



HAL
open science

Utilisation du rayonnement UV-C comme méthode alternative aux produits chimiques dans la lutte et le contrôle de la prolifération des micro-organismes sur les matériaux du patrimoine

Fabien Borderie

► **To cite this version:**

Fabien Borderie. Utilisation du rayonnement UV-C comme méthode alternative aux produits chimiques dans la lutte et le contrôle de la prolifération des micro-organismes sur les matériaux du patrimoine. Ecologie, Environnement. Université de Franche-Comté, 2014. Français. NNT : 2014BESA2038 . tel-01244642

HAL Id: tel-01244642

<https://theses.hal.science/tel-01244642v1>

Submitted on 16 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

Spécialité - Sciences de la vie et de l'Environnement

UTILISATION DU RAYONNEMENT UV-C COMME MÉTHODE ALTERNATIVE AUX PRODUITS CHIMIQUES DANS LA LUTTE ET LE CONTRÔLE DE LA PROLIFÉRATION DES MICRO- ORGANISMES SUR LES MATÉRIAUX DU PATRIMOINE



Fabien BORDERIE

Besançon 2014

UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

Laboratoire Chrono-Environnement (UMR CNRS/UFC 6249, USC INRA)

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ
Spécialité - Sciences de la vie et de l'Environnement
Ecole doctorale - Environnement Santé

**UTILISATION DU RAYONNEMENT UV-C COMME MÉTHODE
ALTERNATIVE AUX PRODUITS CHIMIQUES DANS LA LUTTE ET
LE CONTRÔLE DE LA PROLIFÉRATION DES MICRO-
ORGANISMES SUR LES MATÉRIAUX DU PATRIMOINE**

Présentée et soutenue publiquement par

Fabien BORDERIE

Le 14 novembre 2014, devant le jury composé de :

Michel DENIS (Pr, Université d'Aix Marseille)	Rapporteur
Vincent GLOAGUEN (Pr, Université de Limoges)	Rapporteur
Lotfi ALEYA (Pr, Université de Franche-Comté, Besançon)	Directeur
Badr ALAOUI-SOSSE (MCF, Université de Franche-Comté, Besançon)	Co-directeur
Faisl BOUSTA (Dr, USR LRMH, Champs-sur-Marne)	Co-directeur
Geneviève PINÇON (Directrice CNP, membre UMR TRACES, Toulouse)	Examinatrice
Stéphanie TOURON (Dr, USR LRMH, Champs-sur-Marne)	Examinatrice
Isabelle PALLOT-FROSSARD (Directrice USR LRMH, Champs-sur-Marne)	Membre invité

Remerciements

Pour commencer je tiens à remercier les membres du jury, Vincent Gloaguen, Michel Denis, Geneviève Pinçon, Stéphanie Touron et Isabelle Pallot-Frossard, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Ces quatre années de thèse passées en territoire Bisontin, tout Périgourdin que je suis, ont été réalisées grâce à l'appui et à la volonté de beaucoup de personnes.

Tout d'abord, merci à Badr Alaoui-Sossé, mon encadrant principal de thèse, pour m'avoir permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions possibles. Je retiendrais surtout de vous votre enthousiasme pour ce projet, que vous avez su me transmettre. Merci pour votre encadrement scientifique, établi avec rigueur et permettant une bonne avancée des travaux tout au long de la thèse. Vous faites partie avec Faisl Bousta des deux personnes qui ont pensé et monté ce projet. Merci de m'avoir intégré dans ce projet qui me rappelait mes origines géographiques (la très célèbre grotte de Lascaux se situe en Dordogne !) et m'a permis de travailler sur une thématique qui m'a toujours plu et fasciné : la conservation du patrimoine.

La deuxième personne que je souhaite remercier est Faisl Bousta, le second acteur et encadrant de ce projet, qui l'a également pensé et façonné. Merci Faisl pour m'avoir fait confiance dans la réalisation de ce travail. Merci également pour m'avoir ouvert une piste sérieuse dans le domaine de la science au service de la conservation du patrimoine. Mes venues au LRMH et nos discussions sur Besançon ont toujours été dictées par la bonne humeur et la rigueur scientifique, je vous en remercie.

La troisième personne que je tiens à remercier est Lotfi Aleya, mon directeur de thèse. Lotfi, tu as pris le train en cours de route comme on dit. Un changement de directeur au cours de la thèse a permis de t'intégrer dans l'équipe. Dès lors, tu m'as appris et inculqué ce qu'était l'esprit scientifique. Merci à toi pour ton implication, ton aide et tes nombreux conseils qui m'ont permis de murir scientifiquement, de comprendre les rouages de la recherche et de la rédaction d'articles scientifiques. Tu es un passionné de la recherche et tu as réussi à me le transmettre.

Un grand merci à toi Dom, ou lapin comme tu préfères ! Merci mille fois pour ton aide et ton implication durant toutes ces années. Les sessions de terrain à la grotte des Moidons que nous avons effectuées ensemble ont été enrichies par un dévouement sans faille de ta part. Tes précieux conseils et ton soutien moral m'ont sans cesse aidé à garder le cap. Mais en dehors de l'aspect professionnel je tiens à t'exprimer toute la satisfaction que j'ai eue à faire ta connaissance, tant humaine que musicale. Les discussions riches que nous avons toujours développées ensemble et cette synergie dans la pratique de la musique, c'est cela aussi qui m'a permis d'exercer mon travail dans des conditions plus qu'idéales. « Se vider la tête mais pas l'esprit » : très important dans une épreuve comme celle de la thèse. Merci Dom !

Je tiens à exprimer un immense merci aux propriétaires de la grotte des Moidons : Isabelle et François Gauthier-Rohr. Que dire de votre implication dans ce projet... Tout simplement que tout ceci n'aurait pas été possible sans votre aide. Merci de m'avoir ouvert les portes de votre « cave » (grotte en anglais). On n'y trouve pas de vin (peut-être bientôt de

la bière, hein Victor !) mais une ambiance minérale nourrit de « plics et de plocs » aussi agréable en été qu'en hiver. Merci de votre sensibilité et de tout l'intérêt que vous avez porté à ce projet et qui m'ont permis de mener à bien mes expériences.

Merci Laurence Alaoui-Sehmer pour ton soutien lors des manipes expérimentales et des sessions de terrain menées dans la grotte des Moidons. Merci également pour tes relectures et corrections d'articles et du manuscrit.

Merci à Marie Le-Jean pour avoir largement participé à ce projet lors de la première année de thèse. Marie, un grand merci à toi pour m'avoir appris à faire de la biomol. Certes les résultats ont été peu fructueux mais je te remercie avant tout pour ta sympathie, ta patience et tous les conseils que tu m'as donnés pour réaliser mes expériences. Merci également pour tes relectures de mon tout premier article, elles ont été précieuses.

Merci à tous ceux du LRMH avec qui j'ai travaillé, échangé et discuté de mes travaux : Geneviève Orial, Alexandre François, Stéphanie Tournon, Witold Nowik et Jean-Didier Mertz. Merci à vous tous pour m'avoir appris les techniques utilisées en microbiologie, à me servir d'appareil comme le diffractomètre de rayons X ou l'HPLC, pour m'avoir enseigné les bases solides de la conservation du patrimoine et également pour avoir consacré et donné de votre temps au bon déroulement de mes venues dans votre laboratoire. Je remercie également Isabelle Pallot-Frossard pour m'avoir accueilli dans les locaux du LRMH.

Merci à Didier Cailhol pour son importante participation aux études de terrain, notamment pour la réalisation de la cartographie de la grotte des Moidons. Merci d'avoir soutenu ce projet et merci également pour ta collaboration dans la rédaction du 2^{ème} article. Enfin, je retiendrai certaines phrases comme « Quelle belle faille ! » ou encore « regardez-moi ce beau décrochement 'sinistre' » sur lesquelles nous avons bien rigolé lors de notre voyage en Slovénie en compagnie de Praezis, Cybèle, Alain et Cécile.

Merci à Nadia Crini, Caroline Amiot et Coline Druart pour l'analyse des éléments minéraux dans les échantillons d'eau et de sol de la grotte des Moidons.

Merci à Sylvain Collin pour m'avoir donné accès aux données de CO₂ de la grotte des Moidons.

Merci à toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont aidé à réaliser mes travaux et mener à bien mes expériences : Naoufal Raouf, Mohammed Bouriou, Fabienne Tatin-Froux, Frédéric Grenouillet, Gabriel Reboux, Didier Convert, Nicolas Rouge, Michel Denis, Serge Nitsche, Virginie Mougey, Michel Chalot...

Merci à PE, Nico, Leslie, Anne-Claude, Axelle, Anne, Victor, Steffi, Pierre, Séverine, Manon, Coline, JC, Aurélien, Pauline, Pierline, Ben, Cybèle, Marlène, Geoffroy, Micka, Anne-Laure... On sait tous ce qu'est la vie de thésard (ou « The Sard » je ne sais plus...), que ce n'est pas un « hobby » (ça dépend pour qui !), qu'il faut se lever tôt pour y arriver et ne pas raconter trop de « salades » ! Heureusement il y avait le curling (Axelle M... !! Merci à tous les membres du club), les pauses café, les parties de pêche, les spectacles de danse, la musique, les visites de grottes slovènes... Merci aussi à tous mes potes de Bezac et des quatre coins de la France (Fred, Véro, Frésou, Lise, Ben et tous ceux de la promo master, Pedro,

Marine, Nico, Romain, Nina, Aurel, sylvain, Fabien...).

Un grand merci à tous les colocs (Maud, Clem, Kate, Livio, Hugo, Coucouz) et anciens colocs (Fab, Léli, Jéli...) pour m'avoir soutenu les soirs après le boulot et motivé pour le jour J.

Enfin, merci à ma famille (Pa, Nad, Marine, Sa, Oliv, Evan, Marie...) pour m'avoir soutenu à distance durant ces 4 années ou de plus près le jour de la soutenance.

Sommaire

Liste des figures	15
Liste des tableaux	25
Avant-propos	27
Valorisation scientifique	29
I. INTRODUCTION GÉNÉRALE	31
I.1. La prolifération des micro-algues vertes sur les matériaux en pierre	33
I.1.1. Caractéristiques des micro-algues vertes.....	34
I.1.2. Diversité, stratégies de colonisation et succès écologique	37
I.1.3. Organisation des algues en biofilm	42
I.1.4. Les différentes formes de biodétérioration	44
I.1.5. Méthodes et moyens pour lutter contre la biodétérioration de la pierre.....	48
I.2. Les grottes touristiques : un contexte particulier de conservation....	53
I.2.1. Caractéristiques générales d'une grotte.....	53
I.2.2. Exploitation touristique des grottes	56
<i>I.2.2.1. Perturbations des paramètres climatiques</i>	<i>56</i>
<i>I.2.2.2. Perturbations biologiques : la prolifération des micro-organismes photosynthétiques.....</i>	<i>58</i>
I.2.3. Méthodes et moyens pour lutter contre les perturbations biologiques	64
<i>I.2.3.1. Méthodes préventives.....</i>	<i>64</i>
<i>I.2.3.2. Méthodes curatives</i>	<i>65</i>
<i>I.2.3.3. Méthodes alternatives</i>	<i>67</i>
I.3. Le rayonnement ultraviolet	69
I.3.1. Définition et caractéristiques	69
I.3.2. Effets sur les organismes vivants	70

I.3.2.1. Contexte(s) scientifique(s)	70
I.3.2.2. Effets, dommages et réponses observés	71
I.3.3. Domaines d'applications	81
I.4. Contexte et démarche scientifique de la thèse	83
I.5. Objectifs de la thèse	85
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	89
II.1. Expérimentations menées en conditions contrôlées.....	91
II.1.1. Les micro-algues vertes.....	91
II.1.1.1. Nature et provenance des algues.....	91
II.1.1.2. Conditions de culture des algues.....	94
II.1.1.3. Paramètres mesurés et méthodes d'analyses	96
II.1.2. Les champignons filamenteux.....	106
II.1.2.1. Nature et provenance des champignons filamenteux.....	106
II.1.2.2. Conditions de culture des champignons.....	106
II.1.2.3. Paramètres mesurés et méthodes d'analyses	107
II.1.3. Les matières picturales et pigments colorés.....	108
II.1.3.1. Nature et provenance	108
II.1.3.2. Paramètres mesurés et méthodes d'analyse.....	109
II.1.4. Conditions expérimentales d'exposition aux UV-C	110
II.1.4.1. Matériels d'exposition.....	110
II.1.4.2. Réglages des paramètres d'exposition	110
II.1.4.3. Mesure des UV-C	113
II.1.4.4. Traitements appliqués	113
II.2. Expérimentations menées sur le terrain	115
II.2.1. Présentation du site d'étude : la grotte des Moidons.....	115
II.2.1.1. Situation géographique et statut juridique	115
II.2.1.2. Description du site et caractéristiques générales	116
II.2.2. Paramètres mesurés et méthodes d'analyses.....	119
II.2.2.1. Cartographie et topographie de la grotte	119

II.2.2.2. Mesures des paramètres abiotiques à l'échelle de la cavité.....	119
II.2.2.3. Mesures à l'échelle du biofilm	120
II.2.2.4. Analyses des communautés microbiennes par cytométrie en flux et microscopie électronique	121
II.2.3. Conditions expérimentales d'exposition aux UV-C	122
III. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	123
III.1. Chapitre 1 : Etudes et analyses au laboratoire de l'effet du rayonnement UV-C sur plusieurs souches de micro-algues vertes	125
III.1.1. Effets des UV-C sur les paramètres physiologiques et macroscopiques des algues cultivées en milieu liquide et sur support solide (Article 1).....	126
III.1.1.1. Introduction.....	127
III.1.1.2. Material and methods	128
III.1.1.3. Results	132
III.1.1.4. Discussion	135
III.1.1.5. Conclusion	138
III.1.2. Effets des UV-C au niveau du contenu pigmentaire.....	141
III.1.2.1. Conditions expérimentales et dosages des pigments	141
III.1.2.2. Résultats	142
III.1.2.3. Discussion des résultats	143
III.1.3. Synthèse du chapitre 1	148
III.2. Chapitre 2 : Etudes et analyses au laboratoire de l'effet du rayonnement UV-C sur <i>Chlorella minutissima</i> prélevée sur le site d'étude de la grotte des Moidons	151
III.2.1. Adaptation physiologique de <i>C. minutissima</i> en fonction des conditions de culture	152
III.2.1.1. Conditions expérimentales	152
III.2.1.2. Résultats et discussion	152
III.2.1.3. Conclusion et remarques	157
III.2.2. Analyses à l'échelle cellulaire de l'effet de doses / durées croissantes d'UV-C chez <i>C. minutissima</i>	158
III.2.2.1. Conditions expérimentales	158
III.2.2.2. Résultats	159

III.2.2.3. <i>Discussion des résultats</i>	162
III.2.2.4. <i>Conclusion et remarques</i>	163
III.2.3. Dommages cellulaires et moléculaires observés chez <i>Chlorella minutissima</i> exposée à de fortes doses d'UV-C (Article 2)	164
III.2.3.1. <i>Introduction</i>	167
III.2.3.2. <i>Materials and methods</i>	169
III.2.3.3. <i>Results</i>	177
III.2.3.4. <i>Discussion</i>	190
III.2.3.5. <i>Conclusion</i>	195
III.2.4. Expériences et analyses complémentaires menées à l'échelle du biofilm.....	201
III.2.4.1. <i>Résultats et discussion</i>	201
III.2.4.2. <i>Conclusion et remarques</i>	209
III.2.5. Synthèse du chapitre 2	211
III.3. Chapitre 3 : Etudes et analyses menées <i>in-situ</i> dans la grotte des Moidons	213
III.3.1. Etude des facteurs influençant la colonisation algale dans la grotte des Moidons et applications de traitements UV-C sur plusieurs biofilms verts (Article 3).....	214
III.3.1.1. <i>Introduction</i>	215
III.3.1.2. <i>Materials and methods</i>	218
III.3.1.3. <i>Results</i>	225
III.3.1.4. <i>Discussion</i>	232
III.3.1.5. <i>Conclusion</i>	237
III.3.2. Suivis photographiques des biofilms traités aux UV-C dans la grotte des Moidons	242
III.3.3. Analyses préliminaires des communautés microbiennes de la grotte des Moidons par cytométrie en flux	245
III.3.4. Synthèse du Chapitre 3	250
III.4. Chapitre 4 : Approche complémentaire de l'effet des UV-C sur deux souches de champignons filamenteux et plusieurs matières picturales	253
III.4.1. Effet des UV-C sur les champignons.....	254
III.4.1.1. <i>Dénombrement des Unités Formant Colonie (UFC)</i>	254
III.4.1.2. <i>Suivi de la prolifération</i>	255

III.4.2. Effet des UV-C sur les matières picturales	258
III.4.2.1. Analyse de la structure minéralogique par diffractométrie de rayons X..	258
III.4.2.2. Analyse de la couleur par spectrocolorimétrie	260
III.4.2.3. Discussion des résultats	261
III.4.3. Synthèse du chapitre 4	263
IV. CONCLUSION GÉNÉRALE.....	265
IV.1. Approche théorique au laboratoire.....	267
IV.1.1. Effet des UV-C sur des souches cavernicoles de micro-algues vertes	267
IV.1.2. Effets directs et indirects des UV-C et relations entre les différents niveaux d'organisation biologique	268
IV.2. Approche pratique sur le terrain	270
IV.2.1. Etude des facteurs de colonisation et efficacité des traitements UV-C	270
IV.2.2. Intérêts de l'utilisation des traitements UV-C comme méthode alternative aux produits chimiques	273
V. PERSPECTIVES DE TRAVAIL.....	275
V.1. Etudes et analyses en conditions contrôlées au laboratoire	277
V.2. Etudes et analyses <i>in-situ</i> et application de la méthode dans des contextes variés	279
VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	281
VII. ANNEXES.....	305

Liste des figures

Introduction générale

- Figure I.1-1: Exemples de colonisation biologique sur différents types de matériau en pierre. A : statue en marbre des jardins du Palace National de Queluz (Portugal) colonisée par des lichens (Miller *et al.*, 2012). B : différentes façades et structures de bâtiments modernes en France colonisés par les algues (Barberousse *et al.*, 2007). C : Biofilms d'algues et de cyanobactéries colonisant une paroi calcaire dans la grotte de Zuheros à Cordoba en Espagne (Albertano, 2012). 33
- Figure I.1-2 : Diversité morphologique des algues et des cyanobactéries colonisant les façades de bâtiments en France. Les barres d'échelles sont fixées à 10 μm pour chaque illustration. D'après Barberousse *et al.*, 2006, modifiée. 36
- Figure I.1-3 : Principe général de la photosynthèse se déroulant au sein du chloroplaste de la cellule végétale. . 36
- Figure I.1-4 : Exemples de populations de *Klebsormidium* en habitats urbains en Europe. (a) Développement sur la base d'un mur à Pise. (b) Population se développant sur une surface bétonnée, Pavia. (c) Population formant une ceinture de plusieurs mètres de long à la base d'un mur à Pise. (d) Population se formant entre les pavés, Pise. D'après Rindi *et al.* (2008). 37
- Figure I.1-5 : Principe général de la formation d'un biofilm. (d'après site internet 1). 43
- Figure I.1-6 : Coupe d'un échantillon de calcite dont la surface externe est couverte par des exo-polysaccharides (EPS). D'après Jones, 2010. 43
- Figure I.1-7 : Changements de couleur donné au support selon le type de micro-organismes. A : patch d'algues vertes sur une église à Belfast (Cutler *et al.*, 2013a). B : Biofilms noirs composés de cyanobactéries colonisant une sculpture dans un temple Hindou (Albertano, 2012). 45
- Figure I.1-8 : Schéma théorique du phénomène de colonisation biologique sur les matériaux en pierre vue comme un écosystème (Villa Cimbrone, Ravello, photo de G. Caneva, d'après Caneva *et al.*, 2008). 47
- Figure I.1-9 : Schéma synthétique des différentes voies de biodétérioration causées par les organismes vivants. D'après Dakal et Cameotra (2012), modifié. 48
- Figure I.2-1 : Spots lumineux installés dans la grotte des Moidons (Jura, France). A : lampe à incandescence de 120 W (notez la présence de tâches vertes au-dessus du spot). B : lampe halogène de 500 W. 58
- Figure I.2-2 : Encrassement biologique par les algues dans les grottes. A : algues se développant sur une formation carbonatée de la grotte des Moidons (Jura, France). B : Communautés de phototrophes sur le sol

de la grotte de Postojnska (Slovénie) (Mulec, 2012). C : Verdissement du sol calcaire de la grotte de Postojnska (Slovénie) dû à la présence des algues (Mulec, 2014). D : Développement de biofilms verts sur des peintures Byzantines dans la Crypte du Péché Originel (Matera, Italie) (Nugari *et al.*, 2009). 62

Figure I.3-1: Position du rayonnement ultraviolet dans le spectre électromagnétique. D’après Yin *et al.*, 2013 et site internet 3. 69

Figure I.3-2 : Changements morphologiques et fragmentation de l’ADN observés sur un gel d’électrophorèse après différentes doses d’UV-C (en $J m^{-2}$) et temps d’incubation après exposition (en heures). D’après Moharikar *et al.*, 2006, modifiée. 73

Figure I.3-3 : Effets immédiats et à long terme des UV-C sur la chaîne de transfert d’électrons et la teneur en chlorophylle *a* d’une espèce de cyanobactérie, *Mycrocystis aeruginosa*. D’après Ou *et al.*, 2012..... 75

Figure I.3-4 : Spectre d’absorption des chlorophylles *a* et *b* en fonction du temps d’exposition aux UV-C. (0) 0 ; (1) 0,5 ; (2) 1 ; (3) 1,5 ; (4) 2 ; (5) 3 et (6) 10 minutes. B-band et Q-band correspondent aux deux pics d’absorption des chlorophylles *a* et *b*. D’après Zvezdanović *et al.* (2009)..... 76

Figure I.3-5 : Synthèse des différents effets des UV-C observés chez les algues et cyanobactéries en fonction du niveau d’organisation biologique. 78

Figure I.5-1 : Schéma synthétique présentant les principaux objectifs de la thèse 87

Matériels et méthodes

Figure II.1-1 : Localisation des sites de prélèvement des échantillons d’algues..... 92

Figure II.1-2 : Localisation et photographies des prélèvements de *Chlorella minutissima* dans la grotte des Moidons. Photo a : biofilm de micro-organismes phototrophes se développant sur une formation carbonatée de la grotte des Moidons ; photo b : *C. minutissima* vu par microscopie optique ; photo c : *C. minutissima* vu par microscopie électronique à balayage (MEB)..... 93

Figure II.1-3 : Principe général du repiquage des algues. 95

Figure II.1-4 : Protocole d’ensemencement des algues sur support solide..... 96

Figure II.1-5 : Schéma de la zone de comptage d’une cellule de Malassez. 97

Figure II.1-6 : Courbe étalon des concentrations en H_2O_2 en fonction de la densité optique à 560 nm..... 100

Figure II.1-7 : Méthode de « Thresholding » sur image en noir et blanc utilisée dans le Chapitre 1 pour mesurer le pourcentage de recouvrement des biofilms d’algues cultivés sur support solide..... 102

Figure II.1-8 : Méthode de « Thresholding » sur image en couleur utilisée dans le Chapitre 2 pour mesurer la surface de colonisation des biofilms d’algues cultivés sur support solide. Les cercles rouges indiquent la qualité et la précision des paramètres de contraste choisis.	103
Figure II.1-9 : Appareil de mesure de la couleur, représentation schématisée de l’espace colorimétrique L*a*b* et méthode de mesure moyennée sur biofilm.	104
Figure II.1-10 : Culture des champignons sur milieu gélosé. A : <i>Verticilium</i> sp. B : <i>Ulocladium</i> sp.	107
Figure II.1-11 : Principe schématisé du dénombrement des Unité Formant Colonies (UFC).	108
Figure II.1-12 : Méthode de mesure de la couleur sur les échantillons d’oxydes de fer.	110
Figure II.1-13 : Matériel d’exposition aux UV-C. A : grande UV-C box (exposition au laboratoire et sur le terrain). B : petite UV-C box (exposition sur le terrain).	111
Figure II.1-14 : Suivi de la température et du pourcentage d’humidité lors des expositions aux UV-C en enceinte de culture. Flèche rouge : allumage. Flèche verte : extinction des néons UV-C.	113
Figure II.2-1 : Situation géographique du site d’étude de la grotte des Moidons.	115
Figure II.2-2 : Cartographie et topographie de la grotte des Moidons.	117
Figure II.2-3 : Photographies du site d’étude de la grotte des Moidons.	118
Figure II.2-4 : Localisation des prélèvements d’eau et de sol pour l’analyse des éléments minéraux. S : prélèvement de sol ; E : prélèvement d’eau.	120
Figure II.2-5 : Localisation des prélèvements effectués sur des biofilms verts pour les analyses des communautés microbiennes par cytométrie en flux.	121
Figure II.2-6 : Système d’exposition aux UV-C sur la zone LwB (biofilm proliférant sur une paroi calcaire dans la Galerie Sud).	122

Résultats et discussion

Figure III.1-1: Technical cultures of algae and exposure chamber. A: algal in freshwater BG11 in Erlenmeyer on agitator, B: algal inoculation on limestone blocks disposed on humid vermiculite for keep constant humidity rate, C: exposure chamber and irradiated samples of algae.	130
--	-----

Figure III.1-2: Viability and photosynthesis rate inhibition of algal cells according to the UV-C exposure time. Stars represent significant differences with Anova test compared to control sample at $p < 0.05$ for *, $p < 0.01$ for ** and $p < 0.001$ for ***. 133

Figure III.1-3: Control and exposed (180 min of UV-C) samples. A: just after exposition, B: 2 weeks later after re-sowing in fresh culture medium. 134

Figure III.1-4: Effect of UV-C exposure on algae colonized area for control samples (A) and exposed samples (B). White: colonized areas measured closely after the deposition, grey: colonized areas determined after 1 week of growth. Numbers in x-axis represent exposure time in hours. HL: High Light. Star represents significant difference with Anova test at $p < 0.05$. Error bars are \pm SE values for triplicates. (For more information about treatments, see Table 1). 134

Figure III.1-5: Effect of UV-C exposure on algae covering rate for control samples (A) and exposed samples (B). White: covering rate measured closely after the deposition, grey: covering rate determined after 1 week of growth. Numbers in x-axis represent exposure time in hours. HL: High Light. Stars represent significant differences with Anova test at $p < 0.05$ for *, $p < 0.01$ for ** and $p < 0.001$ for ***. Error bars are \pm SE values for triplicates. (For more information about treatments, see Table 1). 135

