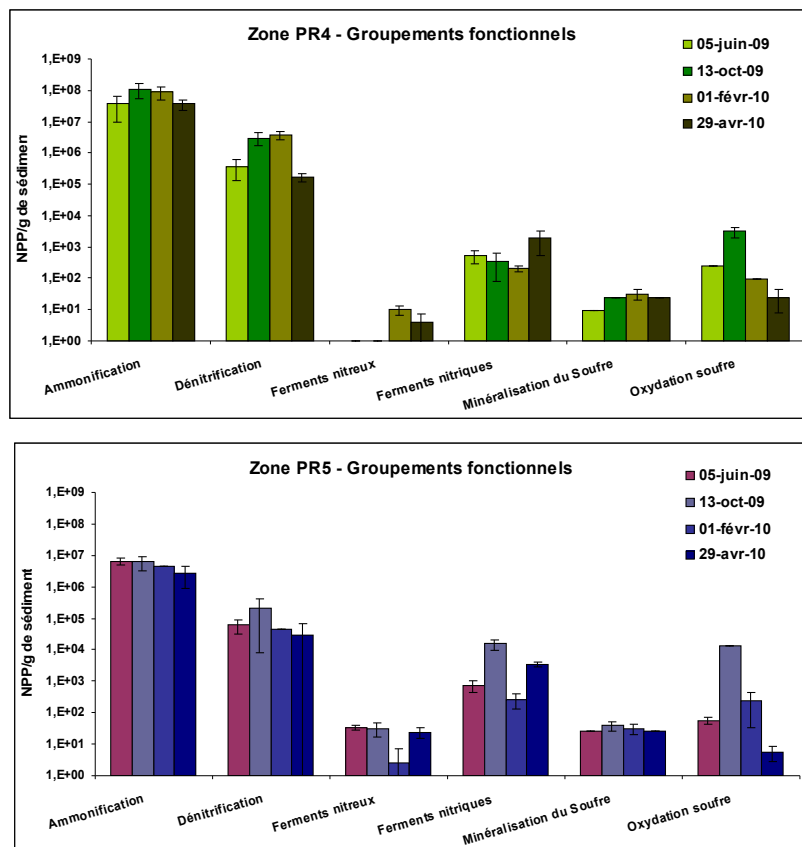


Figure 76 : comparaison des dénombrements des germes participant aux cycles de l'azote et du soufre sur les zones PR4 (en haut) et PR5 (en bas)

### 7.2.3.3 - Comparaison des identifications des bactéries hétérotrophes et moisissures

L'ensemble des espèces identifiées au cours des 4 campagnes de prélèvements a été présenté respectivement pour chacune des deux zones, PR4 et PR5. Ces données nous ont permis d'apprécier l'évolution des espèces (apparition/disparition) dans le temps, pour chaque type de substrats.

Le travail de caractérisation du biotope des deux zones d'étude a été réalisé, d'une part pour évaluer les évolutions en nombre de la flore dans le temps, comme rappelé ci-dessus, mais principalement pour identifier et comparer les espèces bactériennes et fongiques constitutives des deux zones.

**Les espèces bactériennes** recensées pour les 2 zones sont présentées dans le tableau 8 en fonction des dates de prélèvement.

La comparaison des données permet d'énoncer les points suivants :

- les *Bacillus* sont des bactéries communes aux deux zones, présentes au cours des 4 campagnes et particulièrement représentées lors des campagnes de juin 2009 (pour les raisons déjà évoquées) et d'octobre 2009 ;
- le spectre bactérien est plus diversifié sur la zone PR4 que la zone PR5. En effet, le nombre de types bactériens oscille entre 6 et 9, alors qu'il est compris entre 1 et 7, avec une valeur moyenne de 5 types, pour PR5 ;
- la flore bactérienne de la zone PR4 semble plus homogène et constante dans le temps que celle de PR5. Les espèces majoritaires telles que *Rhizobium sp.*, *Ochrobactrum sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Brevundimonas sp.* réapparaissent au cours des différentes campagnes, tandis que les espèces identifiées sur PR5 sont très fluctuantes. En effet, sur cette zone seulement, 2 espèces sont identifiées plusieurs fois (*Bacillus sp.* et *Rhizobium sp.*), les autres espèces n'apparaissent qu'une fois. Même si elles peuvent être qualifiées de nouvelles espèces, lorsqu'elles apparaissent au cours d'une campagne, ces bactéries sont des germes telluriques déjà isolés auparavant dans la grotte ;
- la majorité des espèces identifiées est commune entre les deux zones, même si elles n'ont pas nécessairement été isolées au cours de la même campagne de prélèvements.

En conclusion, la majorité des espèces isolées est présente sur les deux zones, si l'on considère l'ensemble des campagnes de prélèvements, c'est-à-dire l'année d'étude. Les deux spectres bactériens sont donc très similaires. Néanmoins, les résultats mettent en évidence une flore plus diversifiée sur la zone PR4, mais plus stable dans le temps. En effet, les mêmes germes identifiés réapparaissent au cours des différentes campagnes.

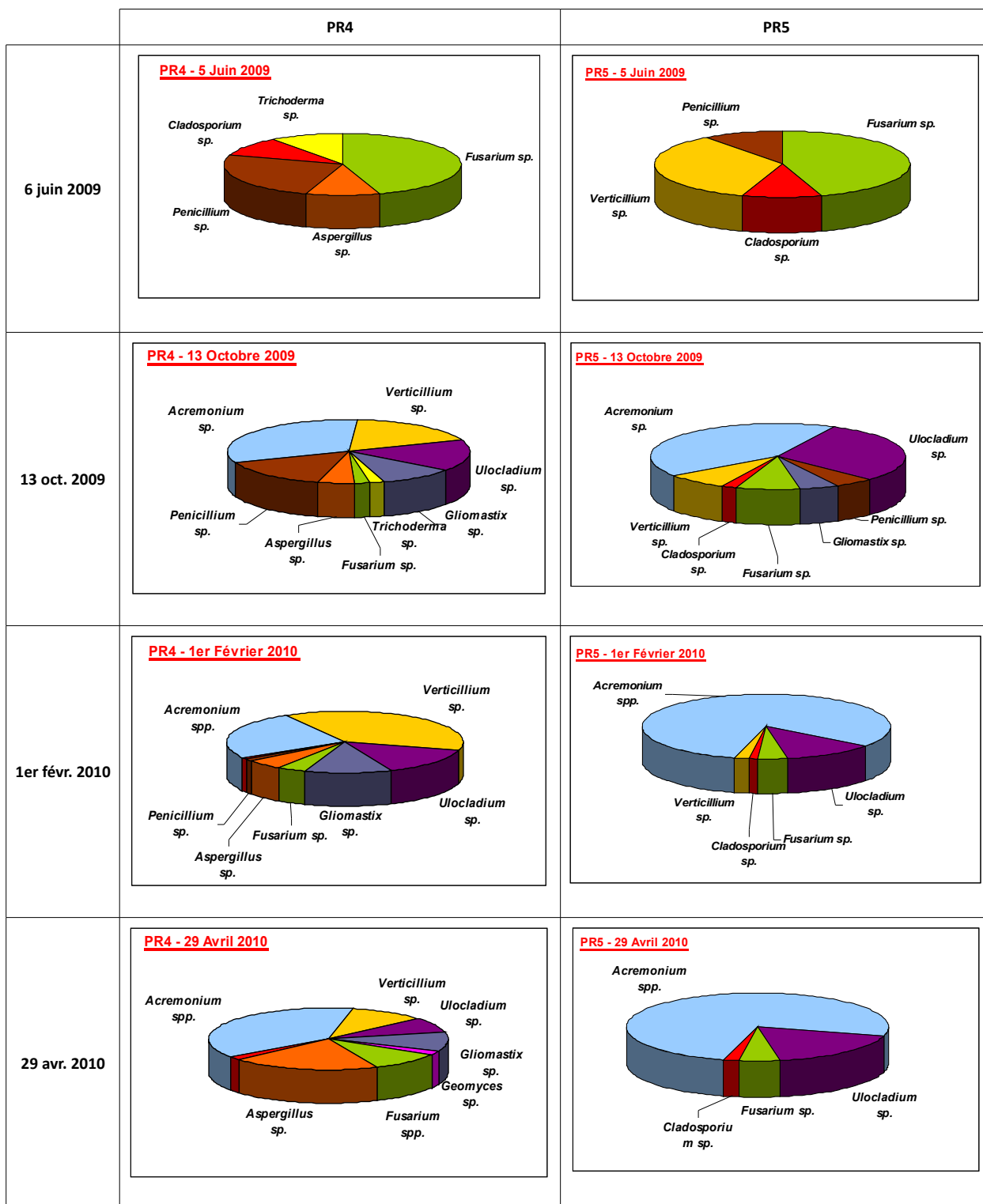
La comparaison des **espèces fongiques** est réalisée de la même manière que pour les bactéries, par la représentation des espèces de chaque zone d'étude pour les 4 périodes, dans le tableau 9. Les principales conclusions résultant de l'analyse du tableau sont :

- en juin 2009, les deux zones présentent les mêmes espèces dominantes. Il s'agit des genres *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.* et *Fusarium sp.*, fréquemment rencontrés dans les sols, à l'exemple des autres germes recensés (*Trichoderma sp.* et *Verticillium sp.*) ;
- en octobre 2009, le genre *Acremonium* apparaît sur les deux zones avec une forte prédominance sur les autres espèces identifiées. Le nombre de genres isolés est supérieur par rapport au mois de juin et peut être expliqué par le retard des premières analyses et la perte de matière vivante associée. Néanmoins, sur l'ensemble des moisissures, 6 genres sont communs entre les deux zones, pour ce prélèvement et les genres sont les mêmes qu'au mois de juin ;
- les espèces isolées au cours des deux dernières campagnes de prélèvement sont identiques aux précédentes. Toutefois la diversité des genres diminue sur la zone PR5, phénomène renforcé par la prédominance du genre *Acremonium* qui représente plus de 75% de la flore fongique. Sur la zone PR4, la diversité reste stable, les espèces sont similaires au cours du temps et restent en proportions relativement homogènes, avec toutefois une forte présence du genre *Acremonium* ;
- sur les deux zones, nous avons pu précédemment constater une diversification des espèces d'*Acremonium* et *Fusarium* en février et en octobre 2010. Pour simplifier la lecture du tableau, nous avons regroupé l'ensemble des espèces du même genre sous le même nom, désormais indiqué par la marque du pluriel *spp.* (qui signifie plusieurs espèces du genre).

Pour conclure, la flore fongique est plus diversifiée sur la zone PR4 que PR5, qui présente au cours du temps, une prédominance du genre *Acremonium*. Néanmoins, la totalité des espèces identifiées sur PR5 a également été retrouvée sur la zone PR4. Les microflores sont donc relativement proches entre les deux zones.

