

## IDENTIFICATION DES BIOAEROSOLS DE LA GROTTTE DE LASCAUX

L. Alonso<sup>\*1,2</sup>, T. Pommier<sup>1</sup> et Y. Moëgne-Loccoz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université de Lyon, 69100 Villeurbanne, France

<sup>2</sup>Adresse actuelle : Laboratoire de Métrologie des Aérosols, INRS, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

\*lise.alonso@inrs.fr

### IDENTIFICATION OF BIOAEROSOLS OF LASCAUX CAVE

#### RESUME

La grotte de Lascaux, classée au patrimoine mondial de l'UNESCO, est célèbre pour ses peintures et gravures rupestres. Les nombreuses visites ont nécessité des aménagements qui ont bouleversé le microbiote de la grotte et engendré le développement de taches d'origines microbiennes sur les parois. Des prélèvements de parois et d'air ont été effectués afin de comprendre le développement de ces taches et leur potentielle dissémination. L'abondance microbienne dans l'air de la grotte est plus faible à l'entrée que dans les salles centrales, suggérant que la majorité des microorganismes ne transitent pas par l'entrée. L'identification des microorganismes indique que certains taxons bactériens comme *Ralstonia* sont prédominants dans l'air mais minoritaires sur les parois, où apparemment les conditions écologiques ne leur permettent pas de s'établir durablement.

#### ABSTRACT

Lascaux Cave, listed as a UNESCO World Heritage Site, is famous for its rock paintings and engravings. Numerous visits required adaptation work, which disrupted the cave's microbiota and led to the development of microbial stains on the walls. Wall and air samples were taken to understand the development of these spots and their potential spread. Microbial abundance in cave air is lower at the entrance than in central rooms suggesting that microorganisms do not pass through the entrance. The identification of microorganisms indicates that some bacteria taxa such as *Ralstonia* are predominant in the air but are in minority on the walls which means ecological conditions were not conducive to their establishment.

**MOTS-CLÉS** : microbiote, séquençage haut débit, grotte de Lascaux

**KEYWORDS**: microbiota, high throughput sequencing, Lascaux Cave

### 1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

La grotte de Lascaux, classée au patrimoine mondial de l'UNESCO en 1979, est une grotte de Dordogne célèbre pour ses peintures et gravures rupestres (Bastian et al. 2009). Elle est composée de 11 salles de tailles et morphologies différentes. Les parois de ces salles sont composées de substrats minéraux différents allant du calcaire à l'argile. La grotte de Lascaux a été largement visitée pendant 15 ans (1948-1963) avec un nombre de visiteurs allant de 1800 à 2000 par jour dans les années 60 (Bastian et al. 2010). Pour permettre ces visites, des aménagements ont été effectués (installation d'escaliers, système de renouvellement de l'air...), ces perturbations anthropiques (et ultérieurement les traitements chimiques des parois) ont engendré le développement de taches d'origines microbiennes sur les parois de la grotte, sous différentes formes (Bastian et al. 2010). La grotte de Lascaux est donc un modèle d'étude intéressant pour comprendre l'écologie d'une communauté microbienne dans un environnement hétérogène ayant subi une forte pression anthropique. Elle a d'ailleurs fait l'objet d'un premier projet scientifique en 2008 pour analyser l'écologie microbienne de la grotte et caractériser ces taches noires. Ce projet coordonné par Claude Alabouvette (INRA Dijon) et Cesareo Saiz-Jiménez (INRAS-SCIC, Espagne) a permis d'identifier et de caractériser les communautés microbiennes par des techniques de mise en culture, de clonage séquençage et de caractérisation moléculaire, ainsi que de déterminer le niveau de contamination microbiologique dans l'air de la grotte (Alabouvette & Saiz-Jiménez, 2011). Ce projet a mis en évidence un écosystème complexe et la présence de nouvelles espèces fongiques (Martin-Sanchez et al. 2012). Afin d'enrichir cette première étude et de caractériser la communauté microbienne de façon plus complète, un deuxième projet a été mis en place en 2014 avec une approche d'identification des micro-organismes par séquençage à haut débit et un suivi spatio-temporel.