Figure III.1-6 : Teneurs en pigments des algues exposées à des durées croissantes d'UV-C. Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$). Les étoiles représentent des différences significatives à $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.001$ (***) par rapport au jour 0 (test de Tukey HSD)..... 143

Figure III.2-1 : Courbes de croissance de *C. minutissima* cultivée en conditions « optimales ». 1 : phase de latence et d'accélération. 2 : phase exponentielle. 3 : phase stationnaire. Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$)..... 153

Figure III.2-2 : Courbes de croissance de *C. minutissima* cultivée en conditions « grottes ». 1 : phase de latence et d'accélération. 2 : phase exponentielle. Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$). 154

Figure III.2-3 : Comparaison des courbes de croissance de *C. minutissima* cultivée en conditions « grottes » en fonction de la quantité de nutriments dans le milieu. BG11 1x : quantité normale de nutriments. BG11 0,01x : quantité faible en nutriment. Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$). Les étoiles représentent des différences significatives entre traitements pour un jour donné à $p < 0,01$ (**) (test t). . 155

Figure III.2-4 : Suivi dans le temps des rapports Chla / Chlb chez *C. minutissima*. A : conditions de culture « optimales ». B : conditions de culture « grottes ». Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$). Des lettres différentes indiquent une différence significative en fonction du jour de mesure à $p < 0,05$ (test de Friedmanmc pour échantillons appariés). 157

Figure III.2-5 : Nombre de cellules vivantes (en millions) chez *C. minutissima* exposée à des doses / durées croissantes d'exposition aux UV-C. Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$). Les étoiles

représentent des différences significatives à $p < 0,05$ (*) et $p < 0.001$ (***) par rapport à l'échantillon témoin (test de Tukey HSD)..... 159

Figure III.2-6 : Mesure des échanges d'oxygène ($\text{nmol d'O}_2 \cdot 10^6 \text{ cellules}^{-1} \text{ h}^{-1}$) chez *C. minutissima* exposée à des durées / doses croissantes d'UV-C. Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n=3$). Les étoiles représentent des différences significatives à $p < 0,05$ (*) et $p < 0.001$ (***) par rapport au jour 0 (test de Tukey HSD). 160

Figure III.2-7 : Teneurs en pigments chez *C. minutissima* exposée à des doses / durées croissantes d'exposition aux UV-C. A : teneurs en chlorophylle a ($\mu\text{g ml}^{-1}$). B : teneurs en chlorophylle b ($\mu\text{g ml}^{-1}$). Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n=3$). Les étoiles représentent des différences significatives à $p < 0,05$ (*), $p < 0.01$ (**) et $p < 0.001$ (***) par rapport au jour 0 (test de Tukey HSD). 161

Figure III.2-8: Graphical abstract..... 165

Figure III.2-9 : Section and plan of the Moidons Cave (Jura, France). The star represents the sampling location of *Chlorella minutissima*. The circles and triangles represent water sampling and CO_2 measurements, respectively. The numbers correspond to the pictures below the map: 1) green biofilm on stalagmite (South Gallery), 2) green biofilm on limestone formation (Main Chamber), 3) green biofilm on clay soil (Main Chamber) and 4) green spots on draperies (North Gallery)..... 171

Figure III.2-10 : Experimental design of the UV-C treatments and the sampling strategy. C: control (without UV-C exposure); 1E4: one exposure of 4 h; 2E4: two exposures of 4 h; 1E8: one exposure of 8 h; and 2E8: two exposures of 8 h. The white arrows indicate UV-C exposures (prior to day 0 and prior to day 14). Triplicate measures ($n=3$) were performed every seven days on days 0, 7, 14 and 21..... 173

Figure III.2-11 : Absorption spectra of the pigment extracts. (1): control; (2): 1E4 on day 0; (3): 1E8 on day 0; (4): 1E4 on day 7 and (5): 1E8 on day 7. B-band: blue region and Q-band: red region. Black arrows indicate a decrease in absorbance, which is referred to as the "hypochromic effect". 179

Figure III.2-12 : Kinetic plots of total chlorophyll bleaching according to time after UV-C irradiation. The values on the y-axis are \log_{10} -transformed + 1. The lines represent linear regressions for UV-C treatments (black line: C; continuous blue line: 1E4; dashed blue line: 2E4; continuous red line: 1E8; and dashed red line: 2E8). Triplicates have been used for each treatment. The table lists the slope and correlation coefficient R^2 for each linear regression..... 181

Figure III.2-13 : Photographs of pigment extracts in methanol with optical density measurements for control and UV-C treated samples according to time. 182

Figure III.2-14 : Oxygen exchanges according to time after UV-C irradiation (days). The black circles correspond to the control samples (mean \pm S.E., $n=3$). The bars represent UV-C treatments (mean \pm S.E.,

- n=3, refer to legend for day 0). Values below zero correspond to respiration (O₂ uptake); values above zero correspond to photosynthesis (O₂ release)..... 184
- Figure III.2-15 : Fluorescence microscopy and flow cytometry analysis for both control and UV-C treated cells with different UV-C exposure times. Graph A: visualization of algal cells in phase contrast and DAPI filter after Hoechst staining. DAPI filter pictures are “black and white” and “invert” transformed with ImageJ software. The black arrows indicate normal nuclei in C and the presence of internucleosomal fragments in 1E4. Graph B: results after TUNEL staining and cytometry analysis. Different letters indicate significant differences at $p < 0.01$ with Tukey HSD after ANOVA test. Values are mean \pm S.E. (n=6). 187
- Figure III.2-16 : Relationships between oxidative stress and DNA breaks. The black circles represent the H₂O₂ concentration (left y-axis) and the grey bars represent TUNEL positive cells (right y-axis). Different letters indicate significant differences among treatments for H₂O₂ concentration (mean \pm S.E., n=3) ($p < 0.05$, Tukey HSD after ANOVA test). The inserted graph represents the linear relation between H₂O₂ concentrations and TUNEL positive cells (values are log₁₀+1 transformed). 188
- Figure III.2-17 : UV-C irradiation on a selected biofilm in the Moidons Cave. A: colorimetric measurement according to time after UV-C treatment. The dashed red line represents the limit between the red and green measurements (the positive a* is red and the negative a* is green). The stars indicate significant differences compared with the REF value (Friedmanmc test). B: photographic monitoring before and after treatment. The red squares represent treated and measured areas. The white arrow denotes the re-colonization phenomenon..... 189
- Figure III.2-18 : Relation entre les coordonnées colorimétriques L*, a* et b* et (A) le nombre de cellules d’algues, (B) les teneurs en Chl*a* et (C) les teneurs en Chl*b*. Les lignes en pointillées représentent les droites de régression linéaire (paramètres et significativité présentées dans le Tableau III.2-4)..... 201
- Figure III.2-19 : Schéma synthétique des relations entre la couleur, le nombre de cellules et les teneurs en Chl*a* et Chl*b*. Légende des photographies : 6 (a), 13 (b), 25 (c), 50 (d) et 100 x 10⁷ cellules (e). 203
- Figure III.2-20 : Suivi dans le temps de la surface de colonisation et des paramètres colorimétriques des biofilms d’algues. A : surface de colonisation en cm²; B : paramètre L* ; C : paramètre a*. Axe des abscisses : temps en jours. Cercles blancs : échantillons témoins ; ronds bleus : échantillons exposés à 4 h d’UV-C ; ronds rouges : échantillons exposés à 8 h d’UV-C. Flèches orange : traitements UV-C (entre le jour 0 et le jour 1). Les lignes pointillées représentent les droites de régression linéaire (les paramètres et significativité de ces droites sont présentés dans le Tableau III.2-5)..... 206
- Figure III.2-21 : Photographies des biofilms d’algues à différents jour de mesure et en fonction du traitement. Les jours 7 et 29 correspondent aux photographies des échantillons témoins et exposés à 4 h d’UV-C ; les jours 8 et 21 correspondent aux échantillons exposés à 8 h d’UV-C. 209

- Figure III.3-1: Localization and plan of the Moidons Cave with selected biofilms for experiments. LrB: biofilm on limestone rock (Main Chamber); LwB1&2: biofilms on limestone wall (South Gallery); StmB: biofilm on stalagmite (South Gallery). See Table 1 for details about the selected biofilms. 220
- Figure III.3-2: Relationships between algae colonization and environmental factors. (A) Colonized areas in cm² (log-transformed) according to localization in the cave. Different letters indicate significant differences (pairwise comparisons, Tukey HSD test). (B) Functional dynamics (air currents and water circulation) and tourism-dependent factors (human presence and illumination time) according to cave localization. Water circulation includes horizontal circulation (drainage system) and vertical seepage. Parameters are classified as none (N), very low (- -), low (-), moderate (+) or high (++). The dashed square represents an uncolonized and unvisited portion of the cave. 228
- Figure III.3-3: Scatter plots of spectrophotometric data for both the uncolonized and colonized surfaces. x-axis: green-red scale; y-axis: dark-light scale. Circles: biofilm on limestone wall (LwB1, n=20); triangles: biofilm on stalagmite (StmB, n=12). The dashed red lines represent the limits between dark and light measurements (horizontal line) and between green and red measurements (vertical line). The statistical results for these data are presented in Table 2. 230
- Figure III.3-4: Colorimetric measurements according to post-UV-C irradiation period for the control and treated biofilms on the limestone wall and stalagmite. LwB1: untreated biofilm on limestone wall, n=20; LwB2: treated biofilm on limestone wall, n=25; StmB: treated biofilm on stalagmite, n=12. REF corresponds to the measurement performed before UV-C treatment and the dashed red line represents the limit between the green and red measurements. The stars represent significant differences compared to the REF value (Friedman multiple-comparison test for paired samples, $p < 0.05$) and ns means non-significant. 231
- Figure III.3-5: Colorimetric measurements according to post-UV-C irradiation period for LrB. LrB: treated biofilm on limestone rock, n=30. REF corresponds to the measurement performed before UV-C treatment, and the dashed red line represents the limit between the green and red measurements. The stars represent significant differences compared to the REF value (Friedman multiple-comparison test for paired samples, $p < 0.05$), and the pictures represent LrB at different times. The white arrows indicate the re-colonized area during the post-UV-C irradiation period. 232
- Figure III.3-6 : Suivi photographique des zones LwB1 et LwB2. LwB1 : biofilm d'algues témoin sur une paroi calcaire. LwB2 : biofilms d'algues traité aux UV-C sur la même paroi calcaire (8 h, 180 kJ m⁻²). 242
- Figure III.3-7 : Suivi photographique du biofilm StmB se développant sur une stalagmite. Traitement UV-C : 8 h, 180 kJ m⁻². Les flèches blanches indiquent des zones où la couleur verte persiste après traitement. 243
- Figure III.3-8 : Abondances du phytoplancton en fonction des biofilms échantillonnés. Les nombres entourés correspondent aux zones pour lesquelles nous avons observé la présence de Chlorophycées de petite taille.

Les cytogrammes du phytoplancton des zones 9, 14 et 18 ont été sélectionnés (les flèches rouges montrent la détection des Chlorophycées et les flèches noires celle des Cyanobactéries).....	246
Figure III.3-9 : Photographies en microscopie électronique à balayage de cellules de Chlorophycées (potentiellement <i>C. minutissima</i>) prélevées sur la zone 14. A : cellule seule. B : cellules groupées.....	247
Figure III.3-10 : Cytogrammes du phytoplancton des zones 15, 16 et 17. Les flèches rouges indiquent les groupes de picophytoplancton (Prochlorophycées ou picoeucaryotes). Les flèches noires indiquent les groupes de cyanobactéries.	248
Figure III.4-1 : Dénombrement des Unités Formant Colonie (UFC) pour <i>Verticilium sp.</i> et <i>Ulocladium sp.</i> en conditions témoins et exposées à 15 h d'UV-C. Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types (\log_{10} transformées, $n = 3$). Les étoiles représentent une différence significative à 0,01 (Test de Tukey HSD). 254	254
Figure III.4-2 : Suivi de la surface de colonisation de <i>Verticilium sp.</i> exposé ou non au rayonnement UV-C. Les traitements UV-C ont été effectués directement après la mesure au jour 0. Des lettres différentes indiquent une différence significative à $p < 0,05$ entre les différents traitements pour un jour donné	256
Figure III.4-3 : Photographies de l'évolution de la surface d'occupation des pastilles de champignons sur milieu gélosé au jour 0 (avant le traitement UV-C) et au jour 2 (après le traitement UV-C) en fonction du traitement. Correspondances des durées d'exposition en kJ m^{-2} : 3 h 30 min = 105 kJ m^{-2} ; 7 h = 210 kJ m^{-2}	257
Figure III.4-4 : Diagrammes de diffraction obtenus par diffractométrie de rayons X. A : oxyde de fer rouge. B : oxyde de fer jaune. C : ocre jaune. La courbe noire représente l'échantillon avant l'irradiation aux UV-C et la courbe orange représente le même échantillon après une irradiation de 13 h aux UV-C (lumière continue, 100 W, $655,2 \text{ kJ m}^{-2}$).	259
Figure III.4-5 : Diagrammes de diffraction obtenus par diffractométrie de rayons X. A : noir d'os. B : oxyde de manganèse. La courbe noire représente l'échantillon avant l'irradiation aux UV-C et la courbe orange représente le même échantillon après une irradiation de 13 h aux UV-C (lumière continue, 100 W, $655,2 \text{ kJ m}^{-2}$).	259
Figure III.4-6 : Mesure des paramètres colorimétriques L^* , a^* et b^* en fonction des traitements appliqués pour les échantillons d'oxyde de fer rouge (A) et oxyde de fer jaune (B). Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$).....	260
Figure III.4-7 : Courbes d'absorbance en fonction de la longueur d'onde (400 – 700 nm) des échantillons d'oxyde de fer rouge (A) et oxyde de fer jaune (B) traités ou non aux UV-C. UV-C 1 : 8 h d'exposition (400 kJ m^{-2}). UV-C 2 : 184 h d'exposition (9200 kJ m^{-2}). Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$).	262

Conclusion générale

- Figure IV.1-1 : Schéma synthétique des différents dommages causés par les UV-C (directs et indirects) et des relations entre les différents niveaux d'organisation biologique pour le modèle d'étude micro-algues vertes. Les flèches pointillées de couleur rouge représentent les dommages directs (réaction de photooxydation). Les flèches de couleur verte montrent les voies et effets du stress oxydatif. Les flèches de couleur bleu indiquent les relations causes à effets entre les différents constituants et compartiments biologiques. Les flèches pointillées de couleur orange représentent les mécanismes non étudiés et/ou proposés en perspectives. 269
- Figure IV.2-1 : Schéma synthétique regroupant les différentes approches étudiées au cours des expérimentations menées sur le terrain. La flèche pointillée de couleur rouge représente les effets des UV-C synthétisés dans la Figure IV.1-1. Les flèches pleines rouges montrent les effets des UV-C observés sur les biofilms d'algues traités dans la grotte. Les flèches bleues indiquent les relations mises en évidence entre les compartiments « biofilm », « grotte » et « traitements UV-C ». Les flèches pointillées de couleur orange mettent en avant des approches non étudiées et proposées en perspectives. 271
- Figure V.1-1 : Système en circuit fermé de culture d'algues sur support solide. D'après De Muynck *et al.* (2009). 278

Liste des tableaux

Introduction générale

Tableau I.1-1 : Exemples d'études menées sur les algues colonisant les façades de bâtiments et monuments historiques.	40
Tableau I.1-2 : Liste des biocides les plus fréquemment utilisés pour éliminer les algues. D'après Caneva <i>et al.</i> (2008), modifié.	51
Tableau I.2-1 : Facteurs abiotiques et biotiques favorisant l'installation et la prolifération des micro-organismes phototrophes dans les grottes.	59

Matériels et méthodes

Tableau II.1-1 : Principales caractéristiques des trois sites de prélèvement des algues du sud-ouest de la France.	92
Tableau II.1-2 : Caractéristiques morphologiques des genres et espèce d'algues identifiées lors du prélèvement dans la grotte des Moidons.	94
Tableau II.1-3 : Paramètres, durée d'exposition et dose d'UV-C reçue des différents traitements UV-C utilisés au cours de la thèse.	112

Résultats et discussion

Table III.1-1 : Exposure time according to algal volumes.	131
Tableau III.1-2 : Correspondances des durées d'exposition aux UV-C utilisées dans le Chapitre 1 en doses reçues (en kJ m ⁻²).	141
Table III.2-1: Physico-chemical characteristics of the Moidons Caves according to the location.	170
Table III.2-2 : Total chlorophyll, carotenoid and oxygen exchanges according to the UV-C treatments and the time after each irradiation.	180
Table III.2-3 : H ₂ O ₂ and MDA concentrations for control and treated samples according to the UV-C treatments and the time after each irradiation.	186

Tableau III.2-4 : Paramètres et significativité des droites de régression linéaire présentées dans la figure Figure III.2-18.....	202
Tableau III.2-5 : Paramètres et significativité des droites de régression linéaire présentées dans la Figure III.2-20.	207
Tableau III.2-6 : Données brutes et résultats statistiques du suivi dans le temps de la surface de colonisation et des paramètres colorimétriques des biofilms d’algues exposés ou non aux UV-C.	208
Table III.3-1: Characteristics of the four selected biofilms with associated experiments.	223
Table III.3-2: Statistical results of colorimetric measurements between uncolonized and colonized surfaces both for LwB1 and StmB.....	229

Avant-propos

Cette thèse concerne l'étude de l'utilisation du rayonnement UV-C comme méthode alternative aux produits chimiques dans la lutte contre la prolifération des micro-organismes responsables des phénomènes de biodétérioration sur les matériaux du patrimoine. Le contexte particulier dans lequel se situe ce travail est celui de la prolifération des communautés de micro-organismes photosynthétiques dans les grottes ouvertes au tourisme. Les travaux ont été réalisés selon deux approches complémentaires :

- une **approche théorique au laboratoire** dans laquelle nous avons étudié les effets du rayonnement UV-C sur des souches cavernicoles de micro-algues vertes à différents niveaux d'organisation biologique ; à cela s'ajoute une partie complémentaire ayant pour but de mettre en évidence les effets potentiels des UV-C sur deux autres modèles d'étude : les champignons et les matières picturales,

- une **approche sur le terrain** dans laquelle nous avons mené différentes expérimentations dans une grotte touristique du département du Jura visant à comprendre les dynamiques de colonisation des algues et à tester l'efficacité des traitements UV-C en conditions réelles.

Cette thèse est le résultat de 4 années de recherche menées au sein du laboratoire Chrono-Environnement (LCE) à l'Université de Franche-Comté. La plupart des expériences, allant de la culture des algues jusqu'aux analyses à l'échelle cellulaire, moléculaire et du biofilm ont été réalisées dans les locaux du LCE. Une partie des résultats a été réalisée dans les locaux du Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques (LRMH), à savoir ceux obtenus sur les champignons et matières picturales. Par ailleurs, certains échantillons ont également été analysés en cytométrie de flux soit à l'IBCT (Ingénierie et Biologie Cellulaire et Tissulaire, IFRR 133) de Besançon, soit à Marseille au PRECYM (Plate-forme Régionale de Cytométrie pour la Microbiologie, MIO UMR 7294). Enfin, les expérimentations et suivis réalisés sur le terrain ont été effectués sur le site de la Grotte des Moidons (département du Jura, commune de Molain).

La réalisation de cette thèse a notamment pu être possible grâce à un cofinancement provenant du Ministère de la Culture et de la Communication (50 %), du Centre National de

la Recherche Scientifique (CNRS) (25 %) ainsi que de la Région Franche-Comté (25 %). Le laboratoire Chrono-Environnement a également participé financièrement à cette étude avec l'attribution de crédits sur le thème Environnement-Santé.

Le manuscrit est divisé en **cinq grandes parties**.

La **1^{ère} partie** correspond à l'introduction générale qui présente les connaissances actuelles sur :

- ❖ la prolifération des micro-algues vertes sur les matériaux en pierre : généralités et principes fondamentaux,
- ❖ les grottes touristiques : un contexte particulier de conservation,
- ❖ le rayonnement ultraviolet : définition, caractéristiques et effets sur les organismes vivants.

A la fin de cette partie le **contexte** et la **démarche scientifique** ainsi que les **objectifs de la thèse** sont présentés.

La **2^{ème} partie** correspond au Matériels et méthodes où sont présentés la nature et la provenance des échantillons ainsi que les conditions expérimentales et analyses effectuées, que ce soit en conditions contrôlées au laboratoire ou sur le site d'étude de la grotte des Moidons.

La **3^{ème} partie** a pour but de présenter et de discuter des résultats obtenus au cours de ce travail. Elle est divisée en quatre chapitres :

- ❖ **Chapitre 1** : Etudes et analyses au laboratoire de l'effet du rayonnement UV-C sur plusieurs souches cavernicoles d'algues vertes provenant du sud-ouest de la France.
- ❖ **Chapitre 2** : Etudes et analyses au laboratoire de l'effet du rayonnement UV-C sur *Chlorella minutissima* prélevée sur le site d'étude de la grotte des Moidons.
- ❖ **Chapitre 3** : Etudes et analyses menées *in-situ* dans la grotte des Moidons.
- ❖ **Chapitre 4** : Approche complémentaire de l'effet des UV-C sur deux souches de champignons filamenteux et plusieurs matières picturales.

La **4^{ème} partie** correspond à une conclusion générale et synthétique des différents résultats obtenus au cours de ce travail.

La **5^{ème} partie** est consacrée aux perspectives proposées à la suite de ce travail.

Valorisation scientifique

Cette thèse a fait l'objet de plusieurs publications dans des journaux internationaux à comité de lecture, d'un chapitre de livre ainsi que de plusieurs participations à des colloques nationaux et internationaux.

Articles publiés dans des journaux internationaux :

Borderie, F., Alaoui-Sehmer, L., Raouf, N., Bousta, F., Oriol, G., Rieffel, D., Alaoui-Sossé, B., 2011. UV-C irradiation as a tool to eradicate algae in caves. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 579-584.

Borderie, F., Alaoui-Sehmer, L., Bousta, F., Alaoui-Sossé, B., Aleya, L., 2014a. Cellular and molecular damage caused by high UV-C irradiation of the cave-harvested green alga *Chlorella minutissima*: Implications for cave management. *International Biodeterioration & Biodegradation* 93, 118-130.

Borderie, F., Tête, N., Cailhol, D., Alaoui-Sehmer, L., Bousta, F., Rieffel, D., Aleya, L., Alaoui-Sossé, B., 2014b. Factors driving epilithic algal colonization in show caves and new insights into combating biofilm development with UV-C treatments. *Science of The Total Environment* 484, 43-52.

Chapitre de livre

Borderie, F., Alaoui-Sehmer, L., Bousta, F., Oriol, G., Rieffel, D., Richard, H., Alaoui-Sosse, B., 2012. UV irradiation as an alternative to chemical treatments: a new approach against algal biofilms proliferation contaminating building facades, historical monuments and touristic subterranean environments, In *Algae: Ecology, Economic uses and Environmental Impact*. eds D. Krueger, H. Meyer, pp. 1-28. Nova Science Publishers, Inc.

Participation orales et affichées à des colloques nationaux et internationaux

UVC irradiation as tool to eradicate algae in caves. **Borderie F.**, Alaoui-Sehmer L., Raouf N., Bousta F., Oriol G., Rieffel D. & Alaoui-Sosse B. 8th International Symposium on the Conservation of Monuments in the Mediterranean Bassin, May 31 – June 2, 2010 – Patras, Greece.

Effet de l'irradiation aux UV-C sur des souches d'algues colonisant les milieux obscurs. **Borderie F.**, Le Jean M., Alaoui-Sehmer L., Raouf N., Bousta F., Oriol G., Rieffel D., Richard H., & Alaoui-Sosse B. Forum des Jeunes Chercheurs, 16 et 17 juin 2011, Dijon, France.

How to combat algal proliferation in show caves? The use of UV-C irradiation as a substitute to chemical treatments. **Borderie F.**, Alaoui-Sehmer L., Bousta F., Rieffel D., Alaoui-Sosse B. & Aleya L. Les sciences de la conservation du patrimoine et le développement durable: acquis, recherche, innovation, 23-25 octobre 2013, Centre de recherche sur la conservation des collections – CRCC, Paris, France.

Proliferation of green algae in the Moidons Cave: factors driving colonization and use of UV-C treatments to control their growth. **Borderie F.**, Cailhol D., Rieffel D., Alaoui-Sehmer L., Bousta F., Aleya L. & Alaoui-Sosse B. 22nd International Karstological School “Classical Karst”, Postojna, June 16th to 20th 2014, Slovenia.

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

I.1. La prolifération des micro-algues vertes sur les matériaux en pierre

La colonisation biologique des matériaux du patrimoine, encore appelée « encrassement biologique » ou « biofouling » pour le terme utilisé par les anglo-saxons, est une des causes de la détérioration des matériaux (la biodétérioration) couramment étudiée depuis le début des années 80 (Caneva *et al.*, 2008). Ce phénomène est connu sur tous les types de matériaux (pierre, métal, verre, papier, peinture...) et implique de nombreux organismes vivants (bactéries, champignons, micro-organismes photosynthétiques procaryotes et eucaryotes, organismes photosynthétiques pluricellulaires...). Parmi ces organismes, les micro-organismes photosynthétiques eucaryotes (tels que les micro-algues vertes) et les micro-organismes photosynthétiques procaryotes (les cyanobactéries), sont considérés comme pionniers dans les processus de colonisation notamment dans le cas des matériaux en pierre exposés à des conditions environnementales favorables à leur développement (présence de lumière naturelle ou artificielle et d'humidité) (Barberousse *et al.*, 2006 ; Caneva *et al.*, 2008 ; De Muynck *et al.*, 2009 ; Nugari *et al.*, 2009 ; Scheerer *et al.*, 2009) (**Figure I.1-1**).



Figure I.1-1: Exemples de colonisation biologique sur différents types de matériau en pierre. A : statue en marbre des jardins du Palace National de Queluz (Portugal) colonisée par des lichens (Miller *et al.*, 2012). B : différentes façades et structures de bâtiments modernes en France colonisés par les algues (Barberousse *et al.*, 2007). C : Biofilms d'algues et de cyanobactéries colonisant une paroi calcaire dans la grotte de Zuheros à Cordoba en Espagne (Albertano, 2012).

Dans cette partie, nous traiterons essentiellement des micro-organismes photosynthétiques eucaryotes (majoritairement les micro-algues vertes) et nous donnerons quelques exemples d'études attestant de leur diversité et de leur succès écologique leur

permettant de coloniser ces milieux particuliers. De plus, nous parlerons de leur organisation en biofilms, structures complexes dans lesquelles on retrouve également d'autres types de micro-organismes tels que les bactéries et les champignons filamenteux. Nous finirons par détailler les différentes formes de biodétérioration causées par la prolifération des micro-algues sur la pierre ainsi que les méthodes et techniques employées afin de lutter contre ces phénomènes de détérioration.