	PR4	PR5
6 juin 2009	<p>PR4 - 5 Juin 2009 (6 types)</p>	<p>PR5 - 5 Juin 2009 (1 type)</p>
13 oct. 2009	<p>PR4 - 13 Octobre 2009 (7 types)</p>	<p>PR5 - 13 Octobre 2009 (5 types)</p>
1er févr. 2010	<p>PR4 - 1er Février 2010 (7 types)</p>	<p>PR5 - 1er Février 2010 (7 types)</p>
29 avr. 2010	<p>PR4 - 29 Avril 2010 (9 types)</p>	<p>PR5 - 29 Avril 2010 (5 types)</p>

Tableau 8 : comparaison des espèces bactériennes identifiées sur les zones PR4 et PR5 en fonction au cours des 4 campagnes de prélèvements



**Tableau 9** : comparaison des espèces fongiques identifiées sur les zones PR4 et PR5 en fonction au cours des 4 campagnes de prélèvements

La mise en relation des espèces isolées sur PR4 et PR5 met en évidence une flore similaire et stable au cours du temps. La caractérisation du biotope repose sur les résultats obtenus au cours des 4 campagnes de prélèvements qui reflètent une année d'étude. D'un point de vue microbiologique, il est difficile, compte tenu des profils obtenus, de parler d'évolution de la flore sur une seule année d'investigations. D'une part, les résultats ne montrent aucune variation significative, ni en nombre, ni en espèces, et d'autre part les apparitions/disparitions d'espèces entre les prélèvements ne peuvent pas être automatiquement attribuées à une modification du biotope mais expliquées par les points suivants :

- même si l'échantillonnage des zones est répété à l'identique au cours des campagnes, les espèces présentes dans le sol sont disséminés de façon aléatoire. Les germes peuvent être sur-représentés sur certaines zones et inversement ;
- les germes cultivables ne représentent, selon la littérature, qu'environ 1% des germes présents. Les milieux nutritifs sont sélectionnés pour favoriser la croissance des germes. Certaines espèces, plus exigeantes, peuvent être sous-représentées lors de certaines campagnes ;
- l'identification des bactéries repose sur des étapes de repiquage des souches qui permettent l'obtention de cultures pures. Lors de ces différents repiquages, certaines espèces, difficiles à cultiver, ne se développent que très peu sur milieu, ne permettant pas d'obtenir une culture assez riche pour l'identification finale.

Par conséquent, il semble difficile de comparer les résultats d'une période à l'autre, nous pouvons donc considérer que ces analyses ne nous ont pas permis de statuer sur une évolution de la microflore au cours du temps, mais définissent la **carte d'identité microbienne** de chaque zone.

Si l'on compare l'ensemble des germes identifiés au cours de l'année sur PR4 et PR5 nous obtenons le tableau 10.

Bactéries		Moisissures	
PR4	PR5	PR4	PR5
<i>Rhizobium radiobacter</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>		
<i>Ochrobactrum anthropi</i>		<i>Aspergillus sp.</i>	
<i>Brevundimonas diminuta</i>		<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>
<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Verticillium sp.</i>	<i>Verticillium sp.</i>
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Ulocladium sp.</i>	<i>Ulocladium sp.</i>
<i>Stenotrophomas maltophila</i>		<i>Gliomastix sp.</i>	<i>Gliomastix sp.</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>		<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>Pasteurella sp.</i>	<i>Pasteurella sp.</i>		<i>Fusarium sp.2</i>
<i>Oligella urethralis</i>	<i>Oligella urethralis</i>	<i>Geomyces sp.</i>	
<i>Moraxella sp.</i>	<i>Moraxella sp.</i>	<i>Acremonium sp.</i>	<i>Acremonium sp.</i>
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Acremonium sp. 2</i>	<i>Acremonium sp.2</i>
Non Entérobactéries	Non Entérobactéries		<i>Acremonium sp.3</i>
Micrococccaeae	Micrococccaeae		<i>Acremonium sp. 4</i>
Mycobacteriaceae	Mycobacteriaceae		

**Tableau 10** : comparaison des espèces bactériennes (à gauche) et fongiques (à droite) identifiées au cours de l'année sur les zones PR4 et PR5

La lecture de ces tableaux met en évidence la similarité des flores fongiques et bactériennes entre les deux zones. En calculant le nombre d'espèces retrouvées sur PR4 et sur PR5, nous obtenons un pourcentage de similitude de 70%. Nous pouvons donc considérer que les deux zones présentent une flore très proche.

### 7.3 - CONCLUSION

Les résultats obtenus à partir des 4 campagnes de prélèvements ont permis de dénombrer et d'identifier les communautés microbiennes des deux zones d'étude. Celles-ci sont présentes en même nombre dans les deux zones, et les taux sont stables au cours du temps. Ainsi, la flore constitutive de la zone PR4, visuellement non colonisée est aussi riche en nombre que celle de PR5. De plus, les identifications ont mis en évidence 70 % de similarité entre les espèces, et dressent la liste des espèces cultivables constitutives des zones PR4 et PR5.

### L.R.M.H. - Pôle "Microbiologie"

Outre l'impact de l'état hydrique des supports, le développement des microorganismes nécessite la présence d'éléments nutritifs contenus dans les substrats ou véhiculés par les solutions. La source de ces apports est le sol extérieur, système biologique qui intègre en permanence les matières organiques mortes comme les débris végétaux (feuilles, tiges, racines) ou animaux (déjections, cadavres).

Cette matière organique initiale va être décomposée par les petits animaux comme les lombrics ou par les microorganismes (champignons, bactéries), ce qui va former les matières humiques pouvant potentiellement être entraînées par les eaux d'infiltrations jusqu'à la surface des parois de la cavité.

Ces substances humiques dont la structure moléculaire est encore largement inconnue sont essentiellement composées de carbone, oxygène et azote sous forme de peptides simples, acides aminés, acides gras et sucres simples. Généralement la matière organique est caractérisée par la détermination du rapport C/N et par la distinction des groupes de substances (types lignine, cellulose, hémicellulose, fraction soluble et minérale).

Ces dosages globaux ont été réalisés avec une fréquence similaire à celle des autres prélèvements et sur les mêmes zones référence.

#### 8.1 - MÉTHODE

Les dosages des taux du carbone et d'azote organiques ont été réalisés par le Laboratoire de Chimie des eaux de l'université de Franche-Comté. Ce laboratoire est accrédité COFRAC (Comité français d'accréditation).

Le rapport  $C_{ot} / N_{ot}$  (Carbone organique total/Azote organique total) est un indicateur de la richesse en matière organique du sol.

##### 8.1.1 - Extraction et dosage de l'azote soluble, insoluble et total

L'azote insoluble et l'azote total sont dosés suivant les procédures de Kjeldahl, dont est déduite la teneur en azote soluble. Les composés azotés des échantillons secs en poudre sont minéralisés à l'aide d'acide sulfurique concentré, contenant une concentration élevée de potassium (ce qui permet d'élever le point d'ébullition du mélange) et en présence de sélénium (catalyseur), pour former du sulfate d'ammonium. L'azote est ensuite libéré sous forme d'ammoniac, par l'ajout de soude concentrée, puis distillé dans une solution d'acide borique indicateur.

Un dosage par titration permet de déterminer la quantité d'ammoniac, à l'aide d'acide sulfurique. Les résultats sont exprimés en mg d'azote par kg de matière sèche. Trois répétitions sont effectuées par échantillon.

##### 8.1.2 - Détermination de la teneur en carbone organique total (COT)

Les analyses sont réalisées avec un analyseur (COT mètre, Shimadzu) à partir de poudre sèche qui est carbonisée à 200°C. L'appareil donne directement la masse de carbone organique total exprimée en mg par kg de matière sèche de l'échantillon. Pour chaque échantillon trois répétitions sont effectuées.

##### 8.1.3 - Dosages des ions nitrates, sulfates et chlorures

Les échantillons d'argile ont subi une lixiviation à l'eau pure pendant 24 heures pour en extraire les différents éléments. Le dosage de ces derniers a été réalisé par chromatographie ionique.

## 8.2 - Résultats

### 8.2.1 - Dosages C et N ; rapport C/N

Les dosages des taux d'azote et de carbone organiques totaux sont présentés sur la figure 77. Ils sont exprimés en mg/kg de masse sèche, pour chaque zone - en bleu pour la zone PR4, en orange pour PR5 – et pour chaque date de prélèvement. La première analyse (en juin 2009) n'ayant pas été répétée 3 fois en raison du manque de matière, ne présente pas d'écart-type. Le taux d'azote est constant pour les deux zones au cours du temps, la valeur moyenne est de 500 mg /kg de masse sèche.

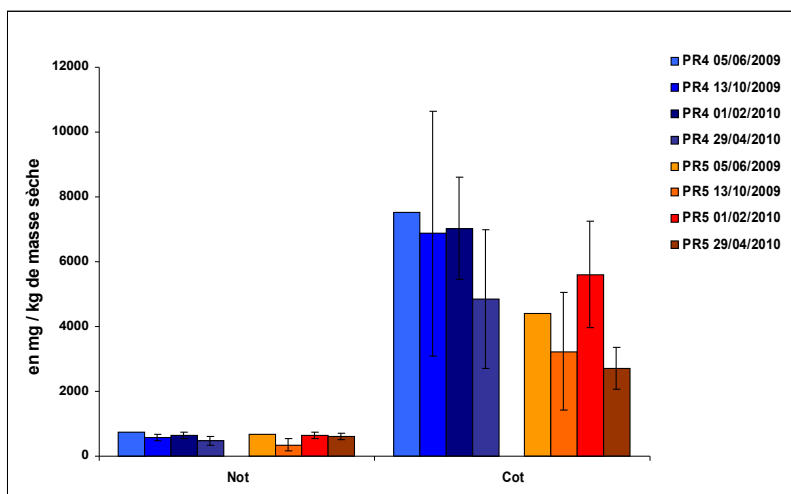


Figure 77 : dosages de l'azote organique total et du carbone organique total sur les zones PR4 et PR5 pour les 4 campagnes de prélèvements

Le taux de carbone mesuré est plus hétérogène, mais non significativement différent entre les différentes campagnes sur une même zone. Toutefois, nous pouvons constater que le taux est plus faible sur PR5 que sur PR4.

Dans le domaine agricole, le rapport C/N ou rapport carbone sur azote est un indicateur qui permet de juger du degré d'évolution de la matière organique, c'est-à-dire de son aptitude à se décomposer plus ou moins rapidement dans le sol. De nombreux auteurs citent un rapport C/N de 15 à 30 comme idéal et correspondant à un sol sain dans lequel la vie microbienne est active. Pour exemple, le rapport C/N est très élevé pour la matière végétale fraîche (50 à 150 pour la paille) et diminue tout au long de sa décomposition en se stabilisant autour de 10 pour l'humus.

Dans ce projet nous avons formulé l'idée de doser les taux de carbone et azote organiques pour tenter de déterminer un seuil à partir duquel les champignons pourraient se manifester à la surface du substrat. Nous avons donc suivi l'évolution dans le temps du rapport C/N.

Ces rapports, calculés pour chaque prélèvement, sont présentés dans le tableau 11. Sur la zone PR4, le rapport est constant dans le temps et est proche de 10. Le rapport obtenu sur la zone PR5 est plus fluctuant (entre 4 et 9).