Le projet 'Ecologie microbienne de la grotte de Lascaux' (2014-2017) avait plusieurs objectifs, (i) caractériser la communauté microbienne de la grotte de Lascaux présente sur les taches noires et sur des zones non tachées, en fonction du temps et dans différentes salles de la grotte, en utilisant le séquençage à haut débit des acides nucléiques, (ii) étudier la dissémination des microorganismes producteurs de taches par trois moyens possibles, l'eau, les bioaérosols et les collembolles (arthropodes).

Dans ce contexte, cette présentation est consacrée à l'identification des bioaérosols et leur dissémination dans la grotte de Lascaux grâce à une méthode de mise en culture et au séquençage à haut débit afin d'identifier la communauté microbienne totale présente dans l'air.

## 2. MATERIELS ET METHODES

L'air peut véhiculer des microorganismes de l'extérieur vers l'intérieur de la grotte, y-compris en relation avec les vas-et-viens des intervenants (ce qui conduit à des flux d'air lors de l'ouverture des portes). Il peut aussi transférer des microorganismes (et potentiellement, conduire ainsi à des ré-infestations) d'une zone contaminée de la grotte à une autre zone non/moins contaminée. C'est pourquoi, outre la zone du Passage, les prélèvements d'air ont été effectués dans la zone du Sas-1 (au niveau du compartiment 2) et, entre les deux, la salle des Taureaux (Figure 1).



Les conditions climatiques dans la grotte sont stables avec une température moyenne annuelle de 12,6°C et un taux d'humidité relative proche de 100%. Deux approches ont été utilisées pour l'étude des microorganismes dans l'air : la mise en culture et le séquençage à haut débit. Pour l'étude des microorganismes cultivables, les prélèvements ont été réalisés à l'aide de l'impacteur Sampl'air (Biomérieux) au débit de 100 l/min pendant 10 min (Figure 2a). Cet impacteur mono-étage sur milieux gélosés se caractérise par un diamètre de coupure de l'ordre de 0.5  $\mu\text{m}$  (Méheust *et al.*, 2013). Trois milieux de culture sélectifs différents ont été utilisés pour sélectionner les trois communautés microbiennes recherchées : les bactéries avec la gélose nutritive (GN), les actinobactéries avec le milieu BENETT et les champignons avec le milieu DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol). Concernant le séquençage à haut débit, les prélèvements ont été réalisés à l'aide du Coriolis  $\mu$  (Bertin Technologies) (Figure 2b). Ce dispositif permet de collecter les microorganismes prélevés par effet cyclonique directement dans un cône stérile pré-rempli avec un échantillon liquide (15 ml). Le diamètre de coupure est de l'ordre de 0.5  $\mu\text{m}$ , et l'efficacité de collecte est de l'ordre de 92% pour des particules de 10  $\mu\text{m}$  (Carvalho *et al.*, 2008). Les prélèvements à l'aide du Coriolis  $\mu$  ont été effectués avec un débit de 300 l/min durant 30 min. Concernant l'analyse de l'échantillon prélevé, la procédure d'obtention d'ADN a été optimisée en ajoutant, après l'extraction d'ADN, une étape supplémentaire d'amplification aléatoire. Celle-ci a été réalisée à l'aide du kit REPLI-g UltraFast Mini Kit (Qiagen). Le gène ARNr 16S dans les échantillons a ensuite été séquencé à haut débit avec la technologie Illumina afin d'identifier la communauté bactérienne.

Certaines difficultés techniques ont été rencontrées lors de l'utilisation des appareils de prélèvements ne permettant pas de réaliser, en parallèle, les prélèvements à des fins de dénombrement des microorganismes cultivables et d'identification de la communauté bactérienne. C'est pourquoi, pour le dénombrement, deux campagnes ont été réalisées en décembre 2014 puis en juin/juillet 2015, et pour l'identification une campagne a été menée en juin 2016. Au total, 12 prélèvements ont été effectués avec le Sampl'air et 6 avec le Coriolis  $\mu$ .



Figure 2 : Les appareils de prélèvements mis en œuvre : A. Sampl'air (Biomérieux) B. Coriolis  $\mu$  (Bertin Technologies).