I.1.1. Caractéristiques des micro-algues vertes

Les micro-algues vertes (nommées « algues » dans le texte) sont des micro-organismes eucaryotes et photosynthétiques que l'on retrouve dans tous les milieux (aquatiques et terrestres). La forme et la taille des algues varient énormément selon les espèces. On distingue les espèces unicellulaires dont les cellules peuvent être soit isolées (ex : genre *Chlorella*) soit sous forme de colonies (production d'un mucilage englobant plusieurs cellules, ex : *Palmellopsis gelatinosa*), des espèces pluricellulaires formant un thalle filamenteux (ex : genre *Klebsormidium*) (**Figure I.1-2**). Le diamètre moyen d'une cellule ou d'une algue filamenteuse peut-être compris entre 0,5 μm et 1 mm. Certaines cellules pourvues d'un ou plusieurs flagelle(s) (ondulipodium) sont mobiles (ex : genre *Clamydomonas*) alors que d'autres qui en sont dépourvues, sont immobiles ; on les nomme coccoïdes (ex : genre *Chlorella*).

Parmi les micro-organismes photosynthétiques impliqués dans les phénomènes de colonisation et de biodétérioration de la pierre on peut également citer les cyanobactéries. A la différence des algues, les cyanobactéries sont des organismes procaryotes dont la taille peut aller de 0,2 μm pour des cellules vivant en colonies (ex : genre *Gloeocapsa*) jusqu'à 1 mètre pour les cyanobactéries filamenteuses. Les formes pluricellulaires sont appelées trichomes (jonction de cellules sans gaine mucilagineuse, ex : genre *Nostoc*) ou filaments (présence d'une gaine, ex : genre *Calothrix*). Leur taille et leur forme sont également très variées (**Figure I.1-2**).

Les algues, ainsi que les cyanobactéries, sont des organismes photo-litho-autotrophes c'est-à-dire des organismes capables de synthétiser leur propre matière organique à partir de carbone sous forme de CO_2 en utilisant la lumière comme source d'énergie et l'eau comme donneur primaire d'électrons (réaction de la photosynthèse, **Figure I.1-3** et **Encadré A**). L'utilisation de la lumière est rendue possible par la présence de pigments tels que les

chlorophylles *a* et *b* mais également d'autres pigments comme les caroténoïdes ou les phycobilines (phycoérythrine et phycocyanine). Les chlorophylles permettent l'utilisation de la lumière dans les longueurs d'onde bleue (430-450 nm) et rouge (640-680 nm) tandis que les phycobilines permettent une utilisation aux alentours de 500-560 nm, c'est-à-dire dans le vert bleuté.

Encadré A : La photosynthèse : deux phases complémentaires

La phase photochimique (phase claire) :

Elle est directement associée à la lumière et se déroule dans les thylakoïdes des chloroplastes. Au cours de cette phase, les photons lumineux absorbés par les pigments chlorophylliens au niveau des photosystèmes (I et II), vont permettre à la fois la photolyse de l'eau (libération de protons et d'électrons et production d'oxygène) ainsi que la synthèse d'ATP et de NADPH, molécules énergétiques nécessaires à la synthèse de matière organique au cours de la phase biochimique. Lorsque les photons atteignent les molécules de chlorophylles au sein des photosystèmes I et II, celles-ci passent d'un état stable à un état excité et libèrent des électrons qui vont être utilisés pour la synthèse d'ATP et de NADPH.

La phase biochimique (phase sombre) :

Elle se déroule dans le stroma des chloroplastes. Cette phase est composée d'une série de réactions biochimiques dépendantes de la production énergétique de la phase claire, dont la finalité est la transformation du CO₂ atmosphérique en composés organiques utiles pour l'organisme. La fixation du CO₂ sur un squelette carboné à 5 atomes de carbone pour générer deux composés en C3 est catalysée par une enzyme clé du monde vivant, la Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygénase ou RuBisCo. Ces composés à 3 atomes de carbone isomérisés en glycéraldéhyde-3-phosphate seront à l'origine des voies de synthèse menant au saccharose et à toutes les autres molécules organiques ensuite.

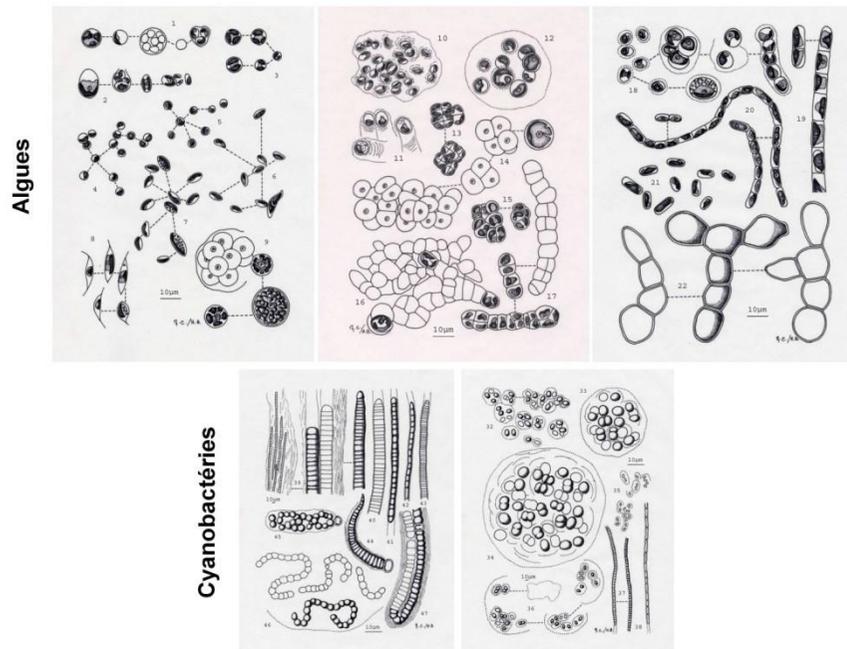


Figure I.1-2 : Diversité morphologique des algues et des cyanobactéries colonisant les façades de bâtiments en France. Les barres d'échelles sont fixées à 10 µm pour chaque illustration. D'après [Barberousse et al., 2006](#), modifiée.

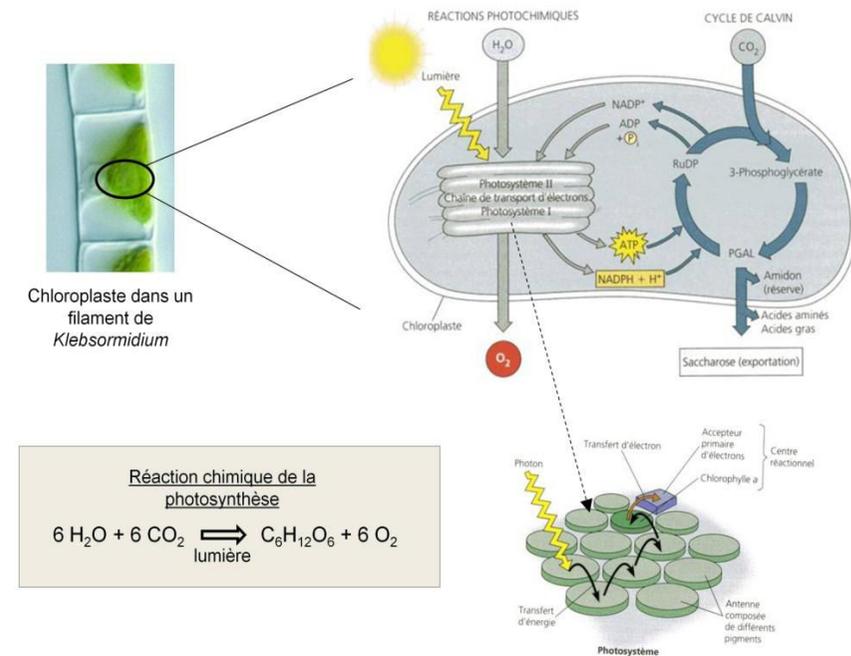


Figure I.1-3 : Principe général de la photosynthèse se déroulant au sein du chloroplaste de la cellule végétale.

I.1.2. Diversité, stratégies de colonisation et succès écologique

Dans la littérature, les études menées sur les espèces d'algues qui colonisent les façades de bâtiments, monuments historiques et œuvres d'art sont très nombreuses. Des études comme celle de [Barberousse et al. \(2006\)](#), étudiant la diversité des algues et des cyanobactéries sur les revêtements de façades en France ou encore celle de [Tomasselli et al. \(2000\)](#), qui fait état de la biodiversité des micro-organismes photosynthétiques (algues, cyanobactéries et diatomées) colonisant des monuments historiques (cathédrales, églises, fontaines...) montrent que les algues et autres micro-organismes photosynthétiques sont très répandus et colonisent aisément n'importe quelle surface.

Dans l'étude de [Barberousse et al. \(2006\)](#), les auteurs ont observé une dominance de l'espèce d'algue filamenteuse *Klebsormidium flaccidum* (55 % d'occurrence sur les 71 biofilms échantillonnés sur des façades de bâtiments). En 2008, [Rindi et al.](#) ont également observé que la base des murs de plusieurs bâtiments de villes européennes (Bordeaux, Copenhague, Manchester, Marseille et Pise) étaient principalement occupés par l'espèce *K. flaccidum* (**Figure I.1-4**). Selon eux, *K. flaccidum* privilégie les zones peu éclairées et protégées des variations climatiques (pluie, vent...).

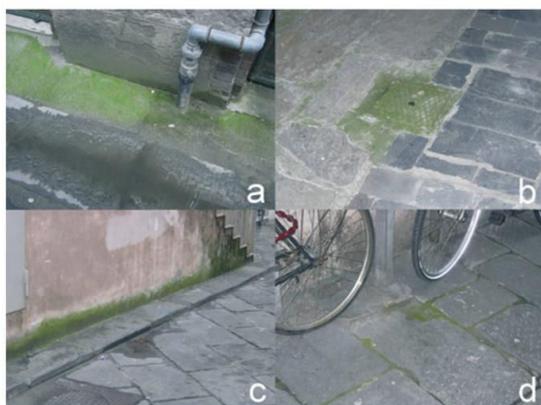


Figure I.1-4 : Exemples de populations de *Klebsormidium* en habitats urbains en Europe. (a) Développement sur la base d'un mur à Pise. (b) Population se développant sur une surface bétonnée, Pavia. (c) Population formant une ceinture de plusieurs mètres de long à la base d'un mur à Pise. (d) Population se formant entre les pavés, Pise. D'après [Rindi et al. \(2008\)](#).

[Gaylarde et Gaylarde \(2000\)](#) ont étudié et identifié la composition des micro-organismes phototrophes se développant sur des bâtiments peints de cinq villes d'Amérique du sud (Argentine, Bolivie, Mexique, Brésil et Pérou). Plus de 46 genres d'algues – et plus pour les cyanobactéries – ont été identifiés. Le genre *Chlorella* était le plus abondant avec plus de 68 % d'occurrence sur l'ensemble des zones prélevées.

Dans l'étude de [Tomasselli et al. \(2000\)](#), les auteurs montrent que la classe des

Chlorophycées (algues vertes) est représentée par 20 genres et 35 espèces différentes et que la classe des Bacillariophycées (diatomées) sont majoritairement présentes dans les zones humides (comme la fontaine de Trevi en Italie) ou proches de la mer (comme le Parthénon en Grèce). Selon eux, la richesse spécifique des micro-organismes photosynthétiques colonisant les surfaces pierreuses des monuments historiques est très importante. [Cutler et al. \(2013b\)](#) montrent également que la richesse spécifique des algues colonisant des monuments en grès à Belfast est importante (avec plus de 120 taxons d'algues) mais que la diversité spécifique est faible car seulement quelques espèces dominent les communautés d'algues (ex : *Parietochloris incisa*).

Selon [Barberousse et al. \(2006\)](#) les façades de bâtiments constituent un environnement idéal pour l'installation et la prolifération des algues. En effet, les caractéristiques pétrophysiques du support (porosité, rugosité...) facilitent la rétention de l'eau et permettent une bonne accroche des algues et des cyanobactéries. Cependant, le succès de colonisation des algues sur ce type de surface n'est pas simplement dû aux caractéristiques du support mais également à des adaptations physiologiques spécifiques mises en place par ces micro-organismes. En effet, dans ces milieux qualifiés d'extrêmes ([Karsten et al., 2007](#)), leur métabolisme doit s'adapter afin de résister aux stress environnementaux variés (variation de température, disponibilité en eau réduite, polluants atmosphériques, exposition aux UV...). Comme le montrent [Karsten et al. \(2007\)](#), certaines espèces d'algues comme *Stichococcus* sp. et *Chlorella luteoviridis* se développant sur des façades de bâtiments en Allemagne sont capables de synthétiser des composés UV-protecteurs appelés Mycosporine-like amino acids (MAAs). Les façades de bâtiments et autres supports exposés aux conditions extérieures sont largement soumis à une forte exposition à la lumière du soleil (de 1000 à 2000 μmol de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ à midi en moyenne) et donc aux rayonnements ultraviolets pouvant causer certains dommages cellulaires (UV-A et UV-B). La synthèse de ces composés est donc une adaptation physiologique des algues leur permettant de préserver leurs fonctions métaboliques et de croissance en dépit du stress dû aux UV.

L'organisation des algues en biofilms (**paragraphe I.1.3**) ainsi que la stratégie de colonisation endolithique (pénétration des micro-organismes à l'intérieure du support par le biais des fissures et de la porosité) comparée à la stratégie épilithique (colonisation de la surface du support) sont également impliquées dans le succès écologique des algues pour coloniser différents substrats minéraux exposés aux conditions extérieures ([Warscheid et](#)

Braams, 2000 ; Scheerer *et al.*, 2009 ; Ragon, 2011).

Le **Tableau I.1-1** dresse une liste non exhaustive de plusieurs études ayant rapporté la présence de genres et d'espèces d'algues colonisant différents types de matériaux de construction.

Tableau I.1-1 : Exemples d'études menées sur les algues colonisant les façades de bâtiments et monuments historiques.

Etude / Année	Pays	Type de support	Genre / Espèce
Barberousse <i>et al.</i> , 2006	France	Revêtements de façades	<i>Klebsormidium flaccidum</i> , <i>Trebouxia</i> sp., <i>Stichococcus bacillaris</i> , <i>Chlorosarcinopsis minor</i> , <i>Chlorella</i> cf. <i>mirabilis</i> , <i>Bracteacoccus</i> sp., <i>Chlorella minutissima</i> , <i>Geminella terricola</i> ...
Tomasselli <i>et al.</i> , 2000	Europe + Inde	Monuments en pierre (calcaire, siliceuse, briques...)	<i>Klebsormidium</i> sp., <i>Chlorella</i> sp., <i>Muriella</i> sp., <i>Apatococcus</i> sp., <i>Navicula</i> sp., <i>Nitzschia</i> sp...
Gaylarde et Gaylarde, 2000	Amérique latine	Bâtiments peints	<i>Chlorella</i> sp., <i>Ulotrichaceae</i> sp., <i>Chlorococcum</i> sp., <i>Eustigmatos</i> sp., <i>Trentepohliaceae</i> sp., <i>Trebouxia</i> sp., Baccillariophyta, Xantophyta...
Peraza Zurita <i>et al.</i> , 2005	Espagne	Fontaines en pierre calcaire	<i>Cosmarium</i> sp., <i>Chlorococcum</i> sp., <i>Chlosarcinopsis</i> sp., <i>Chroococciopsis</i> sp., <i>Chroococcus</i> sp., <i>Pseudopleurococcus</i> sp., <i>Pleurastrum</i> sp., <i>Ulothrix</i> sp., <i>Stichococcus</i> sp...
Mandal et Rath, 2013	Inde	Monuments en terre cuite	<i>Bracteacoccus minor</i> , <i>Chlorococcum infusionum</i> , <i>Printzina effusa</i> , <i>Radiococcus nimbatus</i> , <i>Trentepohlia aurea</i>
Cutler <i>et al.</i> , 2013b	Royaume-Uni	Monuments en grès	<i>Klebsormidium mucosum</i> , <i>Klebsormidium subtilissimum</i> , <i>Klebsormidium flaccidum</i> , <i>Parietochloris incisa</i> , <i>Viridiella fridericiana</i> , <i>Elliptochloris</i> sp., <i>Chlorella saccharophilla</i> , <i>Watanabea reniformis</i> , <i>Coccomyxa</i> sp.

En résumé :

- Les **façades de monuments et bâtiments** constituent des **habitats favorables** au développement des **micro-organismes photosynthétiques**.
- Malgré l'exposition des ces habitats à des **conditions** parfois **extrêmes**, les algues sont capables de mettre en place des **stratégies de colonisation** et des **mécanismes de protection** afin de lutter contre les stress environnementaux.
- La **richesse spécifique** des algues colonisant ces surfaces minérales semble importante étant donné les conditions drastiques de développement auxquelles elles font face. Cependant, la **diversité spécifique** semble moins importante étant donné la domination de certains taxons.

I.1.3. Organisation des algues en biofilm

Les algues peuvent vivre seules mais la plupart du temps sont regroupées en communautés pluricellulaires formant une structure complexe appelée « biofilm » (Berdoulay, 2008 ; Ragon, 2011). Selon John William Costerton (1978) (cité dans Ragon, 2011), le biofilm serait le mode de vie privilégié de la plupart des micro-organismes. Dans ces biofilms, les algues, les cyanobactéries, les bactéries et parfois les champignons filamenteux coexistent et forment un ensemble plurispécifique dans lequel la communauté de micro-organismes en tire un certain nombre d'avantages (protection contre les stress environnementaux comme la dessiccation, l'exposition aux UV, l'agression par des polluants atmosphériques ; meilleure rétention d'eau ; concentration et circulation des nutriments...) (Costerton *et al.*, 1995 ; Watnick et Kolter, 2000 ; Berdoulay, 2008 ; Roldán et Hernández-Mariné, 2009 ; Ragon, 2011).

La formation d'un biofilm peut-être divisée en cinq phases et est illustrée dans la **Figure I.1-5** :

- 1) phase d'adhésion ou d'adhérence des micro-organismes sur la surface,
- 2) adhésion irréversible par la production de « ligands » (molécules protéiques),
- 3) phase de maturation et de prolifération cellulaire,
- 4) production de la matrice extracellulaire composée de substances extrapolymeriques ou exo-polysaccharides (EPS),
- 5) phase de dispersion, ou retour à l'état planctonique de certaines cellules permettant la colonisation de nouvelles surfaces.

Lors de la formation d'un biofilm, la matrice extracellulaire produite par les cellules est composée de protéines, de carbohydrates, de lipides et de phospholipides mais aussi d'acides nucléiques (acide désoxyribonucléique, ADN et acide ribonucléique, ARN) et humiques (Caneva *et al.*, 2008), va favoriser l'adhésion et la cohésion des cellules ainsi qu'une concentration et meilleure circulation des nutriments au sein du biofilm (Berdoulay, 2008 ; Caneva *et al.*, 2008). Cette matrice va également favoriser une meilleure rétention de l'eau afin de lutter contre les phénomènes de dessiccation et joue un rôle important de protection contre certains stress environnementaux comme l'exposition aux UV ainsi qu'aux métaux

lourds et autres polluants (Caneva *et al.*, 2008 ; Scheerer *et al.*, 2009 ; Ragon, 2011).

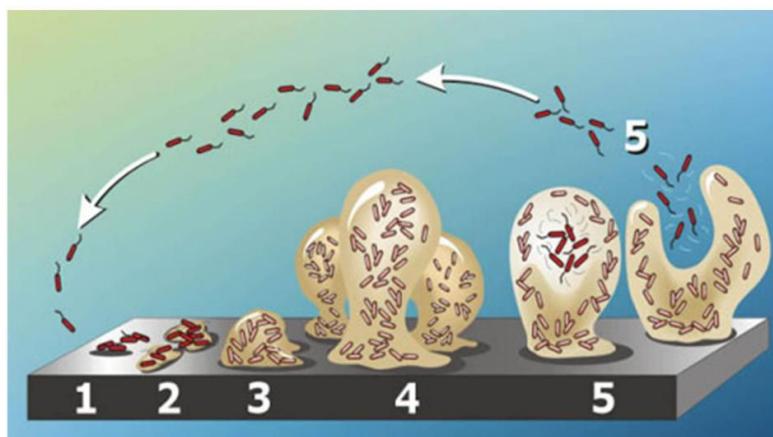


Figure I.1-5 : Principe général de la formation d'un biofilm. (d'après [site internet 1](#)).

La **Figure I.1-6** illustre la présence de la matrice extracellulaire (EPS) d'un biofilm sur un échantillon de calcite par microscopie électronique à balayage.

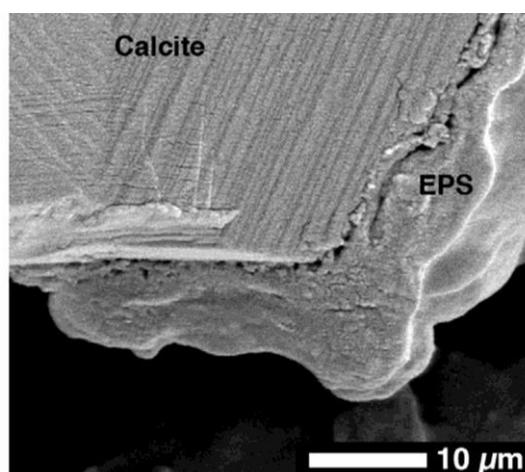


Figure I.1-6 : Coupe d'un échantillon de calcite dont la surface externe est couverte par des exopolysaccharides (EPS). D'après [Jones, 2010](#).

Les biofilms d'algues se développant sur les surfaces pierreuses des bâtiments et monuments sont appelés des biofilms « subaériens » ou « épilithiques » ([Zimmermann *et al.*, 2006](#) ; [Ragon, 2011](#) ; [Albertano, 2012](#)). Au sein de ces biofilms tous les types de micro-organismes sont présents (bactéries, champignons, cyanobactéries, algues...) mais la présence des algues et des cyanobactéries est essentielle notamment par leur capacité de photosynthèse

et de fixation de l'azote (seulement les cyanobactéries), rendant biodisponible la matière organique carbonée et azotée pour l'ensemble de la communauté et particulièrement pour les micro-organismes hétérotrophes (Caneva *et al.*, 2008 ; Scheerer *et al.*, 2009 ; Albertano, 2012).

D'un point de vue de la conservation des matériaux, la structure en biofilm et notamment la présence de cette matrice extracellulaire peut également entraîner des contraintes physico-chimiques sur le support (**paragraphe I.1.4**).

I.1.4. Les différentes formes de biodétérioration

Hueck (1965, 1968) fut le premier à définir la biodétérioration comme « tout changement indésirable des propriétés d'un matériel causé par les activités vitales des organismes » (cité dans Caneva *et al.*, 2008). Afin de comprendre les différents processus de biodétérioration, il est important de savoir que les micro-organismes utilisent le matériau soit comme source nutritive (cas des organismes hétérotrophes, bactéries et champignons), soit seulement comme support physique pour leur développement (cas des organismes autotrophes, algues et cyanobactéries) (Caneva *et al.*, 2008). Le terme de biodétériogène est utilisé pour tous types de micro-organismes ou organismes causant des dommages au matériau qu'ils colonisent.

Il existe trois grands types de biodétérioration : la biodétérioration esthétique, physique et chimique. Premièrement, la seule présence des algues sur un support va entraîner un changement d'aspect et de couleur de celui-ci (Caneva *et al.*, 2008 ; De Muynek *et al.*, 2009 ; Scheerer *et al.*, 2009 ; Cutler *et al.*, 2013a). On parle alors d'apparence salissante donné au support. Certains auteurs qualifient cela de perte de valeur esthétique (Warscheid and Braams, 2000). Ce changement de couleur est principalement causé par la présence des pigments contenus dans les cellules. Les algues sont en effet riches en chlorophylles (*a* et *b*) et caroténoïdes tandis que les cyanobactéries contiennent en plus des phycobiliprotéines donnant ainsi un aspect verdâtre et noirâtre au support (Albertano, 2012 ; Cutler *et al.*, 2013a ; Ortega-Morales *et al.*, 2013) (**Figure I.1-7**). Certaines algues, dites « algues rouges » appartenant aux Rhodophytes, contiennent de la phycoérythrine en plus des pigments chlorophylliens qui peuvent donner un aspect rougeâtre au support.

Lorsque les algues sont regroupées sous forme de biofilms (**paragraphe I.1.3**), la matrice extracellulaire va favoriser le piégeage de certaines particules atmosphériques et

aérosols comme les composés azotés et les hydrocarbures, qui vont également provoquer un changement de couleur en s'accumulant (Warscheid and Braams, 2000).



Figure I.1-7 : Changements de couleur donné au support selon le type de micro-organismes. A : patch d'algues vertes sur une église à Belfast (Cutler *et al.*, 2013a). B : Biofilms noirs composés de cyanobactéries colonisant une sculpture dans un temple Hindou (Albertano, 2012).

La biodétérioration physique inclut tous les mécanismes qui entraînent la perte de cohésion, la rupture ou la désagrégation du substrat par le biais de pressions mécaniques dues à la croissance des micro-organismes (Warscheid and Braams, 2000 ; Caneva *et al.*, 2008) ou à l'expansion d'un biofilm (Sarro *et al.*, 2006). Un des exemples les plus marquants est la pénétration des filaments des espèces endolithiques (algues et cyanobactéries filamenteuses) à l'intérieur des fissures du substrat. L'absorption de l'eau ainsi que la croissance cellulaire exerce une pression sur la structure du substrat entraînant un détachement et ce que l'on appelle « l'écaillage » des couches superficielles du matériau. Les variations du taux d'humidité conduisant à des cycles d'expansion et de contraction des cellules vont alors avoir des conséquences sur la structure du support et notamment la taille des pores, la teneur en eau et la dureté de la surface entraînant la perte de matières (Bolivar and Sanchez-Castillo, 1997 ; Perez-Zurita *et al.*, 2005 ; Sarro *et al.*, 2006).

Les actions de biodétérioration chimique sont principalement dues à l'activité métabolique des micro-organismes. Le processus chimique de détérioration de la pierre le plus connu et le plus étudié est ce que l'on appelle la « biocorrosion », principe par lequel les micro-organismes produisent des acides qui dissolvent les minéraux de la pierre. Chez les

algues se sont principalement des acides organiques qui sont excrétés par les cellules (acides oxalique, citrique, gluconique, fumarique, malique, formique...) causant ainsi la dissolution de la pierre, notamment dans le cas du calcaire et du marbre (Warscheid and Braams, 2000 ; Herrera *et al.*, 2004 ; Scheerer *et al.*, 2009). Un autre phénomène de biocorrosion est dû à la respiration des organismes du biofilm. Le CO₂ rejeté par ce processus entre en réaction avec l'eau pour former de l'acide carbonique (H₂CO₃) participant ainsi à la dissolution du carbonate de calcium présents dans les pierres calcaires ou les mortiers (Caneva *et al.*, 2008).