	5 Juin 2009	13 Octobre 2009	1 <sup>er</sup> Février 2010	29 Avril 2010
PR4	9,92	11,22 ± 4,12	10,88 ± 0,71	9,85 ± 1,69
PR5	6,65	9,46 ± 0,07	8,66 ± 0,97	4,35 ± 0,81

Tableau 11 : comparaison des rapports C/N entre PR4 et PR5 pour les 4 prélèvements

Globalement les rapports C/N sont plutôt bas et sont plus faibles pour PR5 que pour PR4.

Si on se base sur le fait que les surfaces de PR4 et PR5 n'ont pas évolué visuellement au cours de la période d'étude (pas d'apparition notoire de nouvelles colonisations noires) et que les champignons ont besoin de matières carbonées pour se développer, on peut émettre l'hypothèse qu'en particulier pour PR5, le rapport C/N est trop faible avec un taux de C organique trop bas pour initier la germination des spores de champignons présentes dans les sédiments.



## 8.2.2 - Dosages des ions sulfates, nitrates et chlorures

À partir des sédiments échantillonnés lors des 4 campagnes de prélèvement, un dosage des ions nitrates, sulfates et chlorures a été réalisé. Les résultats sont présentés sur la figure 78, sous forme d'histogrammes avec les différents taux d'ions en mg/kg de masse sèche, pour chaque prélèvement et pour les deux zones (en bleu PR4 et en orange PR5).

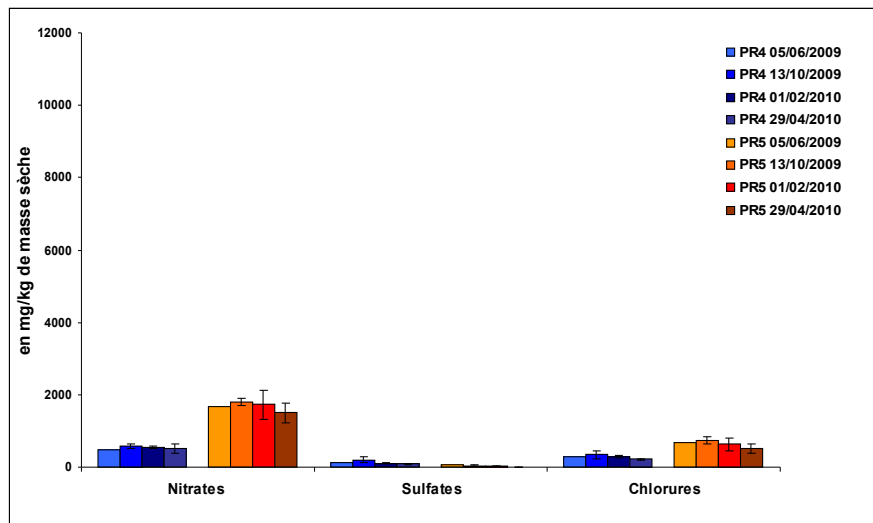


Figure 78 : dosages des ions nitrates, sulfates et chlorures sur les zones PR4 et PR5 pour les 4 campagnes de prélèvements

Les résultats mettent en évidence un taux de nitrates et de chlorures trois fois plus élevé sur la zone PR5 que PR4. Les valeurs moyennes pour le dosage des nitrates sur l'année sont respectivement de 1676 et 533 mg/kg de masse sèche, ceux des ions chlorures étant de 281 et 648 mg / kg de masse sèche. Néanmoins, sur une même zone d'étude, ces taux sont relativement stables au cours du temps, aucune différence significative n'est constatée. Les ions sulfates sont présents à des taux très faibles sur les deux zones d'étude, et constants dans le temps.

Les différences constatées entre les deux zones peuvent être expliquées par la nature des deux substrats et leur composition en argiles. En effet, les argiles ont une très grande capacité de fixation des ions, ils sont donc davantage présents sur PR5 qui est composé à 70 % d'argiles contre 30% sur la zone PR4.

Rapportés en pourcentage, les taux des différents ions dosés restent à des valeurs très faibles dont les moyennes sont indiquées dans le tableau 12.

	PR4	PR5
Nitrates	0,05 %	0,18 %
Sulfates	0,02 %	0,004 %
Chlorures	0,03 %	0,07 %

Tableau 12 : pourcentage des ions nitrates, sulfates, chlorures

## 8.3 - CONCLUSION

La détermination des taux d'azote et de carbone organique a permis d'évaluer la richesse du sol en matière organique. Les taux de carbone et azote organiques sont faibles et apparemment pas propices au développement des champignons. Les dosages des ions ont mis en évidence des différences entre les deux zones, malgré des taux très faibles. Les ions nitrates et chlorures sont retrouvés en plus grande proportion dans la zone PR5, zone constituée d'argiles qui fixent facilement les ions. Ces résultats nous apportent une connaissance supplémentaire sur la composition des deux sédiments constitutifs des zones.

Nous nous sommes attachés à réaliser un inventaire des communautés microbiennes, en faisant appel à deux approches moléculaires complémentaires. À partir de prélèvements de « substrat » à la surface de la roche, nous avons extraits l'ADN total puis réalisé (i) l'identification des bactéries et champignons par la technique de clonage et séquençage (ii) l'analyse de la structure des communautés fongiques et bactérienne par une méthode de T-RFLP. Cette dernière approche permet de comparer la structure des communautés microbiennes et de suivre leur évolution au cours du temps, sans nécessiter l'identification des microorganismes.

## 9.1 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 9.1.1 - Échantillonnage

La collecte des échantillons analysés a eu lieu en juin 2009 puis octobre 2009 et février 2010 à la surface des zones PR4 et PR5 choisies en concertation avec les groupes de travail du LMRH et du CNR-ISAC. Ils correspondent à des prélèvements de trois répétitions de plus ou moins un gramme de substrat terreux. Les prélèvements effectués par l'équipe du LMRH ont été envoyés par voie postale.

### 9.1.2 - Extraction et purification de l'ADN

Des méthodes basées sur l'extraction de l'ADN ont été utilisées pour comparer la structure des communautés. Comme décrit dans le rapport 2007-2008 pour les zones PR1, 2 et 3, nous avons donc mis au point une méthode permettant l'analyse d'échantillons de 50 mg de substrat terreux.

Quatre billes de 2mm et 0,3 g de billes de 106µm de diamètre sont ajoutées à 50 mg d'échantillon. Puis, 192 µl de solution de lyse composée de 4 µl de SDS (0,01%), de 4 µl de DTT (200mM), 184 µl d'eau stérile, sont ajoutés à la préparation. Une bonne homogénéisation puis une série de chocs thermiques (3 cycles de : 40 secondes dans l'azote liquide suivies de 4 minutes dans un bain-marie à 55°C) provoque la lyse des cellules. 4 µl de protéinase K (10 µg/ml), 4 µl de lysozyme (50 µg/ml) sont ajoutés à la solution de lyse. Une incubation d'une heure à 55°C est nécessaire à l'action des deux enzymes. L'incubation à haute température (5 minutes à 90°C) provoque la désactivation des enzymes. L'ADN dans le surnageant est récupéré par centrifugation et stocké dans un tube Eppendorf stérile. Une étape de purification des extraits sur des colonnes de PVPP (Polyvinyl-poly pyrrolidone, Sigma P6755, produit utilisé selon les recommandations du fabricant) puis par le kit GeneClean Turbo (Q-BIOgen, utilisé selon les recommandations du fabricant) est ensuite réalisée (Bastian *et al.* 2009a).

### 9.1.3 - Identification des champignons et des bactéries par la technique de clonage et séquençage de l'ADNr

#### 9.1.3.1 - Amplification par PCR des gènes 18S et 16S codant la petite sous-unité d'ARN ribosomique (SSU ADNr) pour les champignons et les bactéries respectivement

L'ADN total de chaque échantillon est amplifié à l'aide des amorces universelles suivantes :

- 817 et 1536 pour l'amplification du gène 18S de champignon (Borneman *et al.* 2000),
- 1492R et 27F pour l'amplification du gène 16S de bactérie (Amann *et al.* 1995).

Pour les champignons le volume final est de 25 µl de produits de PCR. Le mélange est réalisé avec 13,80 µl d'eau (ultra-pure), 2,5 µl de tampon de *Taq* polymérase 10X (avec MgCl<sub>2</sub>), 2 µl de dNTP (à une concentration de 2,5 mM), 0,65 µl d'amorce 817F (à une concentration de 10 µmoles/µl), 0,65 microlitres d'amorce 1536R (à une concentration de 10 µmoles/µl), 0,4 µl de *Taq* polymérase (Q-BIOgene, Evry, France) et 5 µl d'ADN extrait et purifié.

Pour les bactéries le volume final est de 50 µl de produits de PCR. Le mélange est réalisé avec 29 µl d'eau (ultra-pure), 5 µl de tampon de *Taq* polymérase 10X (avec MgCl<sub>2</sub>), 0,4 µl de dNTP (à une concentration de 25 mM), 2,5 µl d'amorce 27F (à une concentration de 10 µmoles/µl), 2,5 microlitres d'amorce 1492R (à une concentration de 10 µmoles/µl), 0,18 µl de *Taq* polymérase (Q-BIOgene, Evry, France) et 10 µl d'ADN extrait et purifié.

La vérification de l'efficacité de la PCR s'effectue sur un gel d'agarose à 1%, en déposant 2µl de produits comparativement au marqueur de taille *Smart Ladder* (Eurogentec, Seraing, Belgique).

#### 9.1.3.2 - Ligation

Les produits de PCR des séquences 18S ou 16S sont introduits par ligation dans des plasmides vecteurs (kit pGEM-T easy vector system II, Promega).

Pour un échantillon, le volume final de la réaction est de 10 µl et le mélange se compose du tampon *2X Rapid Ligation Buffer* (5 µl), du vecteur plasmidique *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector* (1 µl, à une concentration de 50ng/µl), des produits de PCR SSU ADNr 16S ou 18S (3 µl) et la *T4 DNA Ligase* (1 µl, à une concentration de 3 unités Weiss/µl). Le mélange de ligation est incubé pendant au moins deux heures à température ambiante. La cinétique de réaction est de 80% en une heure. Trois microlitres de produit de ligation sont utilisés pour la transformation, le surplus est stocké à 4°C et peut être réutilisé dans le cas d'un faible rendement de clonage.

#### 9.1.3.3 - Transformation

Les trois microlitres de produit de ligation sont ajoutés à un volume de 50 µl de cellules compétentes JM109 (Promega corporation, Madison, WI, USA) selon les recommandations du fournisseur. Après 20 minutes d'incubation dans la glace, un choc thermique de 45 secondes à 42°C et 5 minutes dans la glace permet l'incorporation des vecteurs plasmidiques aux cellules compétentes. Puis, 950 µl de LB (pour Luria-Broth) sont ajoutés à la préparation, qui est ensuite mise à incuber pendant 90 minutes à 37°C, sous agitation constante (150 tours par minute).

Le mélange obtenu pendant la phase de transformation est mis en culture sur des boîtes de milieu gélosé LB (pour Luria-Broth) complétement d'ampicilline (100 µg/ml), d'IPTG (Isopropylβ-D-1-thiogalactopyranoside, inducteur de l'activité de la β-galactosidase, 0,5 mM) et de X-Gal (80 µg/ml) substrat de la β-galactosidase. Ces inocula sont cultivés à 37°C pendant 24 heures. La résistance à l'ampicilline et la désactivation de l'opéron *LacZ* permettent une discrimination simple et rapide des clones. Les bactéries ayant incorporé la séquence d'intérêt apparaissent blanches en culture, alors que les autres cellules apparaissent bleues. Les colonies blanches sont repiquées sur une nouvelle boîte, permettant de purifier les clones.