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Dénombrement des souches cultivables de bactéries, actinobactéries et champignons

Des isolats de bactéries (sur GN), d'actinobactéries (sur BENETT), et de champignons (sur DRBC) ont été obtenus pour chaque prélèvement. Ces isolats ont été obtenus en plus grande quantité à partir du Sas-1 (Figure 3), ce qui pourrait traduire l'importance de flux d'air et les possibilités d'entrée de l'air depuis l'extérieur dans cette partie de la grotte, mais des résultats différents ont été obtenus avec le séquençage et la mesure d'abondance par PCR quantitative (voir ci-dessous).

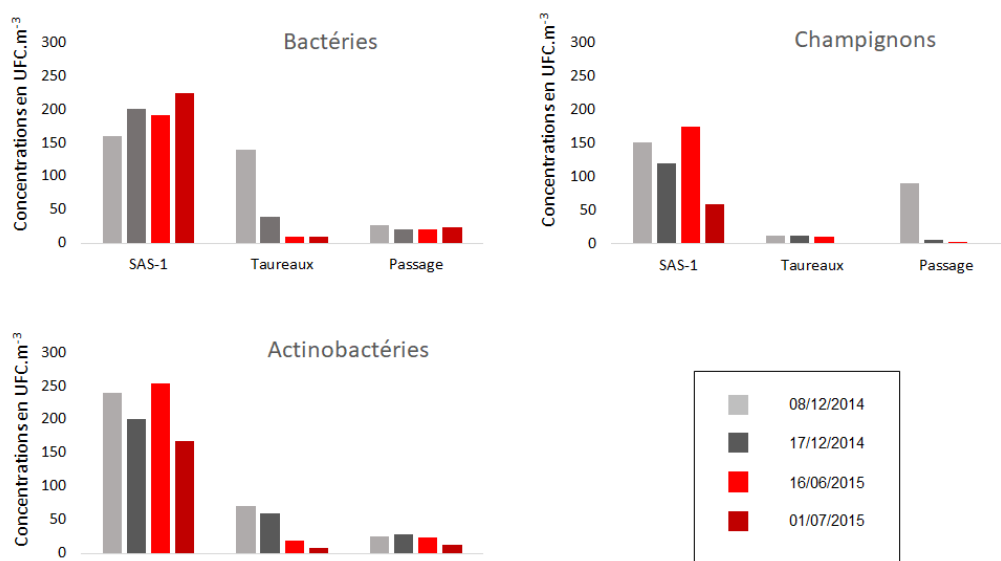


Figure 3 : Concentrations dans le SAS-1, salle des Taureaux et Passage obtenues par prélèvement à l'aide du Sampl'air.

#### 3.2. Identification de la communauté bactérienne totale dans l'air en 2016

Les échantillons d'air obtenus ont permis d'identifier 53 genres bactériens différents en 2016 (Figure 4). Dans le Sas-1, l'essentiel des séquences dans l'air correspond aux genres *Ralstonia* (~ 70%) et *Aquicella* (~ 30%). La forte prédominance de *Ralstonia* se retrouve dans l'air de la salle des Taureaux et du Passage, mais de nombreux autres genres bactériens sont également identifiés, incluant notamment *Sphingomonas* et *Mesorhizobium* (Taureaux), et *Bradyrhizobium* et *Mesorhizobium* (Passage). Certains de ces genres sont également présents sur les parois de la grotte, et en particulier *Ralstonia* mais ce genre occupe une place minoritaire sur les parois (<1%).

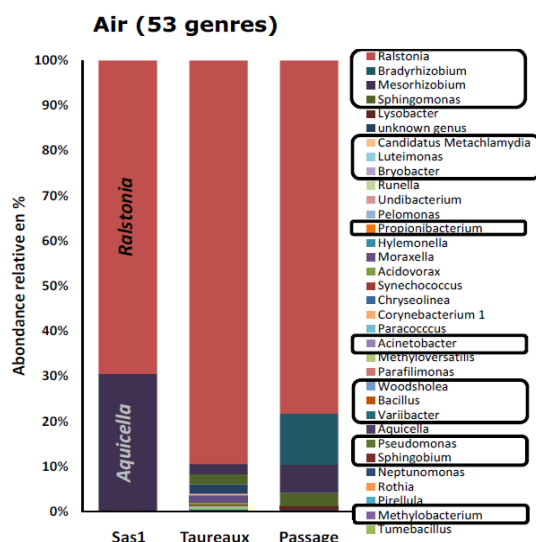


Figure 4. Identification par séquençage Illumina des bactéries (gènes ARNr 16S) présentes dans l'air en juin 2016. Les genres bactériens retrouvés également sur les parois de la grotte sont encadrés.