Enfin, le phénomène de biodétérioration peut être imputable à la mise en place d'un système écologique complexe, dans le sens où il est dicté par des relations étroites entre les micro-organismes, le type de support ainsi que les facteurs environnementaux (eau, lumière, température...) (Nuhoglu, 2004 ; Caneva *et al.*, 2008 ; Scheerer *et al.*, 2009 ; Dakal and Cameotra, 2012; Miller *et al.*, 2012). La **Figure I.1-8** montre de manière schématique qu'une œuvre d'art colonisée par les micro-organismes (ou un matériau en pierre d'une façon générale) peut être considérée comme un écosystème avec comme composantes le biotope, ici le substrat minéral (la statue), la biocénose avec les différentes communautés microbiennes composées des producteurs, des consommateurs primaires et des décomposeurs ainsi que les facteurs environnementaux (lumière, température, humidité, nutriments...) qui interagissent avec l'ensemble des composantes du système.

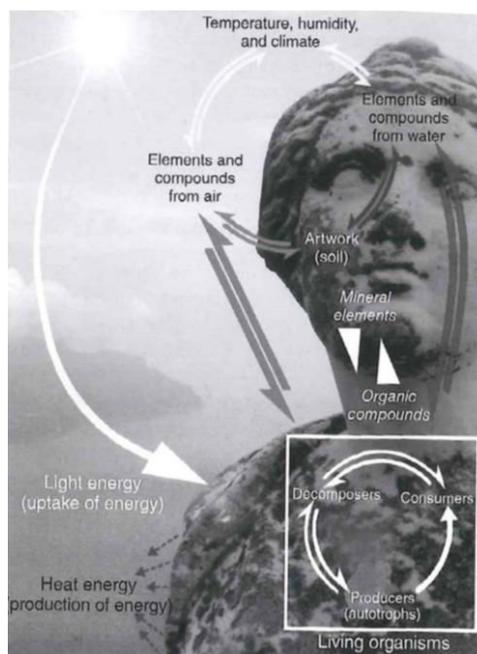


Figure I.1-8 : Schéma théorique du phénomène de colonisation biologique sur les matériaux en pierre vue comme un écosystème (Villa Cimbrone, Ravello, photo de G. Caneva, d'après [Caneva et al., 2008](#)).

La capacité des algues et des cyanobactéries à fixer le CO_2 , et pour les cyanobactéries le N_2 (azote atmosphérique), leur donne un sérieux avantage comparé aux organismes hétérotrophes pour coloniser de nouvelles surfaces ([Herrera et al., 2004](#) ; [Scheerer et al., 2009](#)). De par leur photoautotrophie, les micro-organismes photosynthétiques colonisent aisément de nouvelles surfaces et sont considérés comme pionniers dans les dynamiques de colonisation ([Caneva et al., 2008](#)). Leur activité métabolique et la production de débris cellulaires forment une couche superficielle riche en nutriments idéale pour la croissance et le développement d'organismes hétérotrophes comme les bactéries et les champignons (notion de succession écologique) ([Dakal et Cameotra, 2012](#)).

La **Figure I.1-9** présente les différentes voies de biodétérioration causées par les organismes vivants sur les matériaux en pierre. Les différents types d'organismes y sont représentés (micro-organismes phototrophes et chimiotrophes, plantes supérieures...) ainsi que la notion de succession écologique avec l'évolution des communautés d'organismes et la formation d'un biofilm.

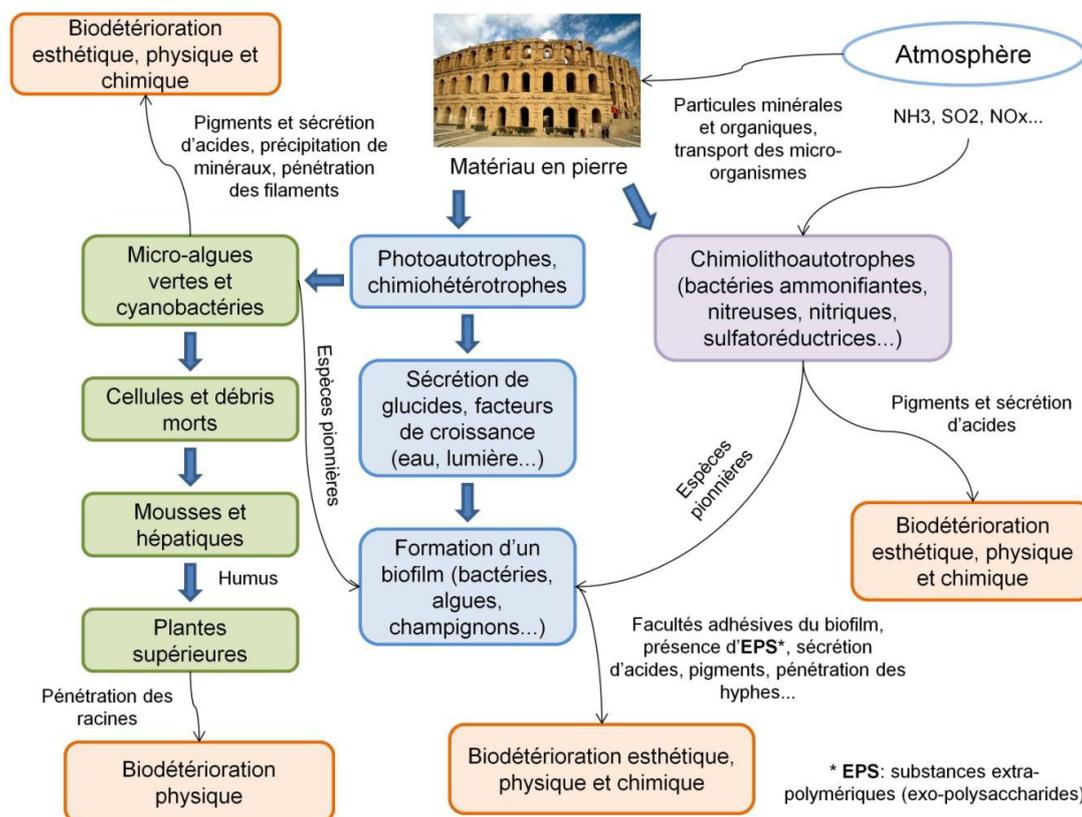


Figure I.1-9 : Schéma synthétique des différentes voies de biodétérioration causées par les organismes vivants. D'après Dakal et Cameotra (2012), modifié.

I.1.5. Méthodes et moyens pour lutter contre la biodétérioration de la pierre

Les conservateurs et les maîtres d'ouvrage et/ou d'œuvre ont recours à deux principales méthodes afin de limiter la prolifération voire d'éradiquer les micro-organismes qui menacent l'intégrité des matériaux du patrimoine. Ces méthodes peuvent être préventives ou curatives.

Les méthodes préventives consistent principalement à réduire la « bioréceptivité » d'un matériau ; c'est-à-dire « l'aptitude d'un matériau à être colonisé par un ou plusieurs groupes d'organismes vivants sans nécessairement entraîner des phénomènes de biodétérioration » (Guillitte, 1995). La bioréceptivité est influencée par les propriétés intrinsèques du matériau (rugosité, porosité, structure minérale, composition chimique...) ainsi que par les conditions environnementales auxquelles il est exposé (humidité, température, environnement végétal, pollution atmosphérique, exposition à la lumière...) (Tiano *et al.*, 1995 ; Prieto et Silva, 2005 ; Miller *et al.*, 2006, 2009ab, 2012 ; Barberousse *et al.*, 2007 ; Dakal et Cameotra, 2012). Dans ce sens, lors des opérations de restauration, qui consistent à reconstruire ou à remplacer des parties de pierre dégradées (très courantes sur les monuments historiques et œuvres d'art),

les conservateurs enduisent les nouveaux matériaux de produits hydrofuges. Le rôle majeur de ces produits est de limiter la rétention en eau sur la surface du support afin de retarder la colonisation biologique en limitant l'accès à l'humidité (Moreau *et al.*, 2008). Lors de ces mêmes pratiques de restauration, les conservateurs peuvent appliquer des produits biocides (algicides, fongicides...) sur la pierre afin d'inhiber le développement microbien (Barberousse, 2006 ; Fonseca *et al.*, 2010). Les produits biocides les plus communément utilisés et commercialisés sont des composés à base de sels d'ammonium quaternaire (**Tableau I.1-2**).

Les traitements curatifs regroupent des méthodes chimiques et physiques. Ils consistent à éliminer directement la présence des micro-organismes sur la pierre, soit par contrainte mécanique avec l'utilisation d'appareil à vapeur d'eau sous faible pression (type Vaporetto) ou forte pression (type Karcher) soit par usage de produits biocides permettant de tuer et de décolorer les micro-organismes éliminant ainsi la salissure occasionnée par la présence des micro-organismes (Caneva *et al.*, 2008 ; Moreau *et al.*, 2008 ; De Muynck *et al.*, 2009). Le **Tableau I.1-2** présente la liste des principaux biocides utilisés pour lutter contre la prolifération des algues et des cyanobactéries. Ces biocides peuvent être appliqués sous différentes formes (pulvérisation, compresses imbibées, application au pinceau...) et agissent de différentes manières sur les organismes. Certains, tels que les hypochlorites, sont des agents oxydants ; d'autres agissent comme désinfectant, c'est le cas par exemple des sels d'ammonium quaternaire. Enfin, on distingue également ceux qui inhibent certaines activités métaboliques spécifiques (effets sur l'activité photosynthétique et plus spécifiquement sur la phase photochimique).

Bien qu'étant assez efficaces en termes de destruction des micro-organismes, ces produits ont une efficacité limitée dans le temps et leur composition, plus ou moins toxique, peut s'avérer néfaste pour l'environnement ainsi que pour la surface traitée (Faimon *et al.*, 2003 ; Berdoulay, 2008 ; Mulec et Kosi, 2009). L'eau de javel par exemple, contenant de l'hypochlorite de sodium, a souvent été utilisée pour éliminer les algues colonisant la pierre. Cependant, ce produit peut entrer en réaction avec certains composés de la pierre (notamment le calcaire) et créer un « voile blanc » sur le matériau (suite à la cristallisation des sels) pouvant engendrer des phénomènes de dissolution de la pierre (Faimon *et al.*, 2003). Les autres biocides, facilement lessivables et pouvant se retrouver dans l'environnement et induire des phénomènes de pollution, ont été ciblés en Février 1998 par une directive Européenne

concernant la mise sur le marché des produits biocides ([Directive du 16 février 1998](#)) afin de réguler leur utilisation et leur présence sur le marché ([Caneva *et al.*, 2008](#)).

Les méthodes physiques de nettoyage peuvent également avoir des effets néfastes sur les surfaces traitées (altération de la pierre par utilisation de vapeur d'eau sous haute pression). Faute de méthodes alternatives, l'application de ces techniques reste encore de nos jours couramment utilisées dans le domaine de la conservation des matériaux.

Tableau I.1-2 : Liste des biocides les plus fréquemment utilisés pour éliminer les algues. D'après *Caneva et al. (2008)*, modifié.

Chemical Classification	Chemical Composition	Commercial Name
Inorganic compounds	Sodium and potassium hypochlorite	
	Hydrogen peroxide	
	Sodium octaborate	Polybor
Phenol derivatives	Chlorinated and phenolic compounds	Panacide, Halophane, Thaltox C
	Sodium pentachlorophenate	
Nitroorganic compounds (ureic and carbamates)	Diuron	Karmex
		Diuron
Quaternary ammonium salts	Alkyl-benzyl-dimethyl-ammonium chloride	Preventol R50
		Preventol R80
		Neo Desogen
		Hyamine 3500
		BAC
	(Diisobutylphenoxyethoxyethyl)dimethyl-benzyl-ammonium chloride	Hyamine 1622
	Dodecyl-benzyl-trimethyl-ammonium chloride	Gloquat C
	Lauryl-dimethyl-benzyl-ammonium chloride	Cequartyl
Organic metal salts	Tri-n-butyl tin oxide	TBTO
		Thaltox
Pyridine	2,3,5,6 tetrachloro-4-methyl sulfonyl pyridine	Algophase
Heterocyclic compounds	Hexazinone	Velpar, Velpar L

En résumé :

- Un **large éventail de méthodes et de techniques** est disponible pour lutter ou prévenir la prolifération des micro-organismes phototrophes sur les matériaux en pierre.
- La **recherche de solutions alternatives** aux produits chimiques polluants ou méthodes physiques dégradantes est de nos jours une des préoccupations majeures des conservateurs.

Informations supplémentaires :

- Les **champignons microscopiques** et **filamenteux** sont aussi largement impliqués dans les phénomènes de colonisation et de **biodétérioration** des matériaux du patrimoine.
- Les produits chimiques sont également très utilisés pour lutter contre la **prolifération fongique** (dérivés de phénols, éthanol, sels d'ammonium quaternaire...).

I.2. Les grottes touristiques : un contexte particulier de conservation

Les grottes constituent un des enjeux fondamentaux de la conservation du patrimoine à la fois naturel et culturel. En effet, elles abritent la plupart du temps des paysages naturels constitués de formations minérales vieilles de plusieurs milliers d'années, mais aussi parfois des vestiges préhistoriques et historiques, souvenirs des traces et empreintes qu'ont laissées nos ancêtres. Il y a environ 400 000 ans, à la suite de la maîtrise du feu, l'Homme a commencé à exploiter les grottes et cavernes à des fins de refuge, protection contre les contraintes environnementales et également à des fins artistiques (art pariétal). Aujourd'hui les grottes sont utilisées à des fins touristiques et/ou scientifiques. C'est au cours du XIX^{ème} siècle que naît cet intérêt pour le milieu souterrain, avec notamment la création de la Société de Spéléologie par Edouard-Alfred Martel. De nos jours en France, on compte plusieurs centaines de grottes aménagées et ouvertes au public, accueillant près de six millions de visiteurs chaque année ([site internet 2](#)). Parmi ces sites, environ 25 % (172 sites) présentent un intérêt préhistorique avec la présence d'art pariétal (peintures, gravures...) ; on parle alors de grottes ornées, la plupart du temps classées aux titres des monuments historiques.

Les paragraphes suivants permettront tout d'abord de définir ce qu'est une grotte ainsi que les aspects qui caractérisent ces milieux souterrains (formation, facteurs biotiques et abiotiques...). Nous parlerons ensuite de l'exploitation touristique des grottes et des perturbations associées, notamment celles d'ordre biologique. Nous citerons plusieurs exemples d'études qui ont été menées sur ces perturbations et plus particulièrement sur l'apparition de ce que l'on appelle aujourd'hui les communautés de « lampenflora » (micro-organismes et organismes phototrophes se développant autour des lampes).

I.2.1. Caractéristiques générales d'une grotte

Les grottes sont des cavités souterraines creusées principalement dans les roches carbonatées par action chimique (dissolution de la roche) et mécanique (éboulements) (**Encadré B**). L'ensemble du réseau de cavités est ce que l'on appelle le karst¹ (ou réseau karstique).

¹ Structure géomorphologique résultant de l'érosion hydrochimique et hydraulique de formations de roches carbonatées.

Encadré B : La formation des grottes, principe général de dissolution du calcaire

La formation des grottes est principalement provoquée par le phénomène de dissolution de la roche calcaire. L'eau en passant dans le sol va tout d'abord se charger en CO_2 (origine biogénique due à l'activité biologique du sol ; la concentration dans le sol est plus importante que celle dans l'atmosphère). Le dioxyde de carbone et l'eau vont réagir pour former de l'acide carbonique (H_2CO_3). Cet acide va se dissocier dans l'eau en formant des cations H_3O^+ et des anions HCO_3^- (bicarbonates). L'attaque acide est ensuite réalisée par la réaction entre les cations H_3O^+ et le carbonate de calcium ($CaCO_3$) qui se dissout pour produire des ions calcium (Ca^{2+}). Cette érosion chimique peut par la suite entraîner des phénomènes d'érosion mécanique, comme par exemple les éboulements créés suite à la fragilisation de la roche.

Les milieux souterrains tels que les grottes sont des milieux particuliers que l'on peut qualifier d'écosystèmes à part entière de par leur fonctionnement et les facteurs biotiques et abiotiques qui les caractérisent. Il est souvent associé à ce type de milieu un équilibre dynamique fragile dicté par des facteurs comme la température (stable toute l'année et généralement comprise entre 10 et 15 °C), l'humidité de l'air (entre 90 et 100 %), la teneur en gaz carbonique (pouvant atteindre des valeurs supérieures à 5 % ou 5000 ppm, voire 10 % dans le puits du Sorcier de la grotte de Lascaux), la faible teneur en éléments nutritifs (conditions oligotrophiques) et les populations animales (Chauve-souris, insectes...) qui y sont inféodées (Lefèvre, 1974 ; Dragovich et Grose, 1990 ; Hoyos *et al.*, 1998 ; Groth *et al.*, 1999 ; Brunet, 2000 ; Grobbelaar, 2000 ; Jurado *et al.*, 2008). Une autre caractéristique, probablement la plus importante et commune à toutes les grottes, est l'absence de lumière. Alors que l'énergie lumineuse est à la base de la chaîne alimentaire des écosystèmes terrestres et aquatiques grâce à la production primaire des organismes photoautotrophes (micro-algues, cyanobactéries, plantes supérieures), la base des réseaux trophiques dans une grotte peut-être assurée soit par des organismes autotrophes soit par des organismes hétérotrophes. Les organismes autotrophes sont représentés par les bactéries qui sont capables de réaliser la chimiosynthèse, c'est-à-dire qu'elles utilisent comme source d'énergie l'oxydation de molécules inorganiques comme le soufre (S), le sulfure d'hydrogène (H_2S), l'hydrogène (H)

ou encore le fer ferreux (Fe^{2+}) présents dans les roches et les eaux, afin de convertir le carbone inorganique en carbone organique pour produire de la biomasse (Engel, 2012). La grotte de Movile en Roumanie est un très bon exemple d'écosystème basé sur la chimioautotrophie avec des bactéries assurant le rôle de producteurs primaires (Mulec, 2008). Elle est de plus caractérisée par une importante richesse faunistique qui constitue les réseaux trophiques supérieurs.

Lorsque l'autotrophie n'est pas possible dans ces milieux, les organismes hétérotrophes (bactéries et champignons) peuvent être à la base de la chaîne alimentaire en tirant leur énergie et leur source nutritive de matières organiques mortes (animales et végétales) provenant de l'extérieur par le biais des eaux d'infiltration ainsi que des organismes entrant dans la grotte (Simon, 2012). Selon Azúa-Bustos *et al.* (2009), les bactéries hétérotrophes sont à la base de la chaîne alimentaire dans beaucoup d'écosystèmes souterrains.

Les grottes sont donc considérées comme des systèmes semi-clos puisqu'elles entretiennent des relations étroites avec l'extérieur (eaux d'infiltration, courants d'air, échanges thermiques, apport de minéraux et de nutriments, organismes venant de l'extérieur, apport de spores...) (Cigna, 2012). Heaton (1986) (cité dans Grobbelaar, 2000) introduit le concept de niveau d'énergie pour le système « grotte » et établit trois catégories d'un point de vue des flux et transferts de matière et d'énergie en lien avec l'extérieur :

- ❖ grottes de fort niveau énergétique, avec des courants d'air réguliers et envoies fréquents,
- ❖ grottes de niveau énergétique modéré,
- ❖ grottes de faible niveau énergétique, caractérisées par des liaisons avec l'extérieur très faibles voire nulles (environnement clos).

Cette relation étroite avec l'extérieur ainsi que les conditions biotiques et abiotiques relativement stables, font de ces systèmes des milieux très sensibles aux changements environnementaux et aux pressions anthropiques. Plus généralement, le système karstique dans son ensemble est très sensible aux phénomènes de pollution créés par les activités humaines puisqu'il représente environ 10 à 20 % de la surface terrestre et qu'il fournit 40 à 50 % des eaux potables sur terre (Graening et Brown, 2003 ; Brinkmann et Parise, 2012).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les milieux souterrains sont également

très convoités pour un usage touristique. La découverte et l'exploitation touristique de ces sites n'est pas sans conséquences sur leur intégrité. C'est cet aspect que nous allons maintenant développer.

I.2.2. Exploitation touristique des grottes

Qu'elles soient ornées ou non de peintures et de gravures ou qu'elles présentent une diversité de formations carbonatées comme les spéléothèmes (stalagmites, stalactites, draperies, colonnes, gours...), les grottes ont un fort pouvoir attractif pour le grand public et font partie des sites touristiques les plus visités en France. Avant l'ouverture d'une grotte au public, plusieurs étapes sont tout d'abord nécessaires. En premier lieu il y a la découverte, souvent fortuite comme la découverte de la grotte de Lascaux par quatre jeunes le 12 septembre 1940 (Lefèvre, 1974). Ensuite il y a les phases d'aménagements extérieurs et intérieurs permettant l'accès et les visites au grand public. Cette phase d'aménagement et par la suite le nombre croissant de visiteurs pénétrant chaque jour à l'intérieur de la grotte, conduisent à des perturbations souvent irréversibles des conditions biotiques et abiotiques du site. Un des exemples les plus marquants en France est la fermeture de la très célèbre grotte de Lascaux en 1963, suite à de sérieuses perturbations biologiques et notamment la contamination des sols, des murs et des peintures rupestres par une algue verte du genre *Bracteacoccus* sp. (Lefèvre, 1974). Ce phénomène fût alors appelé à l'époque la « maladie verte » de Lascaux. La surexploitation touristique durant environ 20 ans, avec plus de 120 000 visiteurs par an, a été la cause de ces importantes perturbations. La conservation des peintures étant un enjeu prioritaire, les autorités décidèrent alors de fermer la grotte au public.

I.2.2.1. Perturbations des paramètres climatiques

Dans la littérature, de nombreux auteurs ont étudié les effets de la présence des visiteurs sur les paramètres climatiques des grottes (Dragovich et Grose, 1990 ; Cigna, 1993 ; Baker et Genty, 1998 ; Hoyos *et al.*, 1998 ; Mangin *et al.*, 1999 ; Sánchez-Moral *et al.*, 1999 ; Faimon *et al.*, 2006 ; Fernández-Cortés *et al.*, 2006 ; Russell et MacLean, 2008). La plupart des études se sont intéressées à l'augmentation des concentrations en CO₂ à l'intérieur des grottes. Cette augmentation a été démontrée sur plusieurs sites comme étant la résultante de la respiration des visiteurs (augmentation de 400 à 1500 ppm). C'est le cas par exemple dans la grotte de Jenolan en Australie, qui reçoit 100 000 visiteurs par an (Dragovich et Grose, 1990). Selon

plusieurs auteurs, l'augmentation des concentrations en CO₂ dans les grottes dépendent des conditions de ventilation de la grotte mais également des saisons (Baker et Genty, 1998 ; Kowalczk et Froelich, 2010). En effet, l'activité biologique du sol étant plus importante au printemps et en été, il en résulte des concentrations plus élevées à ces périodes que pendant la période hivernale. Les conséquences d'une augmentation importante des concentrations en CO₂ peuvent tout d'abord avoir un impact sur les visiteurs (la valeur limite d'exposition dans une grotte étant fixée à 5000 ppm) (Dragovich et Grose, 1990). Ensuite, ceci peut avoir un impact sur les spéléothèmes en augmentant le risque de dissolution de ces formations carbonatées. Lorsque que les teneurs en CO₂ sont plus importantes dans l'air ambiant de la grotte que dans l'eau d'infiltration, les réactions inverses de précipitation de la calcite sont enclenchées et on assiste alors à la dissolution de la calcite (Baker et Genty, 1998). Un autre exemple de détérioration due à la présence excessive de CO₂, est l'altération des peintures préhistoriques comme cela a pu être observé dans la grotte de Lascaux en France (Lefèvre, 1974) et dans celle d'Altamira en Espagne (Dragovich et Grose, 1990). Dans certains cas comme pour la Grande grotte d'Arcy-sur-Cure, les peintures préhistoriques peuvent être recouvertes d'une fine couche de calcite translucide leur apportant une certaine protection contre les attaques extérieures.

L'augmentation de la température et le changement du taux d'humidité de l'air sont également des conséquences de la présence des visiteurs. L'augmentation de la température va notamment engendrer une diminution de la pression de vapeur d'eau qui va alors se condenser sur les murs et les parois de la grotte. Cette eau est capable de piéger le CO₂ de l'air, ce qui a pour conséquence de l'acidifier et de provoquer la dissolution du carbonate (Hoyos *et al.*, 1998).

En fonction du niveau d'énergie d'une grotte (Heaton, 1986 ; cité dans Grobbelaar, 2000), l'impact des visiteurs sera plus ou moins prononcé. Une grotte caractérisée par des flux naturels importants de matières et d'énergie sera beaucoup moins perturbée par la présence des touristes que des sites faiblement énergétiques où les perturbations climatiques se feront plus sentir (Hoyos *et al.*, 1998).

I.2.2.2. Perturbations biologiques : la prolifération des micro-organismes photosynthétiques

I.2.2.2.1. Facteurs favorisant leur présence

Les micro-organismes photosynthétiques (algues et cyanobactéries) sont naturellement absents en milieux souterrains (absence de lumière). La production primaire basée sur la réalisation de la photosynthèse n'est donc pas possible (Mulec, 2008). Cependant, l'installation d'une source artificielle de lumière à l'intérieur d'une grotte (**Figure I.2-1**) va modifier ces conditions pré-existantes et ainsi favoriser le développement d'une communauté complexe d'organismes phototrophes appelée « lampenflora » ou « la maladie verte » autour des spots lumineux (Lefèvre, 1974 ; Mulec et Kosi, 2009 ; Mulec, 2012).