Les clones sont mis en suspension dans 200 µl d'eau filtrée stérile. Un choc thermique (trois cycle : 4 minutes à 90°C, puis 40 secondes dans l'azote liquide) provoque la lyse des cellules, puis une centrifugation (10000 g, 2 minutes) permet la séparation du mélange en deux phases distinctes. L'ADN dans le surnageant est récupéré dans un tube Eppendorf stérile. Une PCR est réalisée à l'aide des amorces SP6 (GATTTAGGTGACACTATAG) et T7 (AATACGACTCACTATAG) qui s'hybrident sur le vecteur de clonage. Le séquençage est réalisé par une entreprise indépendante (*Beckman Coulter Genomics*) à partir de l'amorce T7. Les séquences obtenues sont comparées par alignement avec celles référencées dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) grâce au logiciel BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)).

### 9.1.4 - Analyse du polymorphisme de longueur des fragments terminaux de restriction (T-RFLP)

#### 9.1.4.1 - Amplification de la SSU ADNr 18S

Chaque échantillon d'ADN total est amplifié comme indiqué précédemment, mais en utilisant l'amorce nu-SSU-0817-5' (F) marquée à l'extrémité 5' par le fluorochrome D3 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Pour chaque échantillon, trois PCR indépendantes sont réalisées.

#### 9.1.4.2 - Digestion

120 ng de produits d'amplification sont digérés avec 1,2 µl d'enzyme de restriction *Msp1* (10 U Weiss/µl ; site de restriction : C'CGG) et 10 µl de tampon correspondant à l'enzyme. Ce mélange est complété avec de l'eau stérile pour atteindre un volume final de 100 µl. Cette réaction dure très précisément trois heures à une température constante de 37° C. Les produits de digestion sont précipités par 2 µl de glycogène (2,5 µg/µl) et 10 µl d'acétate de sodium (3 M pH 5,2). Une centrifugation (15000 g, 4° C, 15 minutes) permet d'éliminer le surnageant. Un lavage à l'éthanol à 70° (200 µl) et une centrifugation (15000 g, 4°C, 5 minutes) sont pratiqués deux fois. Le surnageant est à chaque fois éliminé. Puis, le culot ainsi formé est séché à l'air libre. Il est repris dans une solution de 63 µl de SLS (pour *Sample Loading Solution*, Beckman Coulter). Enfin, l'ajout d'un mélange d'un volume de 30 µl, composé de 1,2 µl de standard de taille (Size Standard 600, Beckman Coulter) et de 28,8 µl de SLS, porte le volume final de la solution à 93 µl.

#### 9.1.4.3 - Analyse des fragments terminaux de restriction (T-RFs)

Le volume de 93 µl est équitablement réparti dans trois puits d'une plaque de séquenceur à capillaires (CEQ™ 2000XL, Beckman Coulter). Cette analyse est pratiquée selon la méthode *Frag4-30s-70min*, incluant (i) une dénaturation initiale de 2 minutes à 90° C, (ii) une injection à 2000 Volts pendant 30 secondes et (iii) une séparation à 4800 Volts pendant 70 minutes dans de l'acrylamide. Après l'électrophorèse, la longueur et l'intensité du signal fluorescent des fragments terminaux marqués (Abrégé : T-RFs en anglais) sont automatiquement calculés par comparaison avec le fluorochrome standard. Le logiciel *CEQ 2000XL DNA analysis system (version 4.3.9.)* est utilisé dans ce but. Pour être pris en compte, les pics doivent avoir à leur base une pente supérieure ou égale à 5%, ainsi qu'une hauteur supérieure ou égale à 2% de celle du deuxième pic le plus haut. La taille des fragments est calculée avec la méthode de régression *Local Southern*.

Les fragments compris entre 60 et 640 paires de bases, correspondant à la gamme de taille du standard, sont analysés. L'intensité correspondant à chaque pic est divisée par la fluorescence totale du profil. La fluorescence totale de chaque profil pouvant pour des raisons techniques, varier de façon importante entre les profils, cette étape est nécessaire pour pouvoir comparer les profils sans ce biais. Les analyses montrent que la plupart des fragments terminaux diffèrent de moins de 1 pb entre répliquas. De ce fait, les fragments différant par plus de 1,25 pb sont considérés comme différents. La comparaison de la taille des fragments terminaux entre les échantillons est possible en ordonnant les fragments en catégories discrètes (programme LisAFLP, Mougel *et al.*, 2006). Les communautés, caractérisées par le nombre, la taille des fragments et l'intensité mesurée du fluorochrome pour chaque fragment, sont comparées par une analyse en composantes principales sous le logiciel ade4 (Thioulouse *et al.* 1997). Cette méthode d'analyse assure la transformation linéaire d'un jeu initial de variables en un jeu bien plus restreint de variables indépendantes et non corrélées, appelées composantes principales. La plus grande partie de la variabilité des données de départ est conservée sur les premières composantes principales. Cette caractéristique assure que les plans factoriels représentent au mieux les données initiales. L'ACP permet aussi de représenter les variables dans le plan factoriel, afin de voir quelles variables contribuent le plus à la discrimination des points.

La signification des structures mises en évidence par l'ACP est testée par des tests de Monte Carlo. Ce test consiste en des permutations aléatoires (e.g. 1000 permutations) au sein du jeu de données.

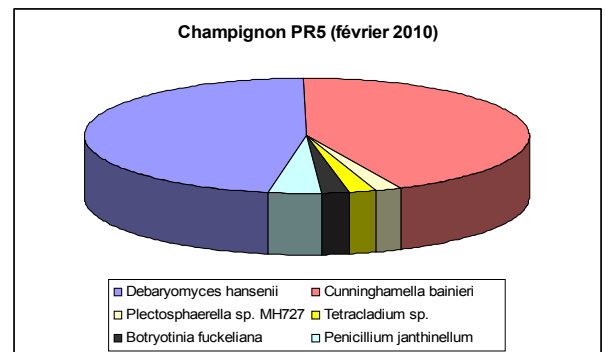
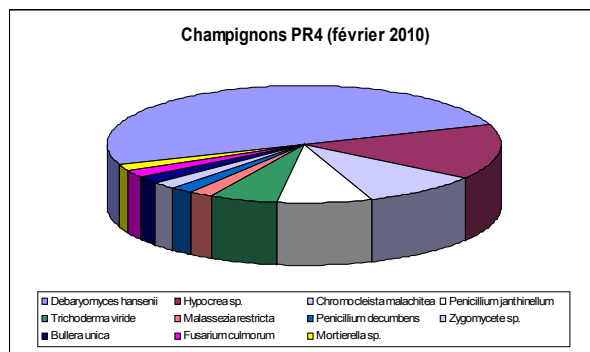
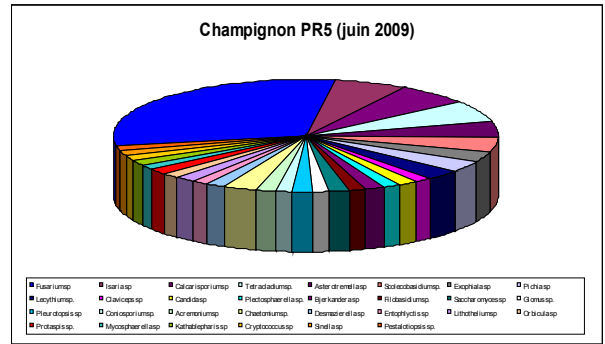
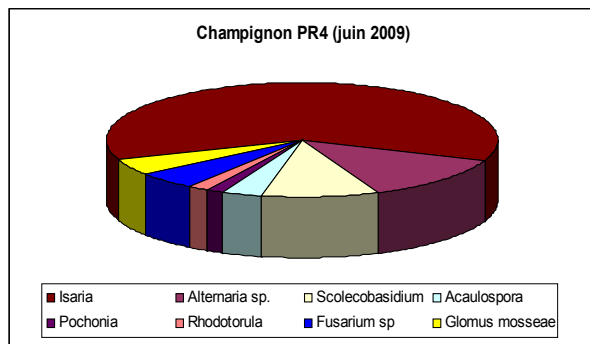
## 9.2 - RÉSULTATS

### 9.2.1 - Identification des champignons par clonage séquençage de l'ADN extrait du substrat

Les protocoles d'extraction d'ADN utilisés ont permis d'obtenir pour tous les échantillons des suspensions d'ADN suffisamment concentrées pour permettre l'amplification par PCR de l'ADNr 18S et 16S (de 8 à 11 ng/µl pour les échantillons extraits à partir de 2 grammes et de 2 à 10 ng/µl pour ceux extraits à partir de 50 milligrammes). Conformément à nos attentes, la taille des fragments amplifiés est d'environ 750 pb pour le fragment 18 S et de 1450 pb pour le fragment 16 S. Après la purification, les amplifiats avaient une concentration suffisante pour réaliser les manipulations nécessaires.

Le tableau 13 synthétise les résultats du séquençage des banques de clones constituées à partir de l'ADN extrait des échantillons prélevés à la surface des zones choisies. Les séquences présentent au minimum 95% d'homologie avec les séquences de la SSU ADNr 18S de phylotypes déjà identifiés et présents dans la base de données du serveur NCBI.

La banque de clones de la zone PR4 réalisée à partir des prélèvements de juin 2009 comprend 62 clones. *Isaria sp.* représente 61% des clones séquencés. Par contre la banque de clones de la zone PR5 réalisée à partir des prélèvements de juin 2009 comprend 66 clones, *Fusarium sp.* est le phylotype le plus représenté des clones séquencés (30%). Mais la différence la plus remarquable porte sur le nombre de phylotypes identifiés : seulement 8 pour la zone PR4 contre une trentaine pour la zone PR5 (cf. fig. 79).



**Figure 79** : genres fongiques identifiés par clonage et séquençage de l'ADN extrait des échantillons prélevés dans les zones PR4 et PR5 en juin 2009 et février 2010

Dans les prélèvements de février 2010, les zones PR4 et PR5 (52 et 51 clones respectivement) présentent le même phylotype dominant à savoir *Debaryomyces hansenii* qui a été isolé à une fréquence de 50 et 49% respectivement. Mais contrairement aux prélèvements de juin 2009, dans la zone PR5 on dénombre uniquement 6 phylotypes pour un total de 51 clones.