### 3.3. Abondance des bactéries dans l'air de la grotte de Lascaux en 2016

Les résultats de PCR quantitative (Figure 5) indiquent que l'abondance des bactéries (gènes ARNr 16S) mesurée en juin 2016 est significative dans la salle des Taureaux et le Passage. Ces niveaux d'abondance sont d'environ  $10^5$  copies/m<sup>3</sup> dans le Passage et la salle des Taureaux. Dans le compartiment 2 du Sas-1, en revanche, les niveaux sont beaucoup plus faibles, de l'ordre de  $10^3$  copies/m<sup>3</sup> d'air. Cela suggère que l'essentiel des microorganismes présents dans l'air de la salle des Taureaux ou du Passage ne provient pas de l'air du Sas-1. Ceux-ci pourraient provenir (i) de l'air extérieur qui trouve son chemin dans la cavité principale sans passer par le Sas-1, ou (ii) de la remobilisation interne de microorganismes faiblement associés aux surfaces de la cavité principale (même si les convections au sein de la grotte semblent modestes).

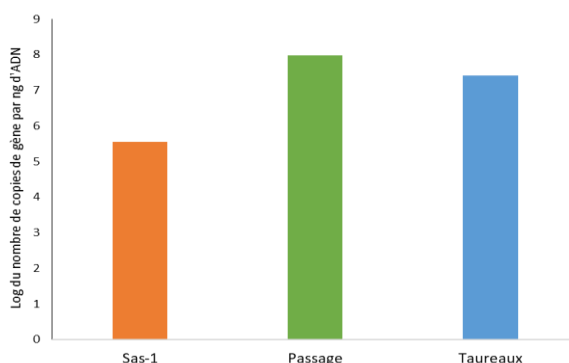


Figure 5. Abondance des bactéries dans l'air en Juin 2016.

## 4. CONCLUSION

L'abondance et la diversité de la communauté bactérienne de l'air de la grotte de Lascaux ont été identifiées de façon globale grâce à l'utilisation de la PCR quantitative et au séquençage à haut débit. La diversité et l'abondance bactérienne diffèrent en fonction des salles. Certaines souches bactériennes présentes dans l'air sont par ailleurs retrouvées sur les parois, ce qui pourrait expliquer le développement de certaines taches.

Alabouvette, C. and Saiz-Jimenez, C. (2011) Rapport Final Projet «Ecologie Microbienne de la grotte de Lascaux» financé par le Ministère de la Culture et de la Communication via la Direction Régionale de l'Action Culturelle d'Aquitaine, IRNAS-CSIC, Espagne. 126 pp.

Bastian, F. and Alabouvette, C. (2009) Lights and shadows on the conservation of a rock art cave: the case of Lascaux cave, *Int. J. Speleol.* 38, 55–60.

Bastian, F., Jurado, V., Novakova, A., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. (2010) The microbiology of Lascaux cave, *Microbiology.* 156, 644–52.

Carvalho, E., et al., (2008) Performance of the Coriolis air sampler, a high volume aerosol-collection system for quantification of airborne spores and pollen grains, *Aerobiologia.* 24, 191-201

Martin-Sanchez, P., Nováková, A., Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. (2012) Two new species of the genus *Ochroconis*, *O. lascauxensis* and *O. anomala* isolated from black stains in Lascaux cave, France, *Fungal Biol.* 116, 574–89.

Méheust, D., Gangneux, J.P., and Le Cann, P. (2013) Comparative evaluation of three impactor samplers for measuring airborne bacteria and fungi concentrations, *J. Occup. Environ. Hyg.* 10, 455-459