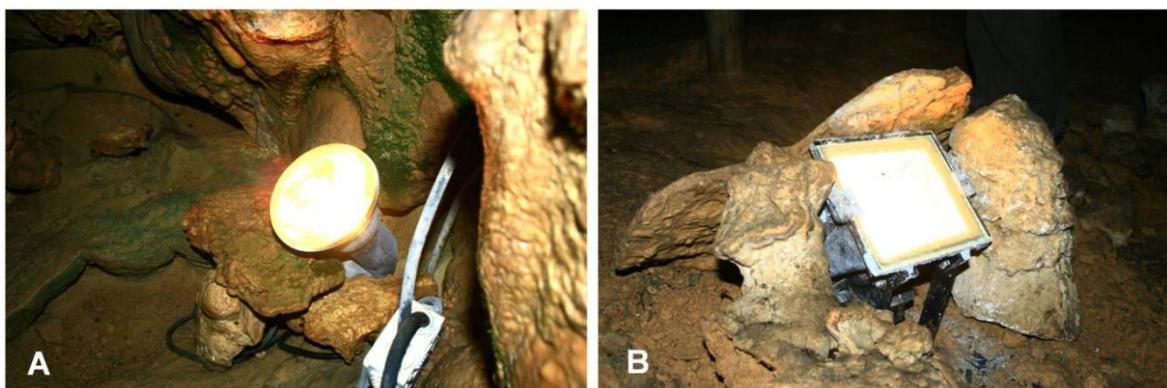


Figure I.2-1 : Spots lumineux installés dans la grotte des Moidons (Jura, France). A : lampe à incandescence de 120 W (notez la présence de tâches vertes au-dessus du spot). B : lampe halogène de 500 W.

L'apport de lumière est bien évidemment le facteur le plus important conditionnant la présence de ces organismes ; cependant plusieurs facteurs sont favorables à leur installation et leur prolifération (Lefèvre, 1974 ; Grobbelaar, 2000 ; Mulec *et al.*, 2008 ; Mulec et Kosi, 2009 ; Martinez et Asencio, 2010 ; Albertano, 2012 ; Mulec, 2012). Le **Tableau I.2-1** présente les principaux facteurs abiotiques et biotiques permettant tout d'abord l'installation et la colonisation des algues dans une grotte et ensuite ceux permettant leur développement ainsi que leur prolifération.

Tableau I.2-1 : Facteurs abiotiques et biotiques favorisant l'installation et la prolifération des micro-organismes phototrophes dans les grottes.

Favorables à...	Facteurs	Influences sur les micro-organismes
l'installation, la colonisation	Courants d'air	Vecteurs de transport des algues et des cyanobactéries à l'état de spores ou de cellules (apport exogène)
	Eaux d'infiltration	
	Visiteurs	
	Animaux	
	Environnement végétal de la surface	Source potentielle de micro-organismes
	Lumière	Capture de l'énergie lumineuse et réalisation de la photosynthèse
	Matière organique	Source nutritive
	Communautés bactériennes	
la prolifération, la croissance, le développement	Substrats rocheux	Accroche des micro-organismes et source nutritive
	Lumière	Source d'énergie
	Eau, humidité de l'air	Donneur d'électron
	CO ₂ (air de la grotte et respiration des visiteurs)	Source de carbone
	Matière organique	Source nutritive
Communautés bactériennes		

L'ensemble de ces facteurs est donc primordial à l'installation et la prolifération des algues dans les grottes. Notons que les facteurs tels que les eaux d'infiltration, les courants d'air, la présence d'animaux et de matière organique provenant de l'extérieur (ou plus généralement les flux de matière et d'énergie) vont dépendre du niveau énergétique de la grotte. Si la grotte entretient de faibles relations avec l'extérieur, l'apport exogène de micro-organismes sera d'autant moins important.

I.2.2.2.2. *Diversité et écophysiologie des algues dans les grottes*

Plusieurs études se sont penchées sur la composition des communautés phototrophiques dans les grottes ainsi que sur leurs caractéristiques écophysiologiques.

En 1974, Marcel Lefèvre publie une étude concernant les perturbations biologiques rencontrées dans la grotte de Lascaux (Lefèvre, 1974). Après quelques dizaines d'années de visites intensives, la grotte de Lascaux est sujette à une invasion d'algues vertes, reconnues comme appartenant au genre *Bracteacoccus*, menaçant l'intégrité des peintures rupestres. Selon les observations effectuées en laboratoire, il est apparu que ce genre d'algue était capable d'adopter deux modes de multiplication asexuée soit par division soit par production de zoospores (spores munis de flagelles). Ces deux modes rapides de multiplication permettaient de coloniser facilement de nouvelles surfaces souvent assez éloignées de la population source (Lefèvre, 1974).

Mulec *et al.* (2008) ont étudié les communautés d'algues et de cyanobactéries colonisant huit environnements souterrains (6 grottes et 2 mines) de la région karstique de Slovénie. Ils ont identifiés 60 taxons d'algues et de cyanobactéries parmi lesquels les cyanobactéries étaient les plus abondantes (47 %), suivi par les Chlorophytes (30 %) et les Chrysophytes (algues unicellulaires brun-jaune) (23 %). Les cyanobactéries étaient majoritairement représentées par les espèces *Aphanocapsa muscicola*, *Aphanocapsa biformis*, *Chroococcus minutus*, *Gloeocapsa* sp., *Lyngbya* sp. et *Synechocystis* sp. Chez les algues, les auteurs ont principalement trouvé les genres et espèces *Chlorocloster* sp., *Fragilaria pinnata* pour les Chrysophytes et *Chlorella* sp., *Klebsormidium flaccidum*, *Muriella* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Stichococcus undulatus* et *Trentepohlia aurea* pour les Chlorophytes. Mulec *et al.* (2008) ont également comparé la composition des communautés colonisant l'entrée des grottes (soumises à un éclairage naturel) avec celles se développant autour des spots lumineux à l'intérieur de la grotte (lampenflora). Ils ont montré que les communautés autour des lampes étaient premièrement composées d'algues vertes et que les cyanobactéries devenaient dominantes dans les étapes tardives des successions écologiques. Lors de phases de nettoyage sur les façades de bâtiments ou dans les grottes, ces successions sont stoppées et les algues vertes unicellulaires à croissance rapide tel que le genre *Chlorella* colonisent facilement de nouvelles surfaces (Gaylarde et Gaylarde, 2000 ; Mulec *et al.*, 2008). Grobbelaar (2000) a montré que les algues du type *Chlorella* et les cyanobactéries proliférant dans la grotte de Congo en Afrique du Sud étaient adaptées aux faibles conditions de

luminosité. En effet, les mesures de photosynthèse en réponse à des conditions d'éclairement similaires à celles rencontrées *in-situ* ont montré que ces organismes parvenaient à soutenir le fonctionnement de leur métabolisme même avec le faible nombre de photons capté par leur appareil photosynthétique, ce qui leur confère un avantage compétitif dans ces environnements particuliers. De plus, [Grobbelaar \(2000\)](#) a également observé que certaines espèces avaient la capacité de reprendre leur activité métabolique après de longues périodes de dessiccation. Selon lui, une humidité importante, la présence de CO₂ ainsi qu'une quantité suffisante de nutriments sont les conditions autorisant le développement des algues tant qu'une quantité même faible mais suffisante de lumière est présente. Cette hypothèse est en accord avec l'étude de [Martinez et Asencio \(2010\)](#), qui ont montré dans la grotte de Gelada (Espagne) que le premier facteur de stress était la carence en lumière suivi d'un déficit d'humidité, du manque de nutriments et enfin de la température.

Comme nous l'avons vu dans la première partie de la synthèse bibliographique, les algues ont la capacité de coloniser très rapidement de nouvelles surfaces. Elles sont donc souvent considérées comme des organismes pionniers dans les différentes étapes de colonisation. Ceci est particulièrement le cas pour les zones obscures dans les grottes qui subissent un éclairage artificiel et où les algues vont alors trouver des conditions favorables à leur développement. Bien que dans certains cas il soit possible que des bactéries aient premièrement colonisé ces milieux (**paragraphe I.2.1**), les micro-algues vertes sont des espèces particulièrement bien adaptées à ces types de condition et sont également considérées comme des souches à croissance rapide ([Mulec et al., 2008](#)). L'algue verte du genre *Chlorella* sp. par exemple, est fréquemment observée dans les communautés se développant autour des lampes ([Grobbelaar, 2000](#) ; [Nugari et al., 2009](#) ; [Urzi et al., 2010](#) ; [Cennamo et al., 2012](#) ; [Mulec, 2012](#)).

Dans les grottes, les algues et les cyanobactéries forment des biofilms épilithiques (**paragraphe I.1.3**) comme dans le cas des façades de bâtiments et de monuments où sont également présents des bactéries et parfois des champignons filamenteux. Ces biofilms peuvent ensuite favoriser l'installation d'autres organismes tels que les mousses et les fougères qui bénéficient alors d'un support riche en matière organique et en nutriments ([Caneva et al., 2008](#) ; [Mulec et Kosi, 2009](#) ; [Mulec, 2012](#) ; [Mulec, 2014](#)).

[Roldán et Hernández-Mariné \(2009\)](#) ont étudié la diversité et la structure de plusieurs biofilms dans les grottes de Zuheros, de Nerja et de Collbató en Espagne. Ils ont étudié la

diversité et la structure des biofilms en fonction de paramètres tels que l'intensité de l'éclairage, la durée d'éclairage, le taux d'humidité et le site d'échantillonnage. Ils ont notamment remarqué que l'épaisseur du biofilm ainsi que la diversité diminuaient quand l'intensité lumineuse était moins importante. De plus, l'intensité et la durée de l'éclairage jouent un rôle sur le caractère auto- ou hétérotrophe du biofilm. Les zones très peu éclairées vont être dominées par une composante hétérotrophe, notamment par la présence de bactéries alors que les zones très éclairées sont dominées par les communautés phototrophes (micro-algues et cyanobactéries). Certaines souches d'algues vertes, comme *Chlorella* sp. et *Bracteacoccus* sp., sont capables de modifier leur mode trophique en auto- ou hétérotrophe en fonction des conditions de luminosité (Lefèvre, 1974 ; Roldán et Hernández-Mariné, 2009 ; Mulec, 2014).

I.2.2.2.3. Problèmes liés à la présence des algues dans les grottes

La prolifération des algues dans les grottes va tout d'abord engendrer un phénomène d'encrassement biologique (voir biodétérioration esthétique, **paragraphe I.1.4**). La présence de pigments chlorophylliens dans les cellules va entraîner un verdissement du support, d'où le nom de « maladie verte » (**Figure I.2-2**).



Figure I.2-2 : Encrassement biologique par les algues dans les grottes. A : algues se développant sur une formation carbonatée de la grotte des Moidons (Jura, France). B : Communautés de phototrophes sur le sol de la grotte de Postojnska (Slovénie) (Mulec, 2012). C : Verdissement du sol calcaire de la grotte de Postojnska (Slovénie) dû à la présence des algues (Mulec, 2014). D : Développement de biofilms verts sur des peintures Byzantines dans la Crypte du Péché Originel (Matera, Italie) (Nugari et al., 2009).

Les problématiques causées par la prolifération des algues dans les grottes se manifestent visuellement par un encrassement des surfaces colonisées (sols, parois, formations carbonatées...). Mais, comme nous l'avons vu dans le **paragraphe I.1.4**, les algues causent aussi de sérieux dommages sur les surfaces rocheuses qu'elles colonisent. Ceci est particulièrement le cas dans les grottes calcaires où les formations carbonatées et les roches sont très sensibles aux phénomènes de dissolution et d'érosion causés par l'excrétion d'acides par ces micro-organismes ([Grobbelaar, 2000](#) ; [Caneva *et al.*, 2008](#) ; [Albertano, 2012](#)).

Enfin, la présence des algues dans les grottes ornées peut également menacer sérieusement l'intégrité des peintures rupestres. [Nugari *et al.* \(2009\)](#) ont observé dans la crypte du Péché Originel (Crypt of the Original Sin, Matera, Italie) que les communautés de micro-organismes phototrophes formaient une couche verdâtre sur le support mais colonisaient également l'intérieur du support (jusqu'à plusieurs millimètres de profondeur), mettant ainsi en péril l'intégrité des peintures Byzantines datant du IX^{ème} siècle. Deux autres exemples peuvent être cités, la grotte de Lascaux en Dordogne et celle d'Altamira en Espagne, où la présence des visiteurs ainsi que la prolifération d'algues vertes menaçaient les peintures du Paléolithique et ont provoqué la fermeture de ces deux sites.

D'autres micro-organismes sont aussi largement observés en milieu souterrain et posent également de nombreux problèmes de détérioration et de conservation des peintures rupestres. Il s'agit des champignons filamenteux et des moisissures (**Encadré C**).

Encadré C : Les champignons et moisissures

Contrairement aux algues, les champignons n'ont pas besoin de lumière pour se développer. Ils ont cependant besoin d'une source organique de carbone pour leur croissance. Sous forme de spores, ils sont facilement transportables à l'intérieur d'une grotte par les animaux et les visiteurs ; ils colonisent ensuite les substrats en formant des filaments (hyphes). La pénétration des filaments à l'intérieur du substrat (stratégie endolithique) leur permet d'exploiter plus efficacement les minéraux et l'eau dont ils ont besoin. Ceci entraîne des phénomènes de biodétérioration physiques importants, tout comme les acides organiques qu'ils sécrètent.

*Plusieurs auteurs ont recensé la prolifération de champignons dans les grottes et certains sites à forte valeur patrimoniale (présence de peintures rupestres préhistoriques) sont menacés par leur développement (Oriol *et al.*, 2009 ; Ciferri, 1999 ; Saiz-Jimenez *et al.*, 2011).*

I.2.3. Méthodes et moyens pour lutter contre les perturbations biologiques

I.2.3.1. Méthodes préventives

L'emploi des méthodes préventives vise à limiter la prolifération des organismes phototrophes dans les grottes. Ces méthodes sont principalement axées sur la gestion de l'éclairage et sur la présence des visiteurs.

La quantité de lumière, sa qualité, sa fréquence d'allumage et le type de matériel utilisé vont conditionner l'intensité de colonisation du support par les micro-organismes photosynthétiques (Johnson, 1979 ; Caneva *et al.*, 2008 ; Mulec et Kosi, 2009 ; Mulec, 2012). Les principales recommandations récentes dans la gestion de l'éclairage dans une grotte visitée portent notamment sur l'utilisation des LED (Light-Emitting Diodes). Les LED émettent à une longueur d'onde de 595 nm ce qui correspond à une portion du spectre lumineux le moins actif pour la réalisation de la photosynthèse (l'absorption maximale des pigments chlorophylliens se situant autour de 440 nm et autour de 650 nm). Le temps d'allumage des lampes peut également être régulé, notamment en installant des capteurs de présence. La gestion du nombre de visiteurs selon la capacité d'accueil du site, permet de

limiter les apports exogènes de cellules et de spores d'algues et également de limiter les dégagements de CO₂. La capacité d'accueil d'une grotte touristique est définie comme étant le nombre de visiteurs, pour une période donnée, n'induisant pas de changement des paramètres environnementaux au-delà des fluctuations naturelles (Hoyos *et al.*, 1998 ; Cigna, 2012).

Bien qu'étant relativement efficaces pour limiter la prolifération des organismes photosynthétiques à l'intérieur d'une grotte, les gestionnaires utilisent en plus des méthodes préventives des méthodes curatives (chimiques et/ou physiques) pour nettoyer les surfaces colonisées par les micro-organismes photosynthétiques.

I.2.3.2. Méthodes curatives

Comme nous l'avons vu dans la première partie de la synthèse bibliographique (**paragraphe I.1.5**), l'usage des produits chimiques par les conservateurs est très courant pour éradiquer et éliminer les algues sur les matériaux en pierre. Ceci est également le cas pour la conservation des grottes où les gestionnaires utilisent principalement des solutions de pulvérisation aux compositions diverses.

Dans les années 60, suite à l'important développement d'une algue verte (*Bracteacoccus* sp.) dans la grotte de Lascaux, les conservateurs ont utilisé des solutions d'aldéhyde formique au 1/200^{ème} pour nettoyer les sols, les murs ainsi que les peintures. Après 4 mois de traitement, la contamination algale avait totalement disparue (Oriol *et al.*, 2009). Grobbelaar (2000) a étudié l'effet de 2 herbicides sur des algues provenant de la grotte de Congo en Afrique du Sud : la Simazine (2-chloro-4,6-diéthylamine-1,3,5-triazine) et l'Atrazine (1-chloro-3-éthylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine). Ces deux composés se sont avérés efficaces en termes d'éradication des algues mais n'ont donné aucun résultat probant quant à la dégradation des chlorophylles (la couleur persistait sur le support). Cependant, l'usage de ces produits est fortement déconseillé par l'auteur puisqu'ils dégagent d'importantes quantités de fumées qui rendent l'atmosphère de la grotte irrespirable. Aujourd'hui, les deux herbicides utilisés dans cette étude sont interdits dans l'Union Européenne (depuis 2003 pour la Simazine et 2004 pour l'Atrazine ; Directive du 16 février 1998).

Des solutions d'hypochlorite de sodium (eau de javel) ont également été couramment utilisées pour nettoyer les formations carbonatées des grottes touristiques. Faimon *et al.* (2003) et Mulec et Kosi (2009) montrent que l'usage de l'hypochlorite de sodium n'est pas

non plus adapté à cette problématique, bien qu'il soit également efficace pour traiter les zones colonisées par les algues. En effet, du chlore à l'état gazeux est rejeté dans l'atmosphère et pollue l'environnement de la grotte. Selon des résultats non publiés de spéléologues, plusieurs chauve-souris sont mortes dans la grotte de Javoříčko (République Tchèque) à la suite d'un nettoyage effectué à l'hypochlorite de sodium (Faimon *et al.*, 2003). De plus, le chlore a pour caractéristique de baisser le pH et ainsi de provoquer la dissolution et l'érosion des formations carbonatées telles que les spéléothèmes (Faimon *et al.*, 2003 ; Mulec et Kosi, 2009).

Depuis le début des années 2000, l'utilisation du peroxyde d'hydrogène pour nettoyer les formations carbonatées dans les grottes a fait l'objet de plusieurs études. Grobbelaar (2000) et Faimon *et al.* (2003) montrent que le peroxyde d'hydrogène permet d'obtenir de bons résultats en termes d'éradication des algues et de dégradation des chlorophylles (principe actif blanchissant, agent oxydant). Selon ces travaux, l'intérêt de l'utilisation du peroxyde d'hydrogène réside dans le fait qu'il est rapidement dissocié en eau et en oxygène, et n'affecte donc pas l'ensemble du réseau souterrain lorsqu'il est lessivé par les eaux d'infiltration. Cependant, d'autres auteurs ont montrés les limites de ce produit. En effet, Caneva *et al.* (2008) et Mulec (2012) montrent que l'utilisation du peroxyde d'hydrogène sur les formations carbonatées peut avoir des effets de dissolution de la calcite. L'emploi d'acides dans les solutions commerciales pour stabiliser le peroxyde d'hydrogène, conduit à une baisse du pH aux alentours de 4 et corrode la calcite. Afin de contourner ce problème, une récente étude menée dans les grottes de Škocjan et de Postojna en Slovénie (Mulec, 2014), propose de tamponner les solutions de H₂O₂ avec du carbonate et du bicarbonate de sodium pour obtenir un pH de l'ordre de 7-7,5 et ainsi éviter les phénomènes de dissolution de la calcite. Selon les conclusions de cette étude, l'utilisation du peroxyde d'hydrogène doit être discutée avec des biologistes afin de limiter les impacts sur la faune des grottes.

Nugari *et al.* (2009) testent l'efficacité de plusieurs biocides à base de sels d'ammonium quaternaire (Rocima 110, Preventol R80 et Umonium 38) sur des peintures byzantines contaminées majoritairement par des algues et des cyanobactéries (**Figure I.2-2**). Les produits testés semblaient efficaces pour éliminer les algues et les cyanobactéries mais des analyses colorimétriques ont montré qu'il y avait un changement de couleur du support après l'application des traitements. Dans cette étude, les auteurs ont procédé à un nettoyage à l'eau des surfaces traitées et omettent de préciser que les produits utilisés peuvent être facilement transportés dans d'autres zones et contaminer les eaux et organismes vivants non cibles.

Enfin, en dehors des produits chimiques, d'autres méthodes et techniques sont utilisées pour le nettoyage des formations carbonatées contaminées par les algues. Il s'agit notamment de méthodes physiques comme l'utilisation d'eau sous forte pression (type Karcher). Ce type de nettoyage est à éviter le plus possible pour 2 raisons. Tout d'abord, il ne permet pas l'élimination complète des organismes puisque ceux-ci vont être simplement retirés du support et dispersés dans d'autres zones où ils pourront alors se développer si les conditions y sont réunies. Ensuite, la pression mécanique exercée sur le support peut entraîner de sérieux dommages sur la surface traitée (détérioration mécanique des couches superficielles du matériau) (Mulec et Kosi, 2009).

I.2.3.3. Méthodes alternatives

Au vu des problématiques causées par les différentes techniques et méthodes de traitement citées précédemment, il semble aujourd'hui nécessaire de trouver des solutions alternatives. Une des méthodes discutée depuis de nombreuses années est l'utilisation du rayonnement ultraviolet germicide ou UVGI pour « UltraViolet Germicidal Irradiation ».

Nous allons maintenant détailler dans la troisième et dernière partie de la synthèse bibliographique ce qu'est le rayonnement ultraviolet, quels sont ses effets sur les organismes vivants et plus particulièrement sur les micro-organismes photosynthétiques et quelles sont les informations disponibles concernant l'utilisation des UV pour la conservation des matériaux du patrimoine.

En résumé :

- Les méthodes employées aujourd'hui pour lutter contre la prolifération algale semblent efficaces mais présentent de nombreux **risques** tant pour les surfaces traitées que pour l'ensemble de l'**écosystème** « **grotte** ».
- L'enjeu de la conservation des grottes touristiques est aujourd'hui de trouver des **solutions alternatives aux méthodes polluantes**.

I.3. Le rayonnement ultraviolet

I.3.1. Définition et caractéristiques

Le rayonnement ultraviolet (UV), appelé également lumière noire car non visible à l'œil nu, est un rayonnement électromagnétique considéré comme non ionisant² excepté pour les longueurs d'onde courtes (\leq à 150 nanomètre). Les ultraviolets sont émis par la lumière du soleil, dont ils représentent environ 5 %. Ils se situent entre la lumière visible et les rayons X dans le spectre électromagnétique (**Figure I.3-1**) et peuvent être subdivisés, selon leurs longueurs d'ondes, en trois catégories : UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) et UV-C (200-280 nm). Etant donné que la quantité énergétique des photons est inversement proportionnelle à la longueur d'onde de la lumière émettant les photons, les UV-C sont considérés comme hautement énergétiques et sont les plus nocifs pour les organismes vivants. Ils sont pour cette raison qualifiés de rayonnement germicide (UVGI, UltraViolet Germicidal Irradiation).

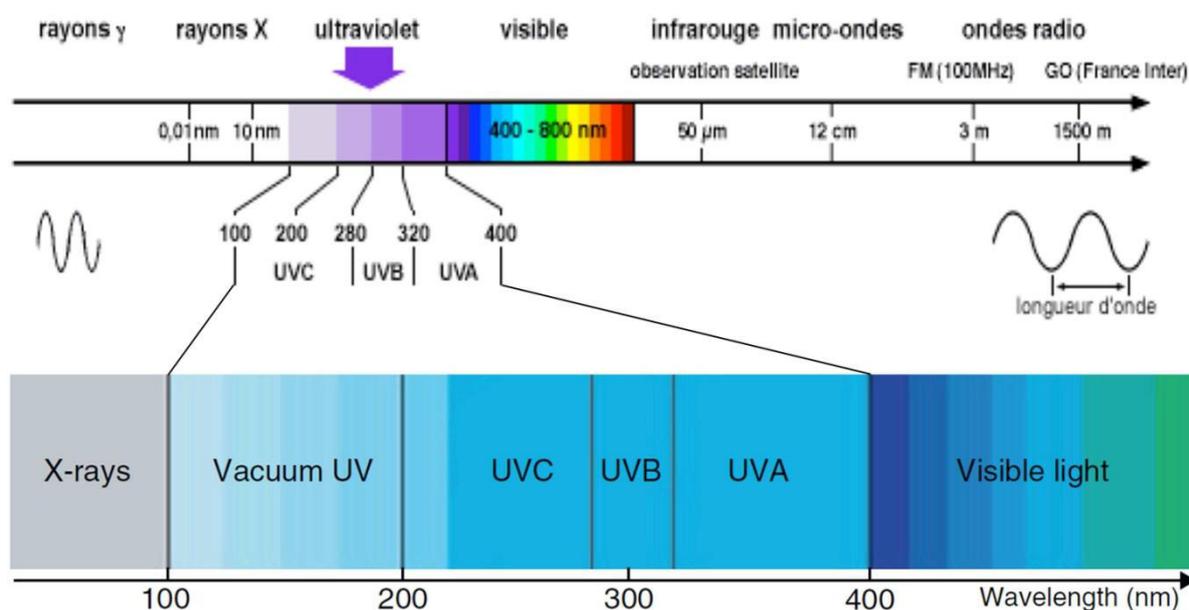


Figure I.3-1: Position du rayonnement ultraviolet dans le spectre électromagnétique. D'après [Yin et al., 2013](#) et [site internet 3](#).

² L'ionisation est l'action qui consiste à enlever ou ajouter des charges à un atome ou une molécule

Les UV-A, caractérisés par une longueur d'onde élevée se rapprochant de la lumière visible, atteignent facilement la surface terrestre car peu retenus ou absorbés par la couche d'ozone³ ou les molécules d'oxygène contenues dans la partie stratosphérique⁴ de l'atmosphère (95 % de la lumière UV atteignant la surface de la terre est constituée d'UV-A). Les UV-A sont responsables chez l'homme du phénomène de bronzage.

Les UV-B ont une longueur d'onde moyenne et sont partiellement filtrés par la couche d'ozone. Leur plus faible longueur d'onde comparée à celle des UV-A peut provoquer de sérieux dommages sur toutes les molécules biologiques et notamment l'ADN.

A la différence des UV-A et des UV-B, les UV-C sont entièrement filtrés par la couche d'ozone. Les photons hautement énergétiques des UV-C leur confèrent un fort pouvoir germicide causant de sérieux dommages souvent irréversibles sur les organismes vivants. Ils sont, de par cette caractéristique, utilisés comme éclairage biocide et désinfectant dans plusieurs domaines (**paragraphe I.3.3**).