	PR4 2009	PR4 2010	PR5 2009	PR5 2010
Acaulospora	2			
Acremonium sp			1	
Alternaria sp.	8			
Asterotremella sp			3	
Bjerkandera sp			1	
Botryotinia fuckeliana				1
Bullera unica		1		
Calcarisporium sp			4	
Candida sp			1	
Chaetomium sp.			2	
Chromocleista malachitea		5		
Claviceps sp			1	
Coniosporium sp.			1	
Cryptococcus sp			1	
Cunninghamella bainieri				22
Debaryomyces hansenii		26		24
Desmazierella sp			1	
Entophlyctis sp			1	
Exophiala sp			2	
Filobasidium sp			1	
Fusarium sp	3	1	20	
Glomus mosseae	3		1	
Hypocrea sp.		8		
Isaria sp	38		4	
Kathablepharis sp			1	
Lecythium sp.			2	
Lithothelium sp			1	
Malassezia restricta		1		
Mortierella sp.		1		
Mycosphaerella sp			1	
Orbicula sp			1	
Penicillium sp		5		2
Pestalotiopsis sp.			1	
Pichia sp			2	
Plectosphaerella sp.			1	1
Pleurotopsis sp			1	
Pochonia	1			
Protaspis sp.			1	
Rhodotorula	1			
Saccharomyces sp			1	
Scolecobasidium sp.	6		3	
Sinella sp			1	
Tetracladium sp.			4	1
Trichoderma viride		3		
Zygomycete sp.		1		

**Tableau 13** : principaux genres fongiques identifiés par clonage et séquençage de l'ADN extrait des échantillons prélevés dans les zones PR4 et PR5 en juin 2009 et février 2010. Les résultats sont présentés en nombre de clones par phylotype

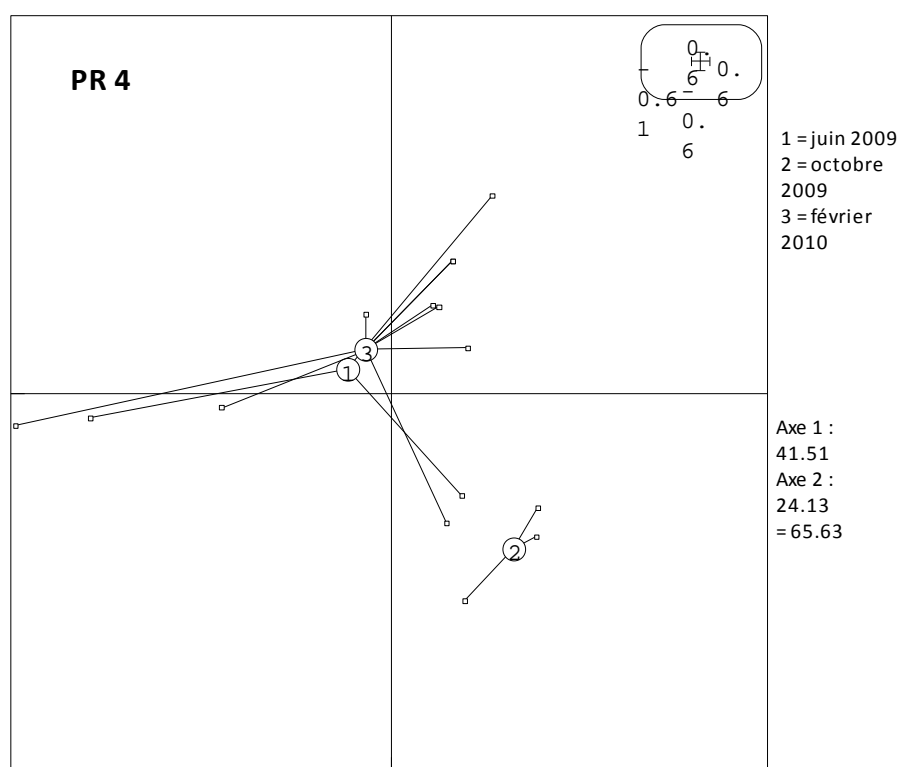
## 9.2.2 - Caractérisation des communautés fongiques par la méthode de T-RFLP

Comme décrit plus haut, cette méthode consiste à comparer les profils RFLP des communautés fongiques après amplification de la séquence 18S. Pour chacun des échantillons, les produits de trois amplifications d'ADNr 18S sont analysés par le séquenceur à capillaires. La migration simultanée de trois répétitions méthodologiques pour chaque amplification porte le nombre total de profils obtenus à 27. La vérification de tous les profils est faite visuellement en s'assurant de la bonne migration du standard de taille. Toutes les répétitions ont donné un profil moléculaire analysable. L'interprétation de ces chromatogrammes se fait par une analyse en composantes principales.

### 9.2.2.1. Analyse en Composantes Principales des résultats de T-RFLP des échantillons prélevés de zone PR4

La figure 80 montre les résultats de l'analyse en composantes principales réalisée à partir des données de T-RFLP de zone PR4. Les deux premiers axes de l'ACP expliquent 65,63% de la variance totale des données. Sur la figure nous distinguons deux groupes de données, le premier correspond au prélèvement d'octobre 2009, le second regroupe les prélèvements de juin 2009 et février 2010. C'est le premier axe qui permet de différencier ces deux groupes.

L'analyse statistique ne confirme pas cette ségrégation. En effet, le test de permutation de Monte Carlo indique qu'il n'existe pas de différence significative au seuil de 5% entre les trois groupes correspondant aux 3 prélèvements effectués.



**Figure 80** : représentation graphique de l'analyse en composantes principales effectuée avec les données de T-RFLP de 18S de PR4 prélevé dans le 2009 et 2010. Les ellipses (formées par les points) représentent les intervalles de confiance à 95%

### 9.2.2.2. Analyse en Composantes Principales des résultats de T-RFLP des échantillons prélevés de PR5

La figure 81 montre les résultats de l'analyse en composantes principales réalisée à partir des données de T-RFLP de la zone PR5. Les deux premiers axes de l'ACP représentent 60,40% de la variance des données. La figure montre 3 groupes distincts. Les valeurs factorielles du prélèvement de février 2010 sont très dispersées, mais sont toutes situées dans l'axe 1.

Le test de permutation de Monte Carlo confirme qu'il n'y a pas de différence significative au seuil de 5% entre les trois groupes correspondant aux 3 prélèvements effectués.



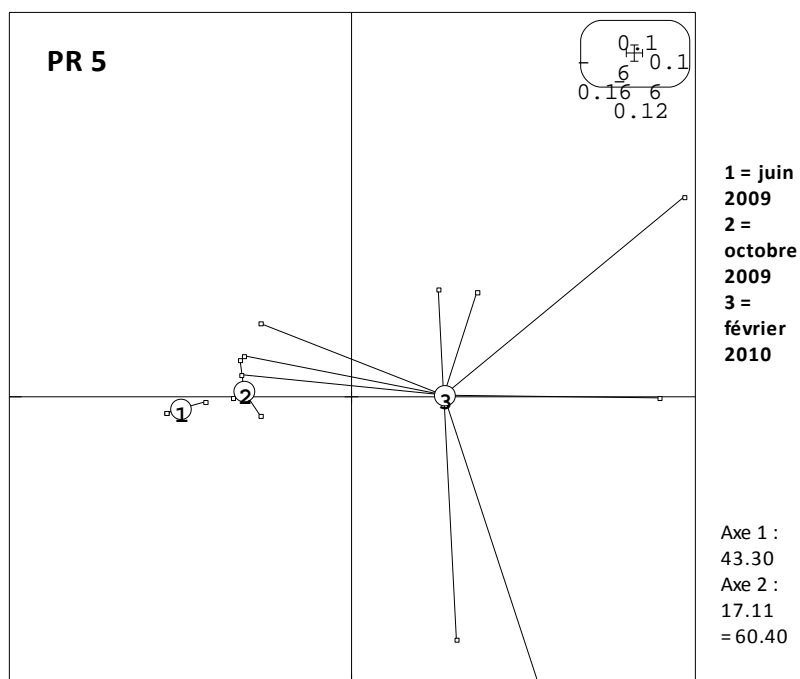


Figure 81 : représentation graphique de l'analyse en composantes principales effectuée avec les données de T-RFLP de 18S des échantillons de la zone PR5 prélevés dans le 2009 et 2010. Les ellipses (formées par les points) représentent les intervalles de confiance de 95%

### 9.2.3 - Identification des bactéries par clonage séquençage de l'ADN extrait du substrat

Le tableau 14 présente les résultats du séquençage des banques de clones constituées à partir de l'ADN extrait des échantillons de substrats issus des zones PR4 et PR5. Les séquences présentent au minimum 95% d'homologie avec les séquences de la SSU ADNr 16S de phylotypes déjà identifiées et présentes dans la base de données du serveur NCBI.

La banque de clones réalisée à partir des prélèvements effectués sur la zone PR4, en juin 2009, comprend 30 clones. *Ralstonia sp.* ne représente que 10% des clones séquencés. Par contre dans la banque de 50 clones réalisée à partir des prélèvements effectués sur la zone PR5, en juin 2009, *Ralstonia sp.* n'est pas détecté. On observe un nombre élevé de phylotypes différents dans les deux zones de prélèvement.

Dans les prélèvements de février 2010, pour les deux zones PR4 et PR5 (30 et 41 clones respectivement) le phylotype *Ralstonia sp.* est dominant avec une fréquence de 70 et 66% respectivement. Mais contrairement aux prélèvements de juin 2009 les deux zones présentent peu de phylotypes différents (cf. fig. 82).

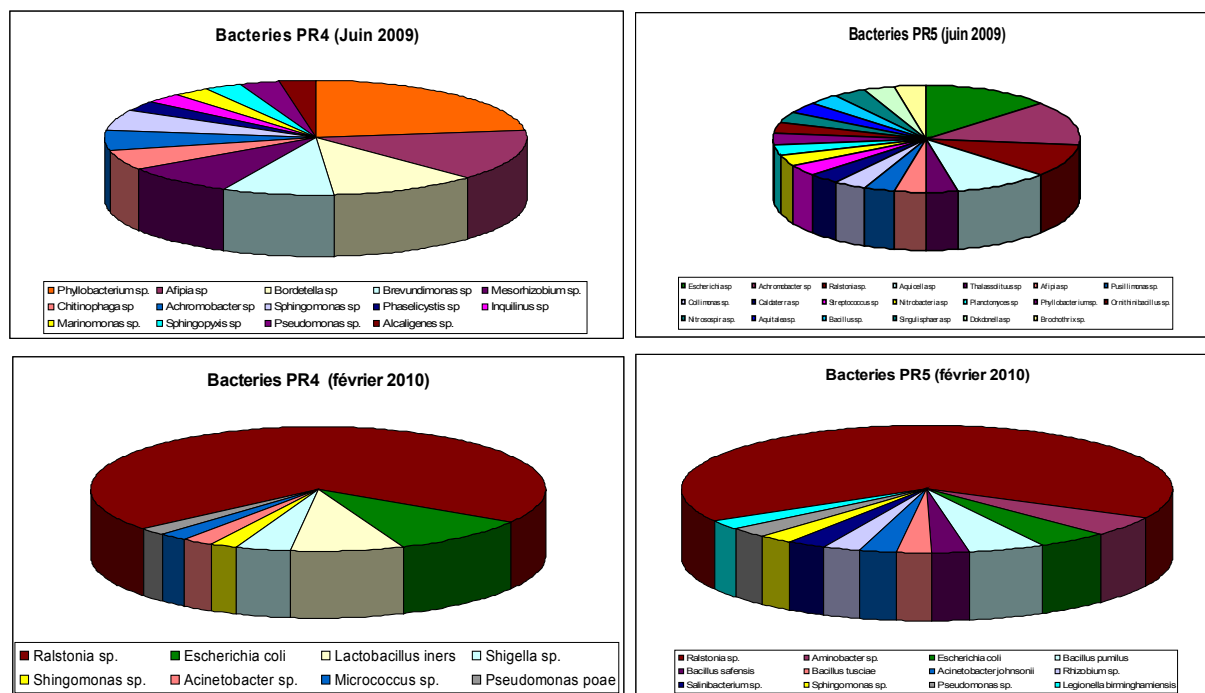


Figure 82 : genres bactériens identifiés par clonage et séquençage de l'ADN extrait des échantillons prélevés dans les zones PR4 et PR5 en juin 2009 et février 2010