I.3.2. Effets sur les organismes vivants

I.3.2.1. Contexte(s) scientifique(s)

A partir du milieu des années 70, consécutivement à la détection du trou de la couche d'ozone, de nombreux scientifiques se sont penchés sur les effets des rayonnements ultraviolets sur les organismes vivants ([Aguilera et al., 1999](#) ; [Cordi et al., 1999](#) ; [Ekelund, 2000](#) ; [Björn, 2007](#) ; [Figuerola et al., 2009](#) ; [Dahms et Lee, 2010](#) ; [Albert et al., 2010](#)). En effet, la couche d'ozone est la partie de l'atmosphère de la terre qui joue un rôle primordial dans la filtration du rayonnement solaire. Les rejets anthropiques de gaz organiques tels que les chlorofluorocarbures (CFCs) et les hydrochlorofluorocarbures (HCFCs), provenant de différentes filières industrielles (nettoyants industriels, propulseurs, mousses isolantes...), sont majoritairement responsables de la dégradation des molécules d'ozone de la stratosphère ([Antonelli et al., 1997](#) ; [Aráoz et Häder, 1999](#) ; [Feng et al., 2007](#) ; [Dahms et Lee, 2010](#)). Il en résulte une quantité d'UV, principalement UV-A et UV-B, plus importante à la surface de la Terre. De ce fait, les scientifiques s'inquiétaient de voir augmenter des effets indésirables sur la faune et la flore ainsi que sur les populations humaines ([Robert et al., 1996](#) ; [Banerjee et al., 2005](#)). De nombreuses études voient alors le jour sur des modèles biologiques terrestres et

³ Partie de la stratosphère contenant une quantité relativement importante (quelques dizaines de ppm) d'ozone (O₃)

⁴ La stratosphère est située entre 12 et 50 km d'altitude en moyenne par rapport à la surface de la terre

aquatiques variés (micro-organismes, plantes supérieures, animaux, cellules humaines...) en conditions contrôlées en laboratoire ainsi que *in situ* en conditions naturelles. Dans ce contexte et dans le cas d'études menées en laboratoire, les conditions expérimentales sont souvent menées de façon à ce que les quantités d'UV utilisées se rapprochent le plus possible des quantités retrouvées en conditions naturelles, voire de celles que l'on pourrait retrouver dans quelques années en tenant compte de l'augmentation du trou de la couche d'ozone. Ces études s'inscrivent donc dans une approche préventive et permettent de mieux comprendre et de s'attendre aux risques que peuvent causer des expositions excessives au rayonnement UV.

Une toute autre approche scientifique s'intéresse également à l'étude de l'effet du rayonnement UV sur les organismes vivants. Il s'agit d'utiliser le rayonnement UV comme méthode de traitement pour lutter contre la prolifération d'organismes nuisibles (**paragraphe I.3.3**). Dans ce cas les auteurs utilisent principalement les UV-C caractérisés par une action germicide.

Certaines études portent également sur les capacités d'adaptation des organismes vivants exposés naturellement aux rayonnements UV-A et UV-B. Les auteurs étudient alors les stratégies d'évitement ainsi que les mécanismes de protection et de réparation que mettent en place les organismes afin d'éviter les dommages cellulaires et moléculaires (**paragraphe I.3.2.2.1**). Les études portent principalement sur des espèces de phytoplancton retrouvées en milieu marin ou sur certaines espèces photosynthétiques se développant sous forme de biofilms sur les façades des bâtiments (biofilms subaériens et épilithiques).

I.3.2.2. Effets, dommages et réponses observés

Dans la littérature, de nombreux auteurs ont étudié les effets du rayonnement UV sur les organismes vivants tels que les micro-organismes (bactéries, champignons et moisissures, algues, cyanobactéries), les plantes supérieures et également les cellules humaines. Les effets et dommages observés sur ces différents organismes vont tout d'abord dépendre des caractéristiques des UV utilisés (A, B ou C), des conditions d'exposition aux UV (puissance, durée d'exposition, dose reçue...) mais également du niveau d'organisation biologique observé (organisme entier, cellule, molécule...) ainsi que des paramètres étudiés (croissance, taux de survie, mortalité, activité métabolique, effets directs et indirects...).

Bien qu'ils soient moins nocifs par rapport aux UV-C, de nombreuses études ont permis de mettre en avant les effets délétères des UV-A et UV-B, que ce soit au niveau cellulaire

(baisse de l'activité métabolique, mortalité...) ou au niveau moléculaire (fragmentation de l'ADN). Les UV-A sont la partie du rayonnement la moins dangereuse, même si à fortes doses ils peuvent générer un stress oxydatif important (accumulation de ROS, *Reactive Oxygen Species*) et entraîner des dommages cellulaires et moléculaires chez les espèces de phytoplancton et chez les plantes supérieures (Robert *et al.*, 1996 ; Buma *et al.*, 2001 ; Pessoa, 2012). Les UV-B sont plus nocifs que les UV-A ; la molécule d'ADN y est d'ailleurs très sensible. L'absorption des UV-B par l'ADN va causer ce que l'on appelle la photo-transformation et ainsi créer des Cyclobutane Pyrimidine Dimers (CPDs) (absents après une exposition aux UV-A) (Frohnmeyer et Staiger, 2003 ; Pessoa, 2012). Ces photo-produits gênent la transcription et la réplication de l'ADN. Les organismes photosynthétiques sont également très sensibles aux rayonnements UV-B. Tous les composants impliqués dans la réaction de la photosynthèse peuvent être endommagés par l'action des UV-B (chloroplastes, thylakoïdes, photosystèmes, pigments photosynthétiques...) (Frohnmeyer et Staiger, 2003 ; Fukuda *et al.*, 2008). Enfin, les UV-C, qui n'atteignent pas la surface de la Terre, sont considérés comme la partie du rayonnement UV la plus agressive pour les organismes vivants car ils sont absorbés par les protéines et les acides nucléiques (Kowalski, 2009). Alors que sous exposition aux UV-A et UV-B les organismes sont capables de mettre en place des mécanismes de protection (synthèse de MAAs, de caroténoïdes, de mélanines chez les animaux et certains champignons, système antioxydant efficace...) et de réparation (nouvelle synthèse de protéine, réparation de l'ADN), les UV-C causent la plupart du temps des dommages cellulaires et moléculaires irréversibles.

Afin de cibler et d'orienter cette partie de la synthèse bibliographique par rapport aux problématiques qui nous intéressent dans le cadre de cette thèse, nous allons maintenant présenter et détailler les principaux effets et dommages causés par le rayonnement UV-C sur les micro-organismes photosynthétiques (algues et cyanobactéries). Une partie plus succincte traitera également de l'effet des UV-C sur les champignons et moisissures.

I.3.2.2.1. *Effets des UV-C sur les micro-organismes photosynthétiques*

En 2006, Moharikar *et al.* ont étudié les effets de différentes doses d'UV-C (de 1 à 100 J m⁻²) sur les cellules d'une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*. Ils ont tout d'abord observé des modifications morphologiques au niveau de la cellule et ont remarqué qu'après exposition aux UV-C il y avait une augmentation progressive de la vacuole en fonction de la

dose d'UV-C reçue et un rétrécissement de la cellule (**Figure I.3-2**). De plus, le chloroplaste était complètement dégradé à partir de 25 J m^{-2} et le noyau était également progressivement dégradé en fonction de la dose (fragmentation de la chromatine). Sur ces mêmes cellules, les auteurs ont étudié certaines voies de la Mort Cellulaire Programmée (MCP) et notamment la fragmentation de l'ADN (survenue 18 h après une exposition de 12 J m^{-2} , (**Figure I.3-2**).

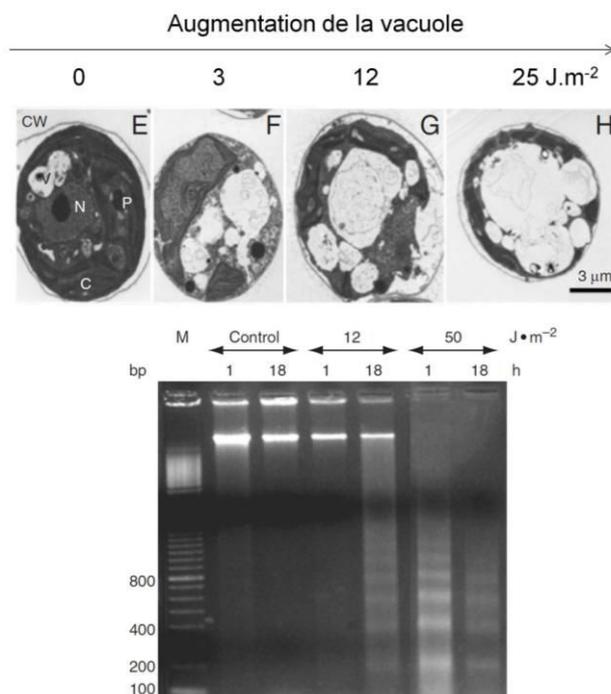


Figure I.3-2 : Changements morphologiques et fragmentation de l'ADN observés sur un gel d'électrophorèse après différentes doses d'UV-C (en J m^{-2}) et temps d'incubation après exposition (en heures). D'après Moharikar *et al.*, 2006, modifiée.

La fragmentation de l'ADN par l'action des UV-C peut-être soit directe, soit indirecte. L'action directe est liée au fait que certaines bases azotées entrant dans la constitution de la molécule d'ADN (pyrimidine et purine) ont une absorption maximale proche de la longueur d'onde des UV-C (Ravanat *et al.*, 2001). Ceci conduit donc à des réactions de photooxydation qui entraînent la scission de la molécule. Les actions indirectes sont principalement dues au fait que l'exposition au rayonnement UV-C engendre un stress oxydatif important avec la formation de ROS (Reactive Oxygen Species). Ces ROS et notamment le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) vont jouer le rôle de signal de certaines voies de la MCP. En effet, la présence de H_2O_2 dans la cellule va entraîner des réactions en chaînes qui vont ensuite provoquer la fragmentation de l'ADN par le biais de l'induction des caspases, enzymes qui

vont par la suite activer la DNase (enzyme responsable de la fragmentation) (Danon et Gallois, 1998 ; Gadjev *et al.*, 2008).

Ou *et al.* (2012) ont étudié les effets immédiats et à long terme de différentes doses d'UV-C sur une espèce de cyanobactérie, *Mycrocystis aeruginosa*. Ils ont suivi les effets sur la photosynthèse et notamment sur le rendement maximal de la chaîne de transfert d'électrons (ETR_{max}) ainsi que sur la teneur en chlorophylle *a*. Les principaux résultats présentés dans la **Figure I.3-3** montrent que la chaîne de transfert d'électrons est très vite endommagée par l'exposition aux UV-C (de l'ordre du $mJ\ cm^{-2}$, **A**) alors que la chlorophylle est beaucoup moins sensible à ces expositions directement après le traitement (**B**) alors qu'elle est dégradée graduellement en fonction du temps (**D**), comme pour l' ETR_{max} (**C**).

Le stress oxydatif important causé par les UV-C est également responsable des effets portés sur l'activité métabolique et plus particulièrement l'activité photosynthétique. Plusieurs auteurs ont montré que le H_2O_2 et d'autres ROS avaient également des effets négatifs sur la chaîne de transfert d'électrons (Ma et Gao, 2010), sur la dégradation des chlorophylles et des protéines (Upadhyaya *et al.*, 2007) et sur la peroxydation lipidique des membranes (Gill et Tuteja, 2010). Tao *et al.* (2010) ont montré que les membranes de trois espèces d'algues vertes (*Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus quadricanda*) étaient de plus en plus endommagées en fonction de la dose d'UV-C reçue allant de 0 à $200\ mJ\ cm^{-2}$.

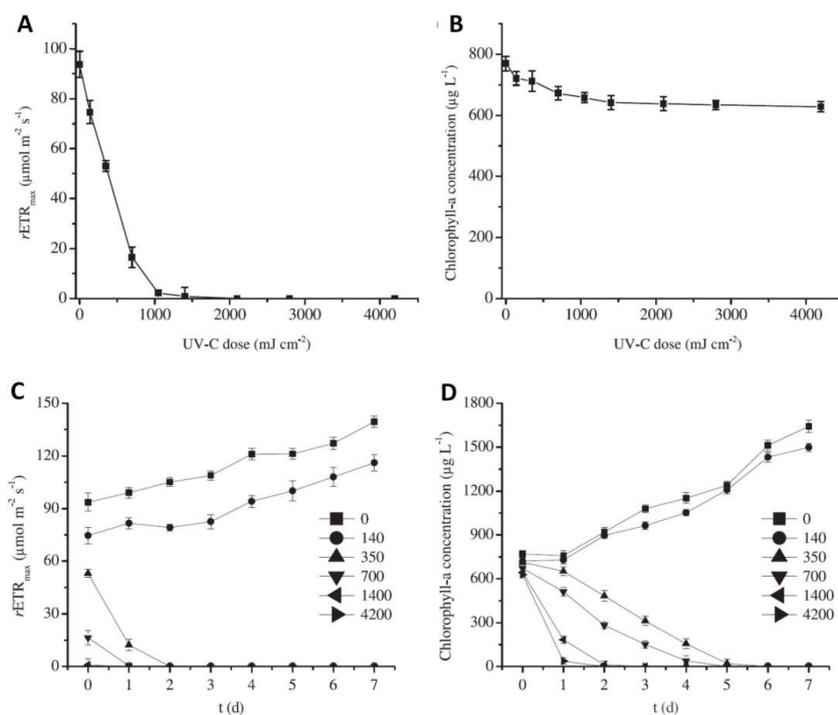


Figure I.3-3 : Effets immédiats et à long terme des UV-C sur la chaîne de transfert d'électrons et la teneur en chlorophylle *a* d'une espèce de cyanobactérie, *Mycrocystis aeruginosa*. D'après [Ou et al., 2012](#).

L'action directe des UV-C semble aussi être très impliquée dans les dommages causés sur l'appareil photosynthétique. En effet, l'ensemble des biomolécules et structures cellulaires sont capables d'absorber les UV-C ([Kowalski, 2009](#) ; [Yin et al., 2013](#)) et ce sont donc tous les différents composants impliqués dans les réactions de la photosynthèse (PSII, chloroplastes, protéine D1, pigments photosynthétiques, Rubisco, thylakoïdes, chaîne de transfert d'électrons...) qui sont endommagés. [Zvezdanović et al. \(2009\)](#) ont d'ailleurs montré l'effet « bleaching » de différentes durées d'exposition aux UV-C sur des extraits de chlorophylles (*a* et *b*) provenant de feuilles d'épinard (**Figure I.3-4**).

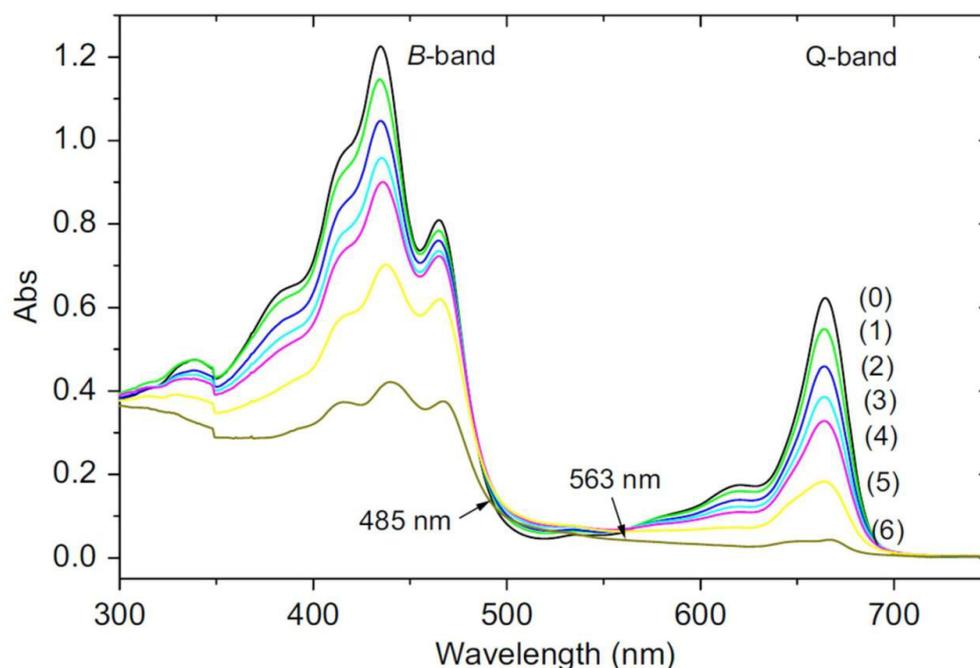


Figure I.3-4 : Spectre d'absorption des chlorophylles a et b en fonction du temps d'exposition aux UV-C. (0) 0 ; (1) 0,5 ; (2) 1 ; (3) 1,5 ; (4) 2 ; (5) 3 et (6) 10 minutes. B-band et Q-band correspondent aux deux pics d'absorption des chlorophylles a et b. D'après [Zvezdanović et al. \(2009\)](#).

En règle générale, l'action des UV-C sur les micro-organismes photosynthétiques, qu'elle soit directe ou indirecte, cause des dommages souvent irréversibles même avec de faibles doses d'irradiation. La destruction totale de l'appareil photosynthétique, le stress oxydatif excessif et la fragmentation de l'ADN conduisent inévitablement à la mort des cellules. La plupart des études ont également analysé l'effet des UV-C dans le temps. Pour beaucoup de paramètres étudiés il semble que l'action des UV-C soit maximale après un temps d'attente (notamment pour la dégradation des chlorophylles), comme un « effet à retardement » où l'action des UV-C se poursuit même après l'arrêt de l'exposition. De plus, la reprise d'activités biologiques (photosynthèse et croissance cellulaire) après exposition aux UV-C semble très faible.

Les auteurs ayant étudié les effets des UV-A, UV-B et UV-C sur les algues et les cyanobactéries ont pu mettre en évidence certains mécanismes de protection et de réparation permettant aux cellules d'éviter certains dommages cellulaires et moléculaires. Un des mécanismes de protection le plus connu est celui de la synthèse de Mycosporine-like amino acids (MAAs). Ces molécules complexes ont la propriété d'absorber et ensuite de dissiper le rayonnement UV afin d'éviter les dommages cellulaires directs et indirects ([Adhikary et sahu,](#)

1997 ; Karsten *et al.*, 2007 ; Karsten, 2008 ; Lee et Shiu, 2009 ; Carreto et Carigan, 2011). De plus, des molécules telles que les xanthophylles et les composés phénoliques connus pour leur action antioxydante (Duval *et al.*, 2000 ; Stahl et Sies, 2003). Mais l'essentiel de la protection antioxydante réside dans les enzymes à action antioxydante telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APX) et la glutathion réductase (GR). A cela s'ajoutent d'autres composés antioxydants à faible masse moléculaire (tocophérols, acide ascorbique, glutathion...) dont les concentrations ou l'état de réduction varient lors de l'induction d'un stress oxydatif sous exposition aux UV (Blokina *et al.*, 2003 ; Tian et Yu, 2009).

D'autres mécanismes sont également impliqués pour contrer les dommages causés par le rayonnement UV. Il s'agit des mécanismes de réparation et plus particulièrement ceux effectués au niveau de l'ADN. Ces mécanismes sont de deux types : les réparations recombinantes (nouvelle synthèse d'ADN) et les réparations d'excisions (suppression des bases endommagées) (Jansen *et al.*, 1998 ; Hollósy, 2002 ; Karsten, 2008). On peut également citer le remplacement des protéines endommagées par une nouvelle synthèse de ces protéines (« *de novo biosynthesis* »). C'est le cas par exemple pour les protéines D1 et D2 du photosystème II (Hollósy, 2002 ; Karsten, 2008).

La **Figure I.3-5** présente les différents effets causés par les UV-C chez les algues et les cyanobactéries d'après les informations trouvées dans la littérature. Ces effets sont présentés en fonction du niveau d'organisation biologique (niveau cellulaire et moléculaire) et en fonction du caractère direct ou indirect des effets observés.

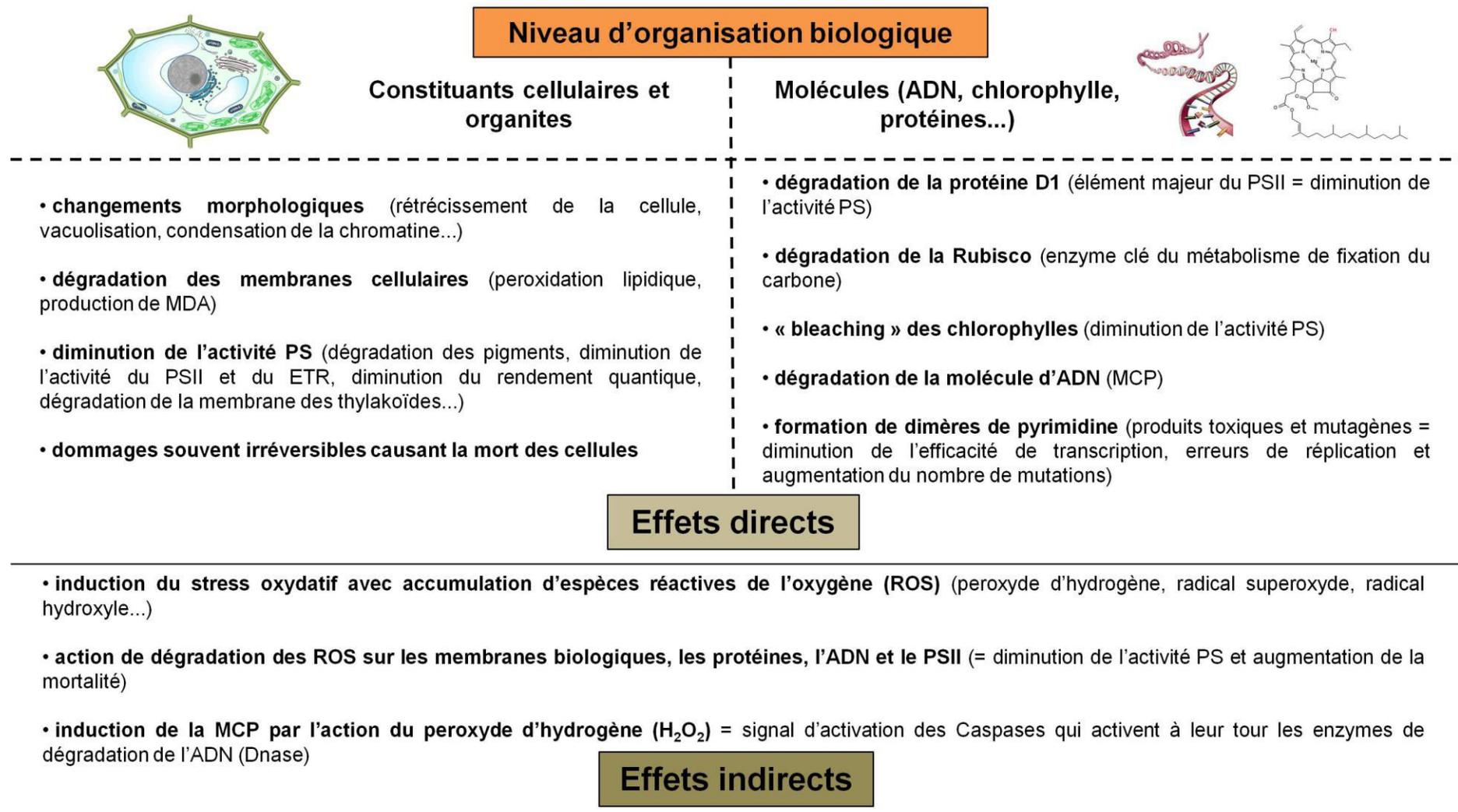


Figure I.3-5 : Synthèse des différents effets des UV-C observés chez les algues et cyanobactéries en fonction du niveau d'organisation biologique.

I.3.2.2.1. *Effets des UV-C sur les champignons*

L'effet des UV-C sur certaines espèces de champignon et de moisissure a également été étudié par plusieurs auteurs. Les études portent principalement sur l'utilisation du rayonnement UV-C comme méthode de traitement et de désinfection sur des spores de champignons rencontrées en milieu médical ou sur des denrées alimentaires. [Valero et al. \(2007\)](#) ont étudié la viabilité et la germination des spores de plusieurs espèces de champignon (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium janthinellum* and *Alternaria alternata*) après exposition à des durées croissantes d'UV-C (de 10 à 600 secondes). [Begum et al. \(2009\)](#) ont également analysé les effets des UV-C sur les champignons, et ce quasiment dans les mêmes conditions expérimentales que l'étude de [Valero et al. \(2007\)](#) (durées d'exposition de 5 à 120 secondes). Les deux études montrent que le taux de survie et le taux de germination des spores sont très fortement diminués en fonction de la dose d'UV-C reçue et de l'espèce étudiée. En effet, certains champignons contenant des pigments de mélanine (pigments noir) semblent plus résistants que les espèces n'en contenant pas. Les mélanines sont considérées comme des pigments photo-protecteur dont le pic d'absorption se situe dans l'UV protégeant ainsi les organismes des dommages cellulaires et jouant notamment un rôle antioxydant ([Suryanarayanan et al., 2004](#) ; [Selvakumar et al., 2008](#) ; [Singaravelan et al., 2008](#)).

Enfin, [Menetrez et al. \(2010\)](#) ont montré que le rayonnement UV-C était efficace pour éliminer des souches de bactéries et de champignons responsables de certaines pathologies et que l'on retrouve dans les systèmes d'air conditionné dans les bâtiments à usage médical.

En résumé :

- Les UV-C causent de **sérieux dommages** tant au niveau **cellulaire** (appareil photosynthétique, membranes...) qu'au niveau **moléculaire** (fragmentation de l'ADN, dégradation des protéines...).
- Les effets des UV-C sur les micro-organismes photosynthétiques peuvent être **directs** (dégradation directe par réaction de photooxydation) ou **indirects** (induction d'un stress oxydatif important).
- Les dommages causés semblent **irréversibles** ; peu d'études ont mis en évidence l'action des **mécanismes** de **protection** et de **réparation** sous exposition aux UV-C.

I.3.3. Domaines d'applications

De nos jours, la technologie d'irradiation par les UV-C est utilisée dans de nombreux secteurs d'activités afin de lutter contre la prolifération d'organismes nuisibles et/ou pathogènes. Il s'agit en particulier du milieu médical, où les surfaces et instruments chirurgicaux sont désinfectés avec des UV-C afin d'éliminer certaines espèces pathogènes de moisissures (Menetrez *et al.*, 2010). En milieu aquatique, les UV-C sont étudiés comme outil potentiel dans la lutte contre les proliférations excessives d'algues et de cyanobactéries appelés « blooms » (Chen *et al.*, 2012 ; Ou *et al.*, 2011 ; Ou *et al.*, 2012) ou encore à des fins d'élimination des micropolluants dans le traitement des eaux potables (Autin *et al.*, 2013 ; Bichai *et al.*, 2009). L'industrie agro-alimentaire (IAA) est également utilisatrice de cette technologie notamment pour augmenter le temps de stockage de certains aliments avant apparition de certaines moisissures (Valero *et al.*, 2007 ; Chun *et al.*, 2009 ; Costa *et al.*, 2006 ; Charles *et al.*, 2009 ; Büchert *et al.*, 2011ab ; Aiamla-Or *et al.*, 2009).

L'utilisation du rayonnement UV-C pour traiter des surfaces et matériaux du patrimoine contaminés par des organismes vivants a déjà été testée ou proposée par plusieurs auteurs et dans plusieurs contextes. Les références à ce sujet sont soit vieilles de plusieurs dizaines d'années, soit correspondent à des présentations lors de congrès internationaux datant d'avant les années 2000 et donc difficilement accessibles.

La première étude référencée sur l'utilisation du rayonnement UV pour lutter contre la prolifération biologique sur des matériaux du patrimoine semble être celle de Van Der Molen *et al.* (1980). Les auteurs ont mis en place une Unité Mobile d'Ultra-Violets (MUVU) afin de traiter certaines parois murales de l'église de St Stephanus à Pilsum (Allemagne) contaminées par des algues et des cyanobactéries. Dans cette étude, les auteurs ont montré par différentes méthodologies (photographie infrarouge, mesures quantitatives de la chlorophylle, microscopie électronique à balayage et comptage des unités formant colonie) que les UV permettent d'éliminer de manière efficace les organismes et que la mise en place d'un tel système est bon marché. Cependant, aucune information n'a pu être acquise quant aux conditions expérimentales de cette étude et notamment quel type d'UV a été utilisé et quelle(s) durée(s) d'exposition ont été appliquées.

Selon Caneva *et al.* (2008), le rayonnement UV germicide (UV-C) peut être utilisé pour éliminer les micro-organismes contaminant les matériaux. Cependant, les auteurs émettent

certaines réserves quant à l'utilisation des UV-C sur des matériaux organiques. Au même titre que les organismes vivants, les matériaux organiques (papiers, bois, textiles...) peuvent être endommagés par les UV-C et ceux-ci peuvent causer un vieillissement du matériau (jaunissement, changement de couleur, détérioration de la structure de macromolécules telles que la cellulose...). [Pethushkova et al. \(1988\)](#), cité dans [Caneva et al. \(2008\)](#), ont obtenu des résultats très satisfaisants en exposant pendant plusieurs heures aux UV-C des matériaux en pierre colonisés par des algues

Dans le contexte particulier de la conservation des milieux souterrains tels que les grottes touristiques, plusieurs auteurs ont également proposé l'utilisation du rayonnement ultraviolet pour lutter contre la contamination algale. Klaus Von Dobat, de l'Institut de Botanique de l'Université de Tübingen, fut le premier à avoir émis l'idée que le rayonnement ultraviolet pouvait être utilisé comme solution alternative aux produits chimiques pour éliminer les micro-organismes et notamment les algues. Il a publié en 1963 une brochure sur ses propres observations effectuées dans la grotte de Lascaux. Selon lui, l'application d'un traitement chimique est, à la longue, voué à l'échec puisqu'il est de toute façon impossible d'éliminer entièrement toutes les algues et toutes les spores et que cela peut nuire aux peintures ([Lefèvre, 1974](#)).

D'autres auteurs, plus récemment, ont également proposé l'utilisation des rayonnements ultraviolets pour lutter contre la contamination algale dans les grottes. [Grobbelaar \(2000\)](#) teste l'efficacité du rayonnement UV-C sur des algues proliférant dans la grotte de Congo en Afrique du Sud et montre que cette méthode est efficace pour éradiquer et décolorer les algues. Il émet cependant des réserves quant à l'utilisation de cette technique en disant que l'application prend du temps et qu'elle n'est pas adaptable lors des visites. [Mulec \(2014\)](#) pense que l'utilisation des UV dans une grotte n'est pas une procédure adaptée car potentiellement dangereuse pour la faune cavernicole.

I.4. Contexte et démarche scientifique de la thèse

Choix des modèles d'étude

Les micro-algues photosynthétiques, appartenant à la division des Chlorophytes et que nous nommerons par la suite algues (ou parfois micro-algues) pour plus de commodité, ont été choisies comme modèle d'étude principal pour la réalisation de ces travaux pour plusieurs raisons. La première est qu'elles sont considérées comme des espèces pionnières dans les dynamiques de colonisation des matériaux en pierre et particulièrement dans les grottes touristiques où les zones nouvellement éclairées sont rapidement colonisées par des souches d'algues à croissance rapide. La présence de ces algues va ensuite favoriser l'installation d'autres micro-organismes photosynthétiques comme les cyanobactéries ou non photosynthétiques comme les champignons mais également permettre la prolifération d'organismes vascularisés tels que les mousses, fougères et plantes supérieures. Les algues sont donc à la base de la complexification des communautés de phototrophes se développant autour des lampes dans une grotte et que l'on nomme « lampenflora ». Plus largement, les algues sont également impliquées dans les phénomènes de colonisation des matériaux du patrimoine se situant à l'extérieur (façades de bâtiments, monuments historiques et autres biens culturels en pierre) où elles trouvent les conditions idéales à leur prolifération (éclairage, humidité...).

La deuxième raison réside dans le fait que les algues sont largement responsables des phénomènes de biodétérioration causés sur les formations minérales et rocheuses qu'elles colonisent. La dégradation du support par les algues est d'autant plus importante en milieux souterrains où les formations carbonatées sont très sensibles au phénomène de biocorrosion causé par l'excrétion d'acides.

Enfin, les algues sont des micro-organismes faciles à cultiver au laboratoire. Cela ne nécessite que très peu de moyens et elles s'adaptent à n'importe quelles conditions.

Bien que les algues aient constitué le principal modèle de ces travaux, nous avons également travaillé sur deux autres modèles d'étude qui nous semblaient intéressants d'aborder ne serait-ce que de manière préliminaire : les champignons filamenteux, également impliqués dans les phénomènes de biodétérioration des matériaux du patrimoine et certains types de matières picturales, utilisées autrefois pour la réalisation des peintures préhistoriques. Les

champignons filamenteux constituent également un modèle biologique très intéressant étant donné leur implication dans les problématiques de conservation de certains sites comme la grotte de Lascaux ou celle d'Altamira en Espagne. Enfin, les matières picturales ont été choisies afin d'évaluer les effets potentiels de la méthode de traitement par les UV et ainsi de suggérer ou non son application dans des sites renfermant des vestiges préhistoriques comme les peintures rupestres.

Choix de l'environnement de travail

Les milieux souterrains et plus particulièrement les grottes touristiques ont été choisis car ils constituent un environnement de travail intéressant dans lequel sont regroupés à la fois des problématiques liées à leur conservation mais aussi des problématiques de préservation de l'environnement. La combinaison des deux approches n'est pas toujours facile dans ces milieux particulièrement sensibles aux perturbations anthropiques. La recherche de procédés nouveaux pour lutter contre les problématiques liées à la colonisation biologique (phénomènes de biodétérioration, pollution de l'environnement par l'emploi des produits chimiques...) semble aujourd'hui primordiale. C'est pourquoi les travaux de cette thèse se sont orientés vers cet enjeu et contexte singulier qu'est la conservation des grottes touristiques. De plus, l'écosystème souterrain est également un environnement très intéressant à étudier en termes d'écophysiologie et d'écologie des micro-organismes qui se sont adaptés à ces conditions particulières. Enfin, certains sites renferment une valeur patrimoniale unique (peintures et gravures préhistoriques), ajoutant ainsi à la notion de protection une dimension supplémentaire.

Les grottes touristiques ont donc constitué l'environnement de travail spécifique pour la réalisation de cette thèse. Que ce soit pour le prélèvement des échantillons d'algues ainsi que pour la mise en place des différentes expérimentations de terrain, les grottes et plus précisément la grotte des Moidons, se sont trouvées au cœur du sujet avec pour objectif principal d'évaluer l'efficacité du traitement par les UV-C comme méthode alternative à l'utilisation des produits chimiques dans ces milieux. Les grottes ont également été choisies comme environnement d'étude car peu de travaux s'intéressent à ces problématiques alors que les produits chimiques tels que les algicides ou composés chlorés, du moins en France, sont encore largement utilisés pour nettoyer les zones colonisées par les algues et autres micro-organismes.

I.5. Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse se situe à l'interface entre plusieurs disciplines scientifiques (physiologie végétale, microbiologie, biologie moléculaire, écophysiologie, conservation du patrimoine...) et a pour principal objectif, à travers des études et analyses menées en conditions contrôlées au laboratoire ainsi que sur le site d'étude de la grotte des Moidons, de comprendre et de mettre en évidence les effets et l'efficacité du rayonnement UV-C comme méthode alternative aux traitements chimiques pour lutter contre la prolifération des micro-organismes photosynthétiques sur les matériaux du patrimoine. Comme nous l'avons vu précédemment, cette thèse aborde plus précisément le contexte de la prolifération algale dans les grottes touristiques.

Plusieurs objectifs complémentaires expliqués ci-dessous et présentés de manière synthétique dans la **Figure I.5-1** ont donc été choisis afin de répondre à l'objectif principal.

L'**Objectif 1** consiste à étudier et comprendre l'effet du rayonnement UV-C sur plusieurs souches cavernicoles de micro-algues vertes à différents niveaux d'organisation biologique (cellule, molécule et biofilm). Il permet, avec l'apport des différentes méthodologies et paramètres mesurés, de mettre en avant les principaux dommages cellulaires et moléculaires causés par les UV-C et également de comprendre les différents mécanismes, qu'ils soient directs ou indirects, immédiats ou différés, impliqués dans ces dommages. Cette partie permet également de faire ressortir plusieurs paramètres clés essentiels à prendre en compte pour étudier l'efficacité des UV-C comme méthode alternative de traitement.

L'**Objectif 2** a pour but l'optimisation des durées d'exposition et doses d'UV-C efficaces en termes d'éradication et de décoloration des algues pour une application future en conditions réelles.

Ces deux objectifs sont traités dans les **Chapitres 1** et **2** dans lesquels nous présentons les données et résultats obtenus en conditions contrôlées sur plusieurs souches cavernicoles de micro-algues photosynthétiques.

L'**Objectif 3** concerne l'étude des dynamiques et des facteurs influençant la colonisation des micro-organismes photosynthétiques dans la grotte des Moidons. Une approche multi-échelle au niveau du biofilm et de la cavité a été utilisée afin de comprendre

quels étaient les paramètres clés dictant l'installation et la prolifération de ces micro-organismes.

L'**Objectif 4** a pour but de tester les paramètres optimisés dans l'objectif 2 et d'étudier l'efficacité des traitements UV-C sur des biofilms phototrophes proliférant dans la grotte des Moidons. Des suivis photographiques et colorimétriques sur court et moyen terme ont été mis en place sur plusieurs biofilms pour analyser l'efficacité des traitements UV-C et optimiser leur utilisation.

Ces objectifs sont abordés dans le **Chapitre 3** dans lequel nous avons mené diverses études et expérimentations sur le site d'étude de la grotte des Moidons (Jura, France).

Une partie des résultats présentée dans le **Chapitre 4** constitue une approche complémentaire de l'effet du rayonnement UV-C sur deux autres modèles d'études : les champignons filamenteux et les matières picturales. Cette approche fait partie d'un **objectif complémentaire** visant à étudier les effets potentiels des UV-C sur deux souches fongiques et divers pigments colorés afin d'élargir le sujet et de proposer l'application de la méthode dans des contextes différents.

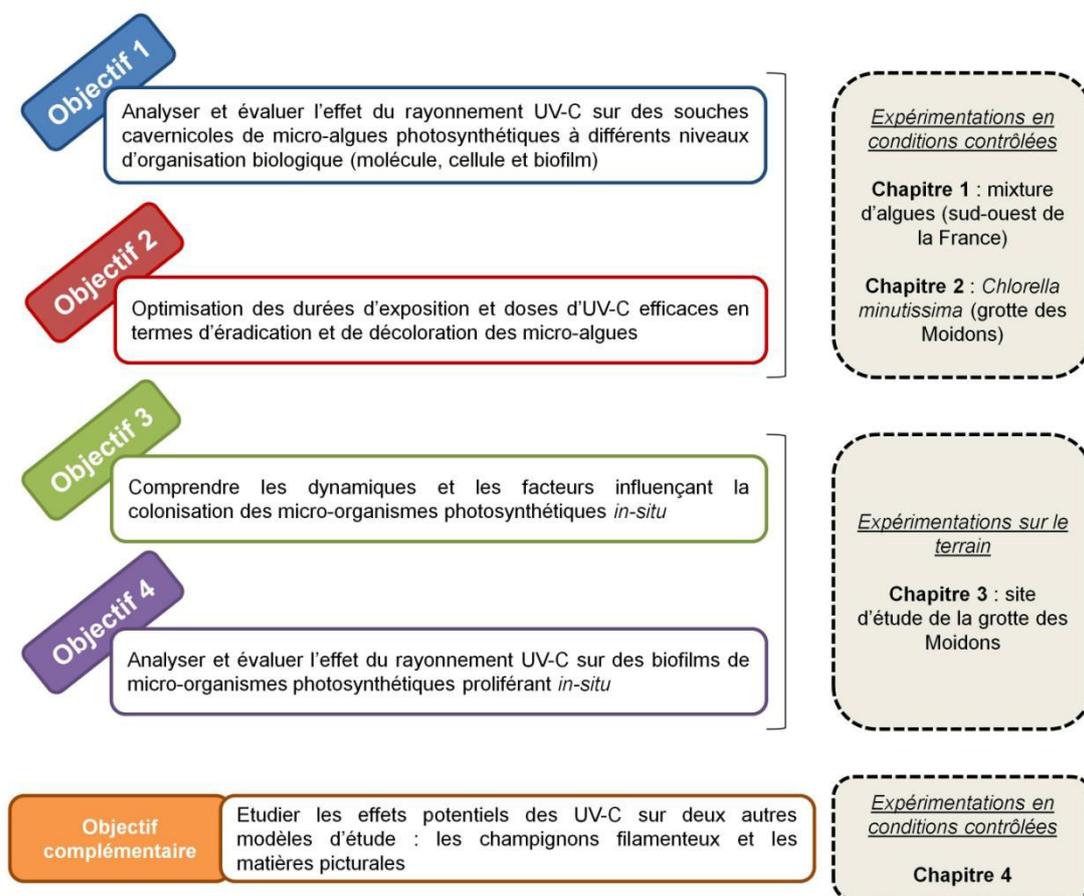


Figure I.5-1 : Schéma synthétique présentant les principaux objectifs de la thèse

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. Expérimentations menées en conditions contrôlées

Au cours de ce travail plusieurs modèles biologiques et non biologiques ont été étudiés et analysés au laboratoire afin de répondre aux objectifs fixés. Le principal modèle d'étude est un ensemble de souches cavernicoles de micro-algues vertes provenant de différents sites situés en France. Parallèlement à cela, deux autres modèles biologiques et non biologiques ont également fait l'objet d'analyses en conditions de laboratoire. Il s'agit de deux souches de champignons filamenteux et de plusieurs échantillons de nature minérale à savoir un ensemble de matières picturales et de pigments colorés.

II.1.1. Les micro-algues vertes

II.1.1.1. Nature et provenance des algues

Plusieurs échantillons d'algues vertes de nature et de provenance différentes ont été utilisés au cours de cette thèse. Les premiers échantillons d'algues ont été fournis par le Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques de Paris (LRMH) et ont été utilisés pour la réalisation de la première étude (**Chapitre 1**). Ces échantillons ont été prélevés dans trois sites du sud-ouest de la France (les grottes de Domme et de Jovelle et l'abri sous-roche de Laugerie-Haute ; localisation et caractéristiques des sites dans la **Figure II.1-1** et le **Tableau II.1-1**). Les échantillons ont été prélevés directement sur des parois colonisées par des biofilms verts à l'aide d'un scalpel stérile. L'identification partielle des souches d'algues a ensuite été effectuée au LRMH par observations microscopiques. Les suspensions cellulaires alors fournies pour le début de la thèse étaient principalement composées d'une souche d'algue verte filamenteuse, *Klebsormidium flaccidum* (classe des Klebsormidiophyceae, ordre des Klebsormidiales et famille des Klebsormidiaceae). Bien que l'espèce *K. flaccidum* fut dominante, d'autres souches d'algues ont pu être observées dans ces échantillons mais n'ont pas été identifiées de manière précise. Ces souches appartenaient principalement à la classe des Chlorophycées.



Figure II.1-1 : Localisation des sites de prélèvement des échantillons d'algues.

Tableau II.1-1 : Principales caractéristiques des trois sites de prélèvement des algues du sud-ouest de la France.

Sites de prélèvements	Localisation précise	Principales caractéristiques	Photos
Grotte de Domme	Commune de Domme, sous la bastide <u>coordonnées géographiques</u> : 44°48'10.1"N 1°12'51.8"E	450 m de galeries ; présence de formations carbonatées (stalagmites, stalactites, draperies...)	
Grotte de Jovelle	Commune de la Tour Blanche <u>coordonnées géographiques</u> : 45°21'37"N 0°25'48"E	50 m de long, entre 2 et 3 m de large et 3 m de hauteur à l'entrée ; formée dans un banc de calcaire ; présence d'art pariétal (gravures)	
Abri sous-roche de Laugerie-Haute	Commune des Eyzies-de-Tayac ; rive droite de la Vézère <u>coordonnées géographiques</u> : 44°57'11"N 1°00'12"E	160 m de long et 30 m de large (4800 m ²) ; formé dans la roche calcaire à flanc de falaise ; présence d'art pariétal (gravures)	

La suite des expérimentations menées au laboratoire (**Chapitre 2**) a été effectuée sur une espèce d'algue, *Chlorella minutissima* (classification dans le **Tableau II.1-2**) prélevée sur le site d'étude de la grotte des Moidons (**Figure II.1-1**). L'endroit du prélèvement est indiqué dans la **Figure II.1-2**. La description détaillée du site d'étude de la grotte des Moidons est présentée dans la **Figure II.2-2**. Après prélèvement, les échantillons ont été mis en culture au laboratoire et observés sous microscopie optique afin d'identifier les souches algales présentes. Certains caractères morphologiques facilement identifiables tels que la taille et la forme des cellules et des chloroplastes ont été utilisés et ont permis l'identification de 3 souches d'algues au niveau du genre ou de l'espèce à l'aide de la clé d'identification de [John et al. \(2002\)](#).

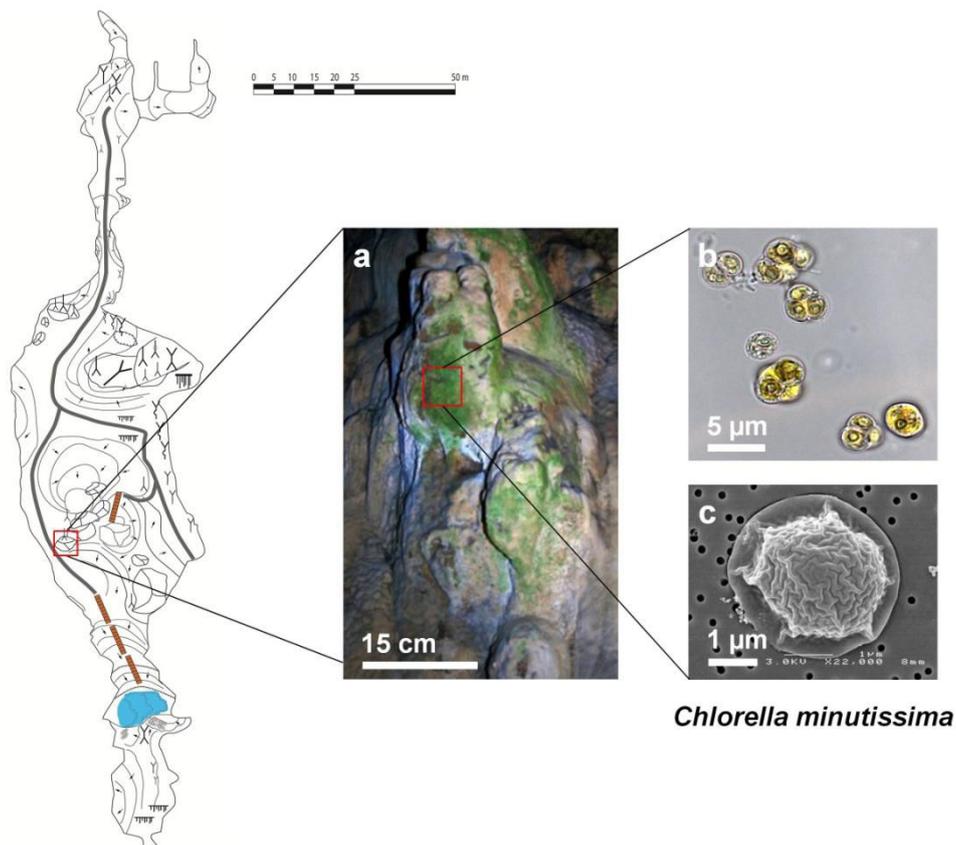


Figure II.1-2 : Localisation et photographies des prélèvements de *Chlorella minutissima* dans la grotte des Moidons. Photo a : biofilm de micro-organismes phototrophes se développant sur une formation carbonatée de la grotte des Moidons ; photo b : *C. minutissima* vu par microscopie optique ; photo c : *C. minutissima* vu par microscopie électronique à balayage (MEB).

Le **Tableau II.1-2** présente les 3 genres et espèces de micro-algues vertes dominantes observés dans le prélèvement effectué dans la grotte des Moidons.

Tableau II.1-2 : Caractéristiques morphologiques des genres et espèce d'algues identifiées lors du prélèvement dans la grotte des Moidons.

Genre / Espèce	Classification	Critères morphologiques
<i>Chlorella minutissima</i> (Fott and Nováková 1969)	Règne : végétal Embranchement : Chlorophytes Classe : Trebouxiophyceae Ordre : Chlorellales Famille : Chlorellaceae	Cellules rondes de petite taille (diamètre compris entre 2 et 3 μm), 1 chloroplaste en forme de croissant de lune couvrant environ les $\frac{2}{3}$ de la cellule
<i>Bracteacoccus</i> sp.	Règne : végétal Embranchement : Chlorophytes Classe : Chlorophyceae Ordre : Chlorococcales Famille : Chlorococaceae	Cellules rondes de grande taille (diamètre compris entre 5 et 9 μm), plusieurs chloroplastes pariétaux
<i>Scenedesmus</i> sp.	Règne : végétal Embranchement : Chlorophytes Classe : Sphaeropleales Ordre : Scenedesmaceae Famille : Scenedesmoidea	Cellules de forme ellipsoïdale ou fusiforme, généralement 2, 4 ou 8 cellules reliées latéralement, longueur comprise entre 5 et 30 μm et largeur entre 8 et 10 μm

Après plusieurs semaines de culture, les suspensions d'algues étaient composées quasi exclusivement de l'espèce *C. minutissima*, qui s'est acclimatée aux conditions de culture au détriment des autres genres préalablement observés.

II.1.1.2. Conditions de culture des algues

II.1.1.2.1. *En milieu liquide*

Les souches d'algues provenant du sud-ouest de la France ainsi que l'espèce *C. minutissima* ont été cultivées en milieu liquide sous conditions contrôlées. Des suspensions d'algues de 250 ml sont disposées dans des erlenmeyers contenant un milieu de culture complet adapté à la croissance des algues (BG11 freshwater medium, SIGMA, **Annexe 1**). Les erlenmeyers sont ensuite disposés sur une table d'agitation (100 rpm) (**Figure III.1-1 A**)

afin de permettre l'oxygénation du milieu et éviter la sédimentation et l'accroche des cellules d'algues sur les parois. Deux conditions de culture ont été choisies au cours de cette thèse : la condition « optimales » en chambre de culture, décrite dans l'Article 1 (paragraphe III.1.1.2.2) et la condition « grotte » en enceinte de culture (phytotron), décrite dans l'Article 2 (paragraphe III.2.3.2.1). Les cultures d'algues sont renouvelées environ toutes les 3 semaines en suivant le principe du repiquage (Figure II.1-3) afin de disposer de matériel biologique frais en phase exponentielle de croissance pendant toute la durée des expériences.

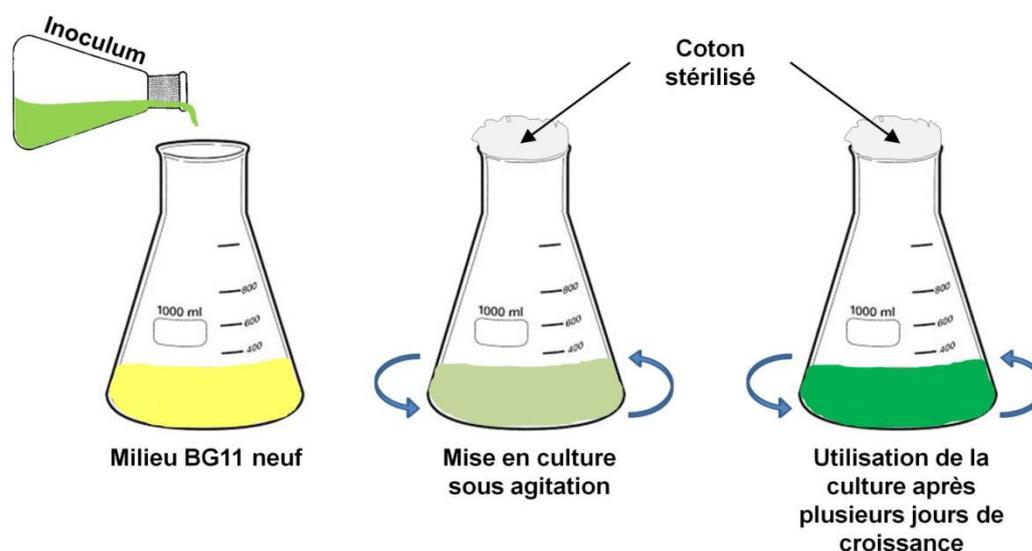


Figure II.1-3 : Principe général du repiquage des algues.

Le principe du repiquage est le suivant : 20 ml de suspension d'algues sont prélevés dans une culture existante et remis en suspension dans un milieu neuf contenant 225 ml d'eau distillée et 5 ml de milieu de culture BG11 50x (concentration finale 1x). L'opération s'effectue sous une hôte à flux laminaire et avec de la verrerie préalablement stérilisée sous UV afin d'éviter toute contamination. Les erlenmeyers fraîchement repiqués sont ensuite placés en chambre de culture ou phytotron selon les conditions de culture adoptées.

II.1.1.2.2. *Sur support solide*

Afin de mimer la structure en multicouches d'un biofilm, les algues ont étéensemencées sur des blocs de calcaire de 6 cm de longueur, 4 cm de largeur et 6 mm d'épaisseur fournis par le LRMH. Un protocole de standardisation de l'ensemencement des

algues a été élaboré et est présenté dans la **Figure II.1-4**. Cette technique d'ensemencement permet d'estimer le nombre de cellules déposées sur le support et ainsi de créer, sur une surface d'ensemencement standard (cercle de 1 ou 4 cm de diamètre), un nombre de couches cellulaires plus ou moins important (variation de l'épaisseur). Après avoir estimé la concentration cellulaire de la suspension d'ensemencement par la technique de la mesure de la DO à 750 nm, les algues sont ensuite déposées sur le bloc manuellement à l'aide d'une pipette. Les biofilms d'algues sont ensuite incubés en chambre ou enceinte de culture selon la modalité de culture choisies (« optimales » ou « grotte »).