	PR4 2009	PR4 2010	PR5 2009	PR5 2010
Achromobacter sp	2		4	
Acinetobacter sp.		1		1
Afipia sp	5		1	
Alcaligenes sp.	1			
Aminobacter sp.				2
Aquicella sp			3	
Aquitalea sp.			1	
Bacillus sp.			1	4
Bordetella sp	4			
Brevundimonas sp	3			
Brochothrix sp.			1	
Caldaterra sp			1	
Chitinophaga sp	2			
Collimonas sp.			1	
Dokdonella sp			1	
Escherichia coli		5	4	2
Inquilinus sp	1			
Lactobacillus sp		4		1
Marinomonas sp.	1			
Mesorhizobium sp.	3			
Micrococcus sp.		1		
Nitrobacteria sp			1	
Nitrosospira sp.			1	
Ornithinibacillus sp.			1	
Phaselicystis sp	1			
Phyllobacterium sp.	8		1	
Planctomyces sp			1	
Pseudomonas sp.	1	1		1
Pusillimonas sp.			1	
Ralstonia sp.		35	3	27
Rhizobium sp.				1
Salinibacterium sp.				1
Shigella sp.		2		
Singulisphaera sp			1	
Sphingomonas sp	2	1		1
Sphingopyxis sp	1			
Streptococcus sp			1	
Thalassolituus sp			1	

**Tableau 14** : principaux genres bactériens identifiés par clonage et séquençage de l'ADN extrait des échantillons prélevés dans les zones PR4 et PR5 en juin 2009 et février 2010. Les résultats sont présentés en nombre de clones par phylotype

### 9.3 - Discussion

L'identification par clonage-séquençage des champignons et des bactéries a permis de caractériser la flore microbienne colonisant les zones PR4 et PR5 retenues pour le projet Microbiologie-Microclimat. Le résultat le plus remarquable concerne le quasi doublement du nombre de phylotypes fongiques et bactériens identifiés dans la zone PR5 entre février et juin 2010.

Les populations fongiques et bactériennes identifiées dans les zones PR4 et PR5 sont représentatives des populations identifiées auparavant dans la grotte de Lascaux (Bastian et al. 2009a et Bastian et al. 2009b).

Par contre, la flore bactérienne de la grotte de Lascaux est différente de celles d'autres grottes (Schabereiter-Gurtner et al. 2002, 2004). Alors que les Acidobacteries et les Actinobacteries sont très communes dans d'autres grottes, elles sont peu représentées à Lascaux où les Proteobacteries dominent alors qu'elles représentent moins de 50% des populations dans d'autres grottes (Zhou et al. 2007). L'analyse de la structure des communautés fongiques par T-RFLP ne montre pas de modification significative de la structure des communautés fongiques des zones PR4 et PR5 au cours du temps.

Dans ce programme, la nature des données acquises est de plusieurs sortes :

- quantitatives (microclimat, analyses d'images, numération microbiennes, rapport C/N ...),
- qualitatives (identification des espèces microbiennes, identification des constituants minéraux ...),
- subjectives (observations visuelles, niveau de compacité des substrats ...).

Dans un tel contexte, une corrélation directe de ces données est *a priori* difficile. C'est pourquoi les différentes informations acquises ont été regroupées dans des tableaux récapitulatifs avec l'idée d'en extraire les tendances majeures. Afin de rendre la gestion des données plus simple, seules celles jugées comme étant les plus significatives ont été retenues.

Les données ont ainsi été séparées en deux groupes :

- les données diachroniques, c'est à dire les données des quatre campagnes de prélèvements,
- les données dynamiques, c'est à dire celles acquises en continu.

Les paramètres du micro-climat et du substrat jugés pertinents pour les deux types de matrices sont :

- les températures de l'air, de la surface de la roche et à 2 cm de profondeur, notées respectivement  $T_{air}$ ,  $T_{surface}$  et  $T_{roche}$ ,
- l'humidité relative, notée HR,
- les épisodes de condensation calculés,
- la teneur en eau massique mesurée par carottage et la masse d'eau mesurée en direct, ainsi que leurs éventuelles variations,
- la surface visiblement colonisée et ses éventuelles variations,
- la composition en argile et en phase.

Pour ce qui concerne les données diachroniques relatives à la flore microbienne, les informations significatives retenues sont détaillées ci-après :

➤ *Pour la microbiologie classique :*

- numération et identification de la flore hétérotrophe et de la flore fongique,
- numération des ferments nitriques (*Nitrobacter sp*) et des oxydants du soufre (thiobacilles).

Les germes entrant dans les cycles du fer et du manganèse étant absents, ils n'ont pas été retenus.

➤ *Pour la biologie moléculaire :*

- les espèces majoritaires isolées en clonage séquençage,
- les structures de communautés bactériennes et fongiques.

Le pas de temps entre ces deux matrices est différent : les dates des calques pour la matrice diachronique, d'une part, et les dates de prélèvement micro-biologiques d'autre part. Ainsi, pour la matrice diachronique, les moyennes sont calculées uniquement entre deux prélèvements; tandis que pour la matrice dynamique, les moyennes sont également calculées sur le jour du prélèvement et 15 jours avant le prélèvement. Le pas de temps entre deux prélèvements étant de 3 mois, ces valeurs moyennes supplémentaires permettent de s'affranchir d'un éventuel lissage des variations par le calcul de la moyenne.

Les tableaux 15 et 16 récapitulent les données dynamiques alors que les tableaux 17 et 18 regroupent les données diachroniques des zones PR4 et PR5.

% Argile	% de phases	Date photo/calque	Δ Teneur en eau	Δ Surface colonisée Variation spatiale Variation chromatique	<T <sub>s</sub> >	T <sub>s</sub> min	T <sub>s</sub> max	<T <sub>s</sub> > 4/4bis	T <sub>s</sub> min 4/ 4bis	T <sub>s</sub> max 4/4bis	<T <sub>s</sub> > 4	<T <sub>s</sub> > 4bis	T <sub>s</sub> min 4/4bis	T <sub>s</sub> max 4/4bis	<RH>	RH min	RH max	Condensation				
					°C	°C	°C	°C	°C	°C	°C			°C	°C	%	%	%	oui/non			
42	58	Sem 26/2009		pas de mesure																22-28/06/2009		
		Sem 29/2009																				13-19/07/2009
		Sem 32/2009	0			12,57	12,55	12,61	12,6/ 12,62	12,58/ 12,6	12,62/ 12,65	12,59	12,59	12,57/ 12,57	12,62/ 12,62	99,4	99,0	99,6	no			3-9/08/2009
		Sem 35/2009				12,53	12,51	12,6	12,58/ 12,59	12,56/ 12,56	12,63/ 12,65	12,56	12,57	12,54/ 12,34	12,62/ 12,63	no data	no data	no data	no data			24-30/8/2009
		Sem 38/2009				12,54	12,51	12,65	12,57/ 12,57	12,55/ 12,55	12,6/ 12,65	12,56	12,55	12,54/ 12,53	12,62/ 12,62	no data	no data	no data	no data			14-20/9/2009
		Sem 41/2009				12,53	12,53	12,53	12,56/ 12,57	12,56/ 12,56	12,56/ 12,58	12,55	12,55	12,55/ 12,55	12,55/ 12,56	99,6	99,6	99,6	no			5-11/10/2009
		Sem 44/2009				12,56	12,55	12,56	12,57/ 12,58	12,57/ 12,58	12,58/ 12,60	12,57	12,58	12,57/ 12,57	12,57/ 12,59	99,6	99,5	99,6	no			26/10 1/11/2009
		Sem 47/2009				12,58	12,56	12,6	12,59/ 12,61	12,58/ 12,59	12,61/ 12,63	12,59	12,6	12,57/ 12,58	12,60/ 12,62	99,6	99,4	99,8	yes			16-22/11/2009
		Sem 50/2009				12,61	12,58	12,64	12,62/ 12,63	12,61/ 12,62	12,63/ 12,64	12,61	12,63	12,60/ 12,62	12,64/ 12,64	99,6	99,4	99,9	yes			7-13/12/2009
		Sem 53/2009				12,63	12,62	12,65	12,64/ 12,64	12,63/ 12,64	12,65/ 12,66	12,63	12,64	12,63/ 12,63	12,65/ 12,65	99,5	99,5	99,6	no			28/12/2009 3/1/2010
		Sem 2/2010			12,64	12,63	12,65	12,64/ 12,65	12,64/ 12,64	12,65/ 12,65	12,64	12,64	12,64/ 12,64	12,65/ 12,65	99,5	99,4	99,6	no			4-10/01/2010	
		Sem 5/2010			12,66	12,63	12,7	12,67/ 12,67	12,66/ 12,66	12,71/ 12,73	12,67	12,67	12,65/ 12,66	12,71/ 12,73	99,7	99,5	99,8	no			25-31/01/2010	
		Sem 7/2010			non significative	12,68	12,67	12,68	12,69/ 12,70	12,68/ 12,69	12,69/ 12,70	12,68	12,69	12,68/ 12,68	12,68/ 12,69	99,6	99,5	99,7	no			8-14/02/2010
		Sem 10/2010		12,68		12,67	12,69	12,7/ 12,71	12,7/ 12,7	12,7/ 12,72	12,69	12,7	12,69/ 12,70	12,7/ 12,71	99,7	99,5	99,7	no			1-7/03/2010	
		Sem 12/2010		12,68		12,68	12,69	12,71/ 12,74	12,7/ 12,73	12,71/ 12,76	12,7	12,68	12,69/ 12,68	12,7/ 12,69	99,6	99,5	99,7	no			15-21/03/2010	
		Sem 15/2010		12,67		12,66	12,68	12,7/ 12,73	12,69/ 12,71	12,7/ 12,75	12,69	12,67	12,68/ 12,67	12,69/ 12,68	99,6	99,6	99,7	no			5-11/04/2010	
		Sem 17/2010		12,66		12,65	12,67	12,68/ 12,72	12,68/1 2,71	12,69/ 12,73	12,68	12,66	12,67/ 12,66	12,68/ 12,67	99,5	99,4	99,5	no			19-25/04/2010	
		Sem 20/2010		12,65		12,63	12,67	12,67/ 12,71	12,67/ 12,68	12,68/ 12,73	12,66	12,66	12,65/ 12,65	12,67/ 12,67	99,5	99,3	99,7	no			10-16/05/2010	

Tableau 15 : zone PR4, données dynamiques

% Argile	% de phases	Date photo/calque	Δ Teneur en eau	Δ Surface colonisée Variation spatiale Variation chromatique	T <sub>air</sub> average	T <sub>a</sub> min	T <sub>a</sub> max	<T <sub>r</sub> >	T <sub>r</sub> min	T <sub>r</sub> max	<T <sub>s</sub> >	T <sub>s</sub> min	T <sub>s</sub> max	<RH>	RH min	RH max	Condensation		Δ de surface visiblement humide			
					°C	°C	°C	°C	°C	°C	°C	°C	°C	%	%	%	oui/non					
68	32	Sem 26/2009		pas de mesure														22-28/06/2009	0			
		Sem 29/2009																		13-19/07/2009		
		Sem 32/2009	0			12,57	12,55	12,73	12,58	12,56	12,64	12,57	12,56	12,67	99,5	99,4	99,6	no		3-9/08/2009		
		Sem 35/2009			12,57	12,55	12,62	no data	no data	no data	12,56	12,55	12,59	no data	no data	no data	no data	no data		24-30/8/2009		
		Sem 38/2009			12,56	12,53	12,69	no data	no data	no data	12,55	12,53	12,58	no data	no data	no data	no data	no data		14-20/9/2009		
		Sem 41/2009			12,53	12,53	12,53	12,53	12,53	12,54	12,53	12,53	12,54	99,8	99,6	99,9	2/10/2009	5-11/10/2009				
		Sem 44/2009			12,55	12,55	12,56	12,56	12,56	12,56	12,56	12,56	12,56	99,6	99,3	99,9	possible	26/10-1/11/2009				
		Sem 47/2009			12,58	12,56	12,66	12,58	12,56	12,62	12,58	12,56	12,62	99,6	99,5	99,9	yes	16-22/11/2009				
		Sem 50/2009			12,61	12,59	12,71	12,61	12,6	12,63	12,61	12,6	12,66	99,6	99,4	100,0	yes	7-13/12/2009				
		Sem 53/2009			12,62	12,61	12,69	12,62	12,61	12,65	12,62	12,61	12,66	99,7	99,4	99,9	possible	28/12/2009-3/1/2010				
		Sem 2/2010			12,63	12,62	12,65	12,62	12,62	12,64	12,62	12,62	12,64	99,7	99,6	99,8	possible	4-10/01/2010				
		Sem 5/2010			12,66	12,65	12,73	12,66	12,65	12,71	12,66	12,65	12,72	99,7	99,2	99,8	no	25-31/01/2010				
		Sem 7/2010			non significative	12,67	12,67	12,68	12,67	12,67	12,67	12,67	12,67	12,67	12,67	12,67	99,7	99,6		99,8	no	8-14/02/2010
		Sem 10/2010				12,69	12,69	12,7	12,68	12,68	12,69	12,69	12,68	12,69	99,6	98,8	99,9	no		1-7/03/2010		
		Sem 12/2010				12,69	12,69	12,7	12,69	12,68	12,69	12,69	12,69	12,69	99,8	99,7	99,8	no		15-21/03/2010		
		Sem 15/2010				12,68	12,67	12,69	12,68	12,67	12,68	12,68	12,67	12,69	99,7	99,6	99,9	no		5-11/04/2010		
		Sem 17/2010				12,67	12,67	12,68	12,67	12,66	12,67	12,67	12,66	12,67	99,6	98,7	99,8	no		19-25/04/2010		
		Sem 20/2010				12,66	12,66	12,68	12,67	12,66	12,67	12,67	12,66	12,68	99,3	98,8	99,6	no		10-16/05/2010		

Tableau 16 : zone PR5, données dynamiques

PR4					
Date prélèvement		05-juin-09	13-oct-09	01-févr-10	29-avr-10
<Masse eau > g (moyenne sur la période)		pas de mesure	0,38	0,38	0,38
Écart type			0,01	0,0136	0,01
Si variation, sens de la variation			variation non significative		
Teneur en eau massique (mesure instantanée par carottage) %		12,18	9,63	9,4	9,8
Si variation, sens de la variation (%)		pas de mesure	-26,5	variation non significative	
Surface colonisée % (incertitude 1,4 %)		pas de mesure		0,50	0,52
<T <sub>air</sub> > (moyenne entre 2 mesures) °C		Pas de mesures antérieures	12,54	12,6	12,68
<T <sub>air</sub> > (moyenne sur les 15 jours précédents)°C			12,53	12,65	12,66
<T <sub>air</sub> > (moyenne du jour)°C			12,55	12,67	12,67
<T <sub>roche</sub> >(moyenne entre 2 mesures)°C			12.58/12.59	12.61/12.62	12.7/12.73
<T <sub>roche</sub> >(moyenne sur les 15 jours précédents)°C			12.56/12.57	12.66/12.67	12.69/12.72
<T <sub>roche</sub> > (moyenne du jour)°C			12.57/12.58	12,68	12.68/12.73
<T <sub>surface</sub> >(moyenne entre 2 mesures)°C			12,57	12.61/12.62	12,69
<T <sub>surface</sub> > (moyenne sur les 15 jours précédents)°C			12,55	12,66	12.68/12.66
<T <sub>surface</sub> >(moyenne du jour)°C			12.56/12.57	12,67	12.68/12.66
<HR>(moyenne entre 2 mesures) %			99,5	99,6	99,6
<HR> (moyenne sur les 15 jours précédents) %			99,6	99,7	99,6*
<HR> (moyenne du jour) %			99,6	99,4	99,4
Mesure indirecte de la condensation (oui/non)			non	non	non
Condensation-indirect measure (present or not) between 2 sampling				nbres	
Champignons	Numération (UFC/g de terre)	2,9E+04	1,5E+06	6,3E+05	8,5E+05
	Espèces	<i>Fusarium sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i> <i>Trichoderma sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i> <i>Penicillium sp.</i>  <i>Trichoderma sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <b><i>Acremonium sp.</i></b> <i>Verticillium sp.</i> <i>Ulocladium sp.</i> <i>Gliomastix sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i>  <i>Aspergillus sp.</i> <i>Acremonium sp.</i> <b><i>Verticillium sp.</i></b> <i>Ulocladium sp.</i> <i>Gliomastix sp.</i> <i>Acremonium sp. 2</i>	<i>Fusarium sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i>  <i>Aspergillus sp.</i> <b><i>Acremonium sp.</i></b> <i>Verticillium sp.</i> <i>Ulocladium sp.</i> <i>Gliomastix sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i> <i>Acremonium sp.2</i> <i>Fusarium sp.2</i> <i>Geomyces sp.</i>
	Nombre	5	8	9	10

Tableau 17 : zone PR4, données diachroniques



Bactéries hétérotrophes	Numération (UFC/g de terre)		8,6E+07	1,7E+08	9,0E+07	8,6E+07
	Espèces	Gram +	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i> <i>Micrococcaceae</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i> <i>Mycobacteriaceae</i>
		Gram -	<i>Rhizobium radiobacter</i> <i>Ochrobactrum anthropi</i> <i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Alcaligenes sp.</i> <i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i> <i>Ochrobactrum anthropi</i> <b><i>Brevundimonas diminuta</i></b>  <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>  <i>Alcaligenes sp.</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Stenotrophomas maltophila</i> <i>Burkholderia cepacia</i>
	Nombre		6	7	7	9
Bactéries autotrophes	Ferments nitriques		5,4E+02	3,5E+02	2,0E+02	1,9E+03
	Oxydants du soufre		2,5E+02	3,2E+03	9,5E+01	2,5E+01
C/N			9,92	11,22	10,88	9,85
Biologie moléculaire	Espèces clonage séquençage	Bactéries	<i>Phyllobacterium sp.</i> (66%) <i>Afipia sp.</i> (14%) <i>Bordetella sp.</i> (11%)		<i>Ralstonia sp.</i> (70%) <i>Escherichia coli</i> (10%) <i>Lactobacillus iners</i> (8%)	
		Champignons	<i>Isaria sp.</i> (61%) = <i>Penicillium</i> <i>Alternaria sp.</i> (13%) <i>Scolecobasidium sp.</i> (10%)		<i>Debaryomyces hansenii</i> (50%) (levure) <i>Hypocrea sp.</i> (15%) (téléomorphe de <i>Gliocladium</i> , <i>Trichoderma</i> ) <i>Chromocleista malachitea</i> (10%) <i>Penicillium janthinellum</i> (8%)	
	Structure des communautés T-RFLP	Bactéries	non significativement différent de PR5	non significativement différent de juin 2009	non significativement différent de juin et octobre 2009	
		Champignons	non significativement différent de PR5	non significativement différent de juin 2009	non significativement différent de juin et octobre 2009	
	Nombre bactéries		14		8	
	Nombre champignons		8		10	
	« carte d'identité »					

Tableau 17 : zone PR4, données diachroniques

PR5					
Date prélèvement	05-juin-09	13-oct-09	01-févr-10	29-avr-10	
<Masse eau > g (moyenne sur la période)	pas de mesure	0,53	0,53	0,53	
Écart type		0,02	0,01	0,01	
Si variation, sens de la variation		variation non significative			
Teneur en eau massique(mesure instantanée par carottage) %	21,11	20,71	20,3	20,50	
Si variation, sens de la variation (%)	pas de mesure variation non significative				
Surface colonisée % (incertitude 1,4 %)	pas de mesure		6,6	7,6	
<T <sub>air</sub> > (moyenne entre 2 mesures) °C	Pas de mesures antérieures	12,56	12,6	12,69	
<T <sub>air</sub> > (moyenne sur les 15 jours précédents)°C		12,53	12,66	12,67	
<T <sub>air</sub> > (moyenne du jour)°C		12,56	12,69	12,69	
<T <sub>roche</sub> >(moyenne entre 2 mesures)°C		12,56	12,6	12,68	
<T <sub>roche</sub> >(moyenne sur les 15 jours précédents)°C		12,54	12,65	12,67	
<T <sub>roche</sub> > (moyenne du jour)°C		12,55	12,67	12,66	
<T <sub>surface</sub> >(moyenne entre 2 mesures)°C		12,56	12,6	12,68	
<T <sub>surface</sub> > (moyenne sur les 15 jours précédents)°C		12,54	12,65	12,67	
<T <sub>surface</sub> >(moyenne du jour)°C		12,55	12,68	12,67	
<HR>(moyenne entre 2 mesures) %		99,6	99,6	99,7	
<HR> (moyenne sur les 15 jours précédents) %		99,8	99,7	99,7	
<HR> (moyenne du jour) %		99,7	99,2	99,2	
Mesure indirecte de la condensation (oui/non)	non		non	non	
surface relative visiblement humide (%)	0,0695	0,146	0,196	0,007	
Champignons	Numération (UFC/g de terre)	7,6E+04	2,2E+05	4,1E+06	6,7E+05
	Espèces	<i>Fusarium sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i> <i>Verticillium sp.</i> <i>Penicillium sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i> <i>Verticillium sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Acremonium sp.</i> <i>Ulocladium sp.</i> <i>Gliomastix sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i> <i>Verticillium sp.</i> <i>Acremonium sp.</i> <i>Ulocladium sp.</i> <i>Gliomastix sp.</i> <b>Acremonium sp. 2</b> <i>Acremonium sp.3</i> <i>Acremonium sp. 4</i>	<i>Fusarium sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i>  <b>Acremonium sp.</b> <i>Ulocladium sp.</i>  <i>Acremonium sp. 2</i>   <i>Fusarium sp.2</i> <i>Fusarium sp.3</i>
	Nombre	4	7	9	7

Tableau 18 : zone PR5, données diachroniques

Bactéries hétérotrophes	Numération (UFC/g de terre)		8,1E+07	1,1E+08	8,2E+07	1,5E+07
	Espèces	Gram +	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Micrococcaceae</i>	<i>Bacillus sp.</i>
		Gram -		<i>Rhizobium radiobacter</i> <i>Sphingobacterium spiritivorum</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Moraxella sp.</i>	<i>Alcaligenes sp.</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Pseudomonas sp.</i> BG- Non Entérobactéries	<i>Rhizobium radiobacter</i>  BG- Non Enterobacteries <i>Pasteurella sp.</i> <i>Oligella urethralis</i>
		Nombre	1	5	7	5
Bactéries autotrophes	Ferments nitriques		7,3E+02	1,6E+04	2,6E+02	3,3E+03
	Oxydants du soufre		5,7E+01	1,4E+04	2,4E+02	5,7E+00
C/N			6,65	9,46	8,66	4,35
Biologie moléculaire	Espèces clonage séquençage	Bactéries	<i>Escherichia sp.</i> (13%) <i>Achromobacter sp.</i> (13%) <i>Ralstonia sp.</i> (10%) <i>Aquicella sp.</i> (10%)		<i>Ralstonia sp.</i> (66%) <i>Bacillus sp.</i> (10%) <i>Aminobacter sp.</i> (5%) <i>Escherichia coli</i> (5%)	
		Champignons	<i>Fusarium sp.</i> (30%) <i>Isaria sp.</i> (6%) = <i>Penicillium</i> <i>Calcarisporium sp.</i> (6%) <i>Tetracladium sp.</i> (6%)		<i>Debaryomyces hansenii</i> (49%) (levure) <i>Cunninghamella bainieri</i> (45%)	
	Structure des communautés T-RFLP	Bactéries	non significativement différent de PR4	non significativement différent de juin 2009	non significativement différent de juin et octobre 2009	
		Champignons	non significativement différent de PR4	non significativement différent de juin 2009	non significativement différent de juin et octobre 2009	
	Nombre bactéries		20		11	
	Nombre champignons		30		6	

Tableau 18 : zone PR5, données diachroniques

L'étude de l'ensemble des données (dynamiques et diachroniques) montre que seule une partie d'entre elles a varié de façon significative dans le temps imparti pour cette étude. Ces informations sont regroupées dans le tableau 19. Les paramètres surlignés sont ceux qui permettent de différencier les deux zones.

	PR4	PR5
Microclimat	Identique	
Épisode condensation	Aucun	
Teneur en argiles	40%	70%
Saturation endogène	Saturée	
Compacité	Faible	Importante
État de colonisation initiale	0	1
Variation surface colonisée	Aucune	
Biodiversité	Jusqu'à 70% espèces communes	
Numération des champignons	Constante à $10^5$ - $10^6$ UFC/g sédiment	
Analyses T-RFLP	Similaire	

**Tableau 19** : synthèse des résultats les plus significatifs

Dans les conditions de l'étude, la contamination fongique est stable si les variations respectivement de l'humidité relative, de la température, des taux de carbone et azote organiques et du rapport C/N restent comprises dans les intervalles suivants :

- HR : [99,3:100] %,
- T : [12,5:12,7] °C,
- C : [2713:4847] mg/Kg,
- N : [478:622] mg/Kg,
- C/N : [4,4 : 9,5].

Les résultats des analyses microbiologiques des quatre campagnes de prélèvements ne montrent pas d'évolution caractérisée du biotope, ni en nombre ni en espèces. La liste des espèces cultivables identifiées constitue la carte d'identité microbienne de chaque zone. Celle-ci permet d'alimenter la base de données constituée par les résultats des nombreuses analyses microbiologiques déjà effectuée dans la grotte, et de caractériser précisément la flore d'une zone particulière de la cavité. Ces résultats sont également complétés par ceux obtenus en biologie moléculaire.

Concernant la caractérisation des sédiments en subsurface, les teneurs en azote et carbone organiques ainsi que les rapports C/N ne varient pas non plus de manière notable dans le temps. Les différences constatées sur les taux des ions nitrates et chlorures peuvent s'expliquer par la nature des substrats. Les deux zones se différencient nettement par leur quantité d'argile et aussi par leur teneur en eau bien que l'humidité de l'air dans la cavité, très élevée, soit restée stable pendant toute la période d'étude. L'eau contenue dans les sédiments dépend de la proportion d'argile et de leur nature. Dans ces conditions, les minéraux argileux déterminent, selon leur agencement et l'état de compaction, la cinétique de rétention ou de transfert des solutions tandis que leur nature gouverne les possibilités d'échange ou de fixation d'ions (CEC). Force est d'admettre que les fluctuations enregistrées des paramètres externes (température, humidité) ont été insuffisantes pour franchir un seuil ou initier une perturbation susceptible de modifier de manière significative l'état visuel de contamination des zones.

Les zones PR4 et PR5 possèdent un microclimat similaire dont les paramètres sont proches des données microclimatiques acquises par le Ghymac à proximité de ces zones.

La stabilité du biotope, mise en évidence par les bilans microbiologiques, est à mettre en parallèle avec les relevés des restaurateurs et du traitement d'image, qui, à l'incertitude de mesure près, ne révèlent aucune variation de l'état de surface colonisée sur les deux zones.

Enfin, les résultats obtenus sur cette année d'étude constituent une base pour les prochains travaux de recherche. En effet, ce projet a montré la difficulté de conclure sur des données obtenues seulement sur une année, compte tenu de la stabilité de tous les paramètres mesurés. En période d'équilibre microbiologique apparent, les processus d'évolution sont lents et leur caractérisation nécessiterait des investigations sur le long terme.

- ✓ Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Review* 59, 143–169.
- ✓ Barberousse, H., Étude de la diversité des algues et des cyanobactéries colonisant les revêtements de façade en France et recherche des facteurs favorisant leur implantation. PhD thesis, MNHN, Paris, France, 2006.
- ✓ Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. 2009a. The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux Cave. *Journal of Applied Microbiology*, 106:1456-62.
- ✓ Bastian F., Alabouvette C., Saiz-Jimenez C. 2009b. Impact of biocide treatments on the bacterial communities of the Lascaux Cave. *Naturwissenschaften*. In press.
- ✓ Blanchet G., Charbit M., Signaux et images sous Matlab, Hermes Sciences Paris, 2001.
- ✓ Borneman, J., & Hartin, R.J. 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4356-4360.
- ✓ Botton B. , Breton A. , Fevre M. (et al.), Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle par ; textes coordonnés par J. P. Larpent, 2e édition, revue et complétée Paris ; Milan ; Barcelone (etc.) : Masson, 512 p., 1990.
- ✓ Busse H.J. Classification and identification of bacteria : current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacteria systematics. *Journal of biotechnology*, 47, pp3-38, 1996.
- ✓ Canny, J., A Computational Approach To Edge Detection, *IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 8:679-714 (1986).
- ✓ Castro E.D. and C. Morandi. *Registration of translated and rotated images using finite fourier transforms*, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, volume PAMI9 (5), 700-703, Sept 1987.
- ✓ De Muynck, W., Ramirez, A.M., De Belie, N., Verstraete, W., 2009. Evaluation of strategies to prevent algal fouling on white architectural and cellular concrete, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 679-689.
- ✓ Diday E. , La méthode des nuées dynamiques , *Rev. Stat. Appliquee*, vol. XIX(2), pp. 19--34, 1975.
- ✓ Dubosc, A., Étude *du développement de salissures biologiques sur les parements en béton: mise au point d'essais accélérés de vieillissement*, PhD thesis, INSA, Toulouse, France, 2000.
- ✓ Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H., Compendium of soil fungi, 2nd edition, Eching : IHW-Verlag, 672 p., cop. 2007.
- ✓ Doumergues Y., Mangenot F. *Ecologie microbienne du sol..* Masson, 796p,1970.
- ✓ Edel-Hermann, V., Dreumont, C., Perez-Piqueres, A., & Steinberg, C., 2004. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungal community structure in soils. *FEMS Microbiology and Ecoogy*, 47, 397-404.
- ✓ Escadeillas, G., Bertron, A., Blanc, P., Dubosc, A., Accelerated testing of biological stain growth on external concrete walls. Part 1: development of the growth tests, *Materials and Structures*, 40, 1061–1071, 2007.
- ✓ Landau L., Lifchitz E., *Mécanique des Fluides*, éd. Mir, Moscou, 1971.
- ✓ Lim, Jae S., *Two-Dimensional Signal and Image Processing*, Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall, pp. 478-488, 1990.
- ✓ Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P., *Environmental microbiology*, 2nd edition, London : Academic Press, cop., 598p, 2009
- ✓ Meyer A., Daiana J., Bernard A., *Cours de microbiologie générale*, 2ème édition, Collection Biosciences et techniques, Editions Doin, 430p, 2004.
- ✓ Mougél C., Offre P., Ranjard L., Corberand T., Gamalero E., Robin C., Lemanceau P., 2006. Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytologist* 170, 165–175.
- ✓ Onions A.H.S., Allsopp D., Eggins H.O.W., *Smith's introduction to industrial mycology*, 7<sup>th</sup> edition, London :EdwardArnold, 398 p.,1981.
- ✓ Parker, James R., *Algorithms for Image Processing and Computer Vision*, New York, John Wiley & Sons, Inc., pp. 23-29, 1997.
- ✓ Pitt J.I., Hocking A.D.. *Fungi and food spoilage*. Aspen Pub. Gaithersburg, 28p, 1999.
- ✓ Rapport LRMH n°101P : Grotte de Lascaux. Recherche de l'impact des paramètres physiques de l'atmosphère et des substrats sur le développement des microorganismes : résultats de la première tranche d'étude.
- ✓ Roquebert M.F., Oriol G., Analyse d'une contamination : comment analyser une contamination biologique et en évaluer les risques. *Les contaminants biologiques des biens culturels*, Elsevier Amsterdam, pp 147 – 159, 2002.

- ✓ Saporta, G. , Probabilités. Analyse des données et statistique, G., Editions Technip, 2006.
- ✓ Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, Lubitz W, Rolleke S (2002) Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. FEMS Microbiol Lett 211:7-11.
- ✓ Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, Lubitz W, Rolleke S (2004) Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonin and La Garma). FEMS Microbiol Ecol 47:235-247.
- ✓ Sève, R., 1996. Physique de la couleur, Masson.
- ✓ Thioulouse, J., Chessel, D., Doledec, S., Oliver, J.M., 1997. Ade-4: a multivariate analysis and graphical display software. Statistics and Computing 7, 75–83.
- ✓ Zeb J. and al., *Low Resolution Single Neural Network Based Face Recognition*, International Journal of Biological and Medical Sciences 2:3, 2007.
- ✓ Zhou JP, Gu YQ, Zou CS, Mo MH (2007) Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-vave in Guizhou Province, Southwest of China. J Microbiol 45:105-112.