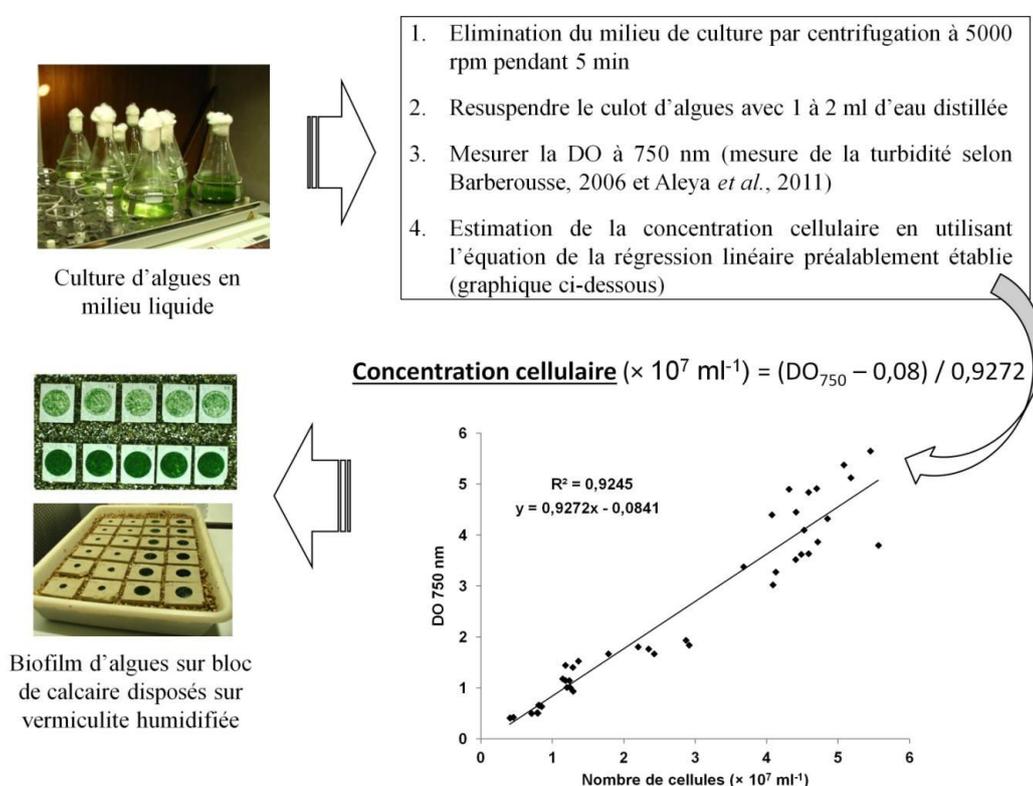


Figure II.1-4 : Protocole d'ensemencement des algues sur support solide.

II.1.1.3. Paramètres mesurés et méthodes d'analyses

II.1.1.3.1. Micro-algues en milieu liquide

Au cours de cette thèse, les algues cultivées sous forme de suspension cellulaire ont été soumises à différents traitements aux UV-C et plusieurs paramètres mesurés ont permis d'évaluer et d'étudier les effets du rayonnement UV-C à différents niveaux d'organisation biologique (moléculaire et cellulaire).

Comptage cellulaire et calcul du taux de croissance

Le comptage cellulaire a permis de suivre l'évolution de la densité cellulaire au cours des diverses expériences, que ce soit pour le suivi de la croissance des algues en fonction des différentes conditions de culture ou pour évaluer l'effet des différents traitements aux UV-C.

Le comptage cellulaire a été effectué par microscopie optique à l'aide d'une cellule de Malassez (**Figure II.1-5**). Environ 15 µl de suspension algale préalablement homogénéisée sont introduits entre la cellule de Malassez et une lamelle. Après quelques minutes d'attente pour laisser sédimenter les cellules d'algues, l'échantillon est placé sous le microscope et les cellules sont comptées sur les 25 unités de comptage. Une unité de comptage a un volume de 0,01 µl ($0,01 \times 25 = 0,25 \mu\text{l}$).

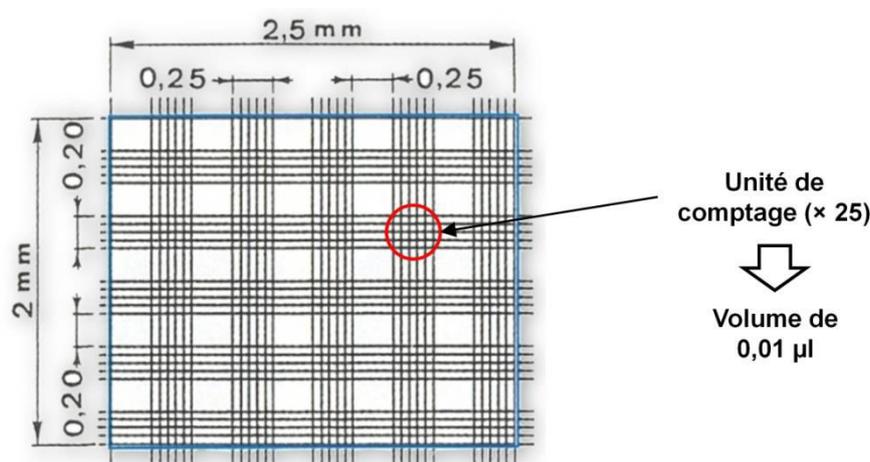


Figure II.1-5 : Schéma de la zone de comptage d'une cellule de Malassez.

Le comptage en cellule de Malassez peut être fastidieux et long lorsque beaucoup d'échantillons sont à mesurer. C'est pourquoi nous avons adopté une méthode plus rapide permettant d'estimer le nombre de cellules. Il s'agit de la mesure de la turbidité de l'échantillon par spectrométrie à 750 nm. Cette technique a été adaptée d'après les travaux de Barberousse (2006) et d'Aleya *et al.* (2011). La relation linéaire permettant d'estimer le nombre de cellules à partir de la mesure de la DO 750 nm est présentée dans la **Figure II.1-4**.

Le taux de croissance des algues a été suivi en fonction des différentes modalités de culture et calculé d'après la formule présentée dans l'étude d'Aleya *et al.* (2011). La formule est la suivante :

$$\mu (j - 1) = \frac{1}{t} \times \ln \left(\frac{A\theta}{A0} \right)$$

où μ est le taux de croissance en jours (nombre de cellule produite par jour), t la durée de l'expérience en jours, A_0 et A_t les densités cellulaires à la fin et au début de l'expérience déterminées grâce à la DO 750 nm.

Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été déterminée en utilisant une méthode de coloration des cellules avec du Bleu de Trypan (2,7-naphtalenedisulfonic acid, 3,30-((3,30-dimethyl (1,10-biphenyl) 4,40-diyl-) bis (azo), bis (5-amino 4-hydroxy-) tetrasodium)). La coloration au bleu de trypan est une méthode de coloration des cellules mortes. Le composé a tendance à pénétrer dans les cellules qu'il rencontre. Une fois dans la cellule, la molécule en question entraîne un mécanisme d'exclusion qui va éjecter cette molécule dans le milieu extérieur. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules possédant une source d'ATP peuvent le mettre en place. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule et restera blanche au microscope, au contraire une cellule morte n'aura pas les moyens de la rejeter et restera bleue.

Les cellules vivantes et mortes sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez sous microscope optique. Le pourcentage de viabilité est ensuite calculé avec la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de viabilité (\%)} = \left(\frac{\text{nombre de cellules claires}}{\text{nombre de cellule totales}} \right) \times 100$$

Le protocole de coloration des cellules au Bleu de Trypan est détaillé dans l'**Article 1, paragraphe III.1.1.2.3.**

Suivi des échanges gazeux

L'activité métabolique des algues (photosynthèse et respiration) a été mesurée en suivant l'évolution des concentrations en oxygène dans le milieu (suspension d'algues) à l'aide d'un oxygraphe (DW2/2 Electrode Chamber) équipé d'une électrode de Clark (S1 oxygen electrode disc) (Hansatech Instruments). L'acquisition des données se fait avec un ordinateur équipé du logiciel Hansatech permettant le calcul automatique des pentes des courbes obtenues à l'obscurité (pente négative = consommation d'O₂ donc respiration) et à la

lumière (pente positive = rejet d'O₂ donc photosynthèse). Les données sont exprimées en nmol d'O₂ min⁻¹ puis standardisées en nmol d'O₂ 10⁶ cellules⁻¹ h⁻¹ après avoir mesuré la DO 750 nm pour le calcul de la concentration cellulaire.

Le protocole détaillé du suivi des concentrations en oxygène pour les échantillons d'algues exposés ou non aux UV-C est présenté dans l'**Article 2 (paragraphe III.2.3.2.5)**.

Mesures des teneurs en pigments chlorophylliens et non chlorophylliens

L'extraction ainsi que le dosage des pigments chlorophylliens (chlorophylles *a* et *b*, Chl*a* et Chl*b*) et non chlorophylliens (caroténoïdes, Car) ont été adaptés et modifiés d'après l'étude de [Devesa et al., \(2007\)](#). Le solvant d'extraction utilisé est du méthanol 100 %. Après obtention des extraits de pigments, les absorbances à 652,4 nm, 665,2 nm et 470 nm ont été mesurées en spectroscopie UV-visible (Uvikon 923, Bio-Tek Instruments) et les calculs des concentrations exprimées en µg ml⁻¹ ont été effectués en utilisant les formules des travaux de [Devesa et al., \(2007\)](#) (**Article 2, paragraphe III.2.3.2.4**).

Mesures des concentrations en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Les concentrations en peroxyde d'hydrogène ont été mesurées en utilisant une préparation colorée à base de xylenol d'orange (ferric oxidation- xylenol orange Fe-XO). Le protocole final (**Article 2, paragraphe III.2.3.2.7**) a été adapté d'après les études de [Gay et al. \(1999\)](#) et [Cheeseman \(2006\)](#). En présence de H₂O₂, la préparation colorée de xylenol d'orange se teint en violet et la densité optique est mesurée à 560 nm. Une courbe étalon a été préalablement établie pour le calcul des concentrations dans les échantillons d'algues (**Figure II.1-6**).

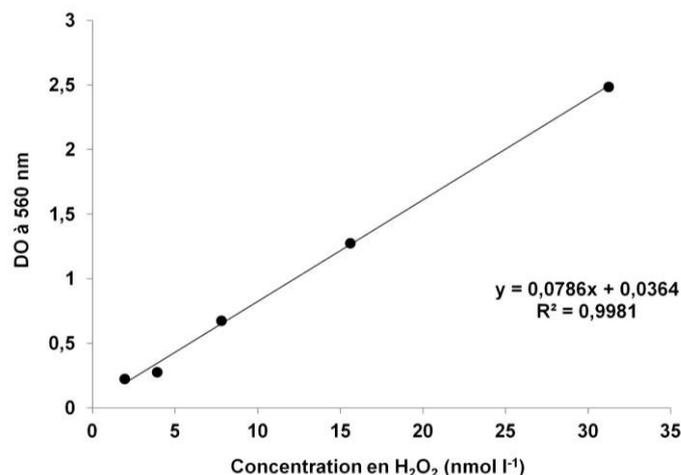


Figure II.1-6 : Courbe étalon des concentrations en H₂O₂ en fonction de la densité optique à 560 nm.

Les résultats exprimés en nmol de H₂O₂ ml⁻¹ sont ensuite standardisés en nmol de H₂O₂ g⁻¹ FW (fresh weight).

Mesures des concentrations en Malondialdéhyde (MDA)

Le MDA est un marqueur de lipoperoxydation et réagit avec l'acide thiobarbiturique (TBA) (TBARS pour *thiobarbituric acid-reactive substances*). Le dosage du MDA a donc été effectué par réaction colorimétrique avec le TBA, qui forme ainsi un composé rose dont la DO est mesurée à 532 et 600 nm (Tian et Yu, 2009). Le protocole final d'extraction et de dosage du MDA est détaillé dans l'Article 2, paragraphe III.2.3.2.6.

Microscopie à épi-fluorescence

Les noyaux des cellules d'algues traitées ou non aux UV-C ont été visualisés sous microscopie à épi-fluorescence (Axio Imager M2p, ZEISS) après incubation avec un marqueur fluorescent de l'ADN (Hoechst 32258, Sigma Aldrich). Cette technique permet d'observer l'intégrité des noyaux avant et après exposition aux UV-C (condensation de la chromatine, fragments internucléosomiaux...). Le protocole de marquage des cellules au Hoechst est détaillé dans l'Article 2, paragraphe III.2.3.2.8.

Analyse de la fragmentation de l'ADN par cytométrie en flux

La détection de la fragmentation de l'ADN (signe tardif de la mort cellulaire programmée ou apoptose) chez les échantillons d'algues exposées ou non aux UV-C a été réalisée en utilisant la méthode TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*). Pour cela, le kit "In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein" (Roche) a été utilisé pour marquer les cellules et l'acquisition des données a été faite par cytométrie en flux (CXP Cytometer, Beckman Coulter). Le détail du protocole de marquage des cellules ainsi que des analyses en cytométrie sont présentés dans l'**Article 2, paragraphe III.2.3.2.9**.

II.1.1.3.2. *Micro-algues sur support solide*

Afin d'analyser l'effet des UV-C à l'échelle des biofilms d'algues, nous avons choisi deux approches : une approche macroscopique (mesure des paramètres tels que le pourcentage de recouvrement et la surface d'occupation) et une approche colorimétrique (analyse par spectrocolorimétrie des variations colorimétriques).

Mesure des paramètres macroscopiques

Plusieurs méthodes ont été utilisées au cours de la thèse afin de mesurer les paramètres macroscopiques des biofilms d'algues cultivés sur support solide. Ces paramètres sont le pourcentage de recouvrement et la surface d'occupation.

Dans un premier temps, la surface d'occupation des biofilms a été mesurée à l'aide du logiciel AxioVision Rel 4.6. Tout d'abord, l'ensemble des échantillons a été photographié avec une loupe binoculaire (Stemi 2000-CS ZEISS) reliée à un ordinateur. A l'aide de l'outil « contour » du logiciel, les bords externes du biofilm ont été manuellement dessinés afin de créer une zone unique dont la surface en mm^2 a été automatiquement calculée par le logiciel. Cette technique a été utilisée dans le **Chapitre 1** mais s'est avérée n'être que partiellement adaptée à nos attentes puisqu'elle ne tenait pas compte des variations de colonisation à l'intérieur de la zone étudiée. C'est pourquoi nous avons utilisé dans cette étude un second paramètre, le pourcentage de recouvrement. Celui-ci a été mesuré grâce au logiciel d'analyse d'image ImageJ 1.47t en utilisant une technique de seuil de contraste après transformation des images en noir et blanc (**Figure II.1-7**). Les mêmes images que celles utilisées pour la mesure

de la surface d'occupation ont été transformées en noir et blanc (16 bits) puis un seuil de contraste (outil « Threshold » du logiciel) a été appliqué afin de dissocier les zones non colonisées (pixels normaux) des zones colonisées (pixels rouges). Les réglages du seuil de contraste ont été effectués après plusieurs essais sur différentes photographies afin d'adopter la meilleure valeur de contraste permettant à la fois la prise en compte de la plus grande partie du biofilm et l'élimination du contour du biofilm (dessiné au crayon de papier) ainsi que des aspérités de couleur sombre présentes sur le support. Ensuite, le pourcentage de pixels rouges par rapport au nombre total de pixels a été calculé automatiquement en utilisant la fonction « Measure » du logiciel.

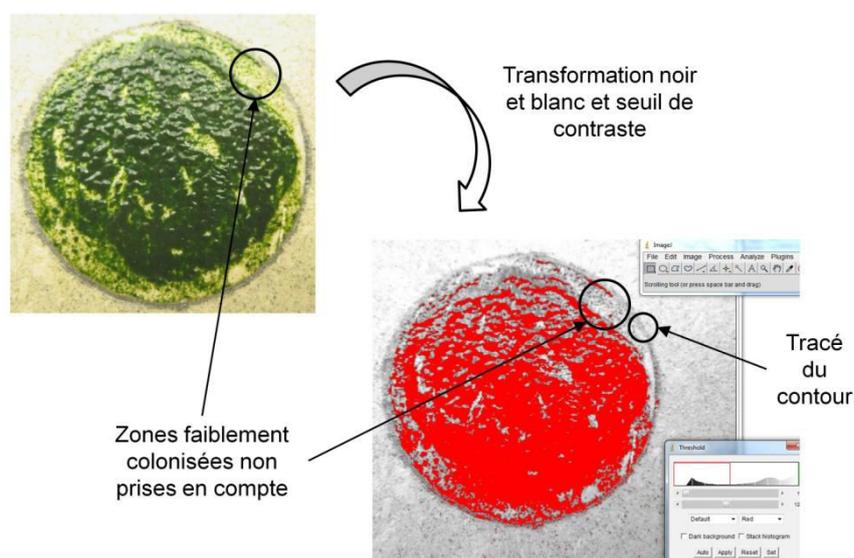


Figure II.1-7 : Méthode de « Thresholding » sur image en noir et blanc utilisée dans le Chapitre 1 pour mesurer le pourcentage de recouvrement des biofilms d'algues cultivés sur support solide.

Comme le montre la **Figure II.1-7**, les zones les moins densément colonisées sont omises dans le calcul du pourcentage de recouvrement. L'objectif à la suite de cette 1^{ère} étude était d'améliorer la méthode de mesure afin de rendre plus pertinente l'acquisition des données.

L'analyse des travaux de [De Muyneck et al. \(2009\)](#) ainsi qu'une meilleure maîtrise du logiciel ImageJ ont permis d'améliorer de manière conséquente les mesures macroscopiques à l'échelle du biofilm. La suite des travaux sur les biofilms (**Chapitre 2, paragraphe III.2.4**) a donc été réalisée avec la même approche photographique et d'analyse d'images mais cette fois-ci en utilisant un seuil de contraste sur image en couleur en utilisant les coordonnées de

l'espace de couleur CIE Lab (Commission International de l'Eclairage). Après avoir téléchargé les images des biofilms dans le logiciel, l'outil « Color Threshold » a été appliqué en choisissant les paramètres suivants : L* (« Pass » coché) ; a* (« Pass » non coché) ; b* (« Pass » coché) ; « Thresholding method » : « Default » ; « Threshold color » : B/W ; « Color space » : Lab ; « Dark background » coché. Ces paramètres ont été adoptés pour l'ensemble des biofilms à mesurer (traités ou non traités aux UV-C). La **Figure II.1-8** montre la qualité de la méthode dans la détection des zones même faiblement colonisées et l'élimination du tracé du contour du biofilm ainsi que des aspérités du support. Après cette transformation, l'outil « Select » a été appliqué afin de sélectionner toutes les zones concernées par le seuil de contraste (pixels blancs) et, après avoir réglé l'échelle de la photo en cm (outil « Set Scale » dans l'onglet « Analyze »), l'outil « Measure » a permis le calcul automatique de la surface réelle de colonisation des algues sur le bloc en cm².

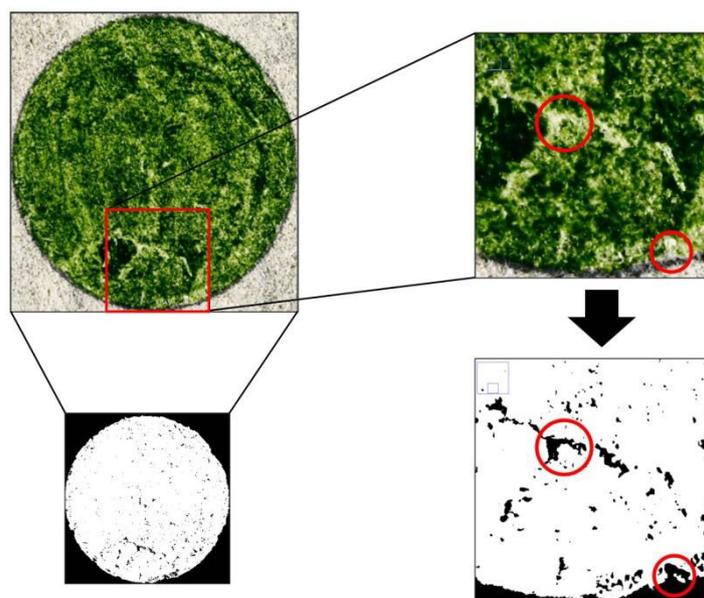


Figure II.1-8 : Méthode de « Thresholding » sur image en couleur utilisée dans le Chapitre 2 pour mesurer la surface de colonisation des biofilms d'algues cultivés sur support solide. Les cercles rouges indiquent la qualité et la précision des paramètres de contraste choisis.

Mesures colorimétriques

➤ Principe général

L'espace de couleur utilisée est l'espace L*a*b*, dont la représentation schématique sous forme de sphère est illustrée dans la **Figure II.1-9**. L'espace L*a*b* permet de

caractériser une couleur à l'aide d'un paramètre d'intensité correspondant à la clarté de l'échantillon (de 0, noir à 100, blanc) et de deux paramètres de chromaticité : la a^* (positif, rouge et négatif, vert) et le b^* (positif, jaune et négatif, bleu). Les valeurs de chromaticité s'étalent de -300 à 299.

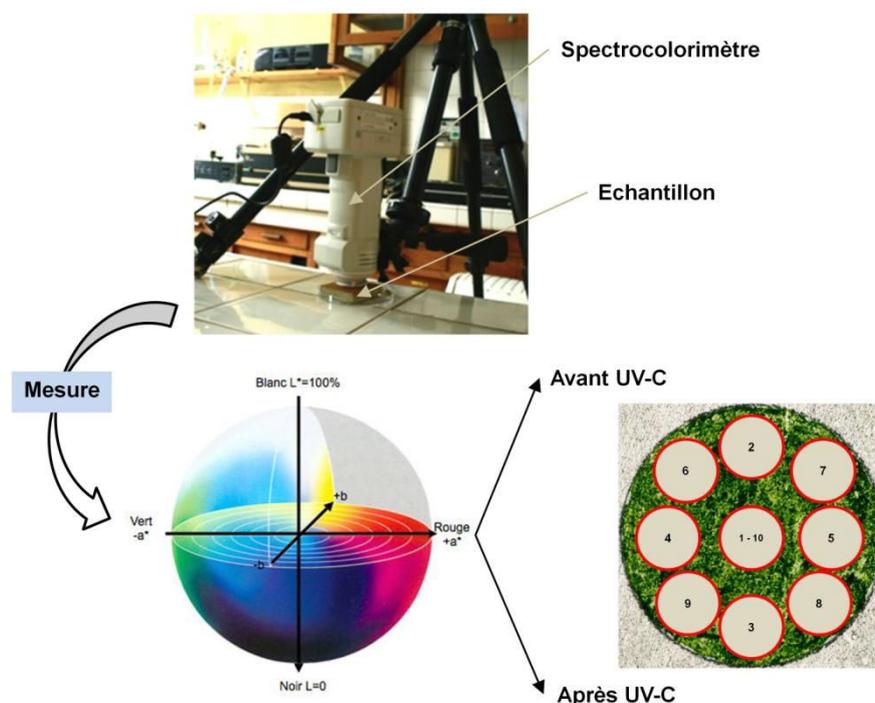


Figure II.1-9 : Appareil de mesure de la couleur, représentation schématique de l'espace colorimétrique $L^*a^*b^*$ et méthode de mesure moyennée sur biofilm.

➤ Protocole expérimental

La mesure de la couleur a été réalisée avec un spectrocolorimètre (CM-600d KONICA MINOLTA) et le logiciel d'acquisition et de traitement des données SpectraMagic NX Pro. L'appareil de mesure est équipé d'un masque de mesure d'un diamètre de 8 mm et les mesures sont effectuées en mode SCI (*Specular Reflectance Included*) et avec l'illuminant D65.

Les études de [De Muynck et al. \(2009\)](#), [Prieto et al. \(2004, 2010\)](#), [Sanmartín et al. \(2010, 2011\)](#), [Cutler et al. \(2013\)](#) et de [Vázquez-Nion et al. \(2013\)](#) ont permis de mettre au point une méthode fiable de mesure de la couleur sur des biofilms d'algues cultivés sur support solide. Pour chaque biofilm à analyser, 10 points de mesure ont été répartis sur l'ensemble du biofilm afin de rendre compte de l'hétérogénéité de la colonisation (**Figure**

II.1-9). A la fin de l'acquisition des 10 points de mesure, l'appareil enregistre une valeur moyenne spectrale. Cinq réplicats sont utilisés pour chaque expérience et nous utilisons ensuite la moyenne \pm l'écart-type de ces 5 échantillons.

Les mesures colorimétriques ont été utilisées dans deux expériences différentes. La première expérience consiste à mettre en relation les valeurs des paramètres colorimétriques (L^* , a^* et b^*) avec le nombre de cellules déposées sur le bloc ainsi que les teneurs en *Chla* et *Chlb*. Cette parenthèse méthodologique a pour objectif de montrer l'intérêt de l'utilisation des mesures colorimétriques pour évaluer l'intensité de la colonisation des algues sur un support solide. Dans cette expérience, un nombre croissant de cellules d'algues (de 6 à 100×10^7 cellules), a été déposé sur les blocs ($n = 3$) sur une surface d'ensemencement standard de 3,5 cm de diamètre ($9,6 \text{ cm}^2$). Au total, 5 modalités de concentrations cellulaires ont été choisies : 6×10^7 , 13×10^7 , 25×10^7 , 50×10^7 et 100×10^7 cellulesensemencées sur le bloc (selon les mesures de la DO 750 nm). Pour chaque biofilm (ou bloc), la mesure des paramètres colorimétriques a été effectuée dans un premier temps suivi du dosage des chlorophylles selon la méthode décrite ci-dessous.

La deuxième expérience consiste à suivre dans le temps l'évolution de la surface de colonisation ainsi que des paramètres colorimétriques (L^* et a^* , choisis pour leur pertinence d'après l'expérience précédente) en fonction de différents traitements aux UV-C. Une première série d'échantillons représente la modalité témoin (sans exposition aux UV-C, $n = 5$). Les paramètres mesurés sont suivis pendant une période de 29 jours. Ensuite, 2 modalités d'exposition aux UV-C ont été choisies : 4 h (150 kJ m^{-2}) et 8 h (300 kJ m^{-2}) ($n = 5$). Ces durées / doses d'exposition aux UV-C sont identiques à celles utilisées dans l'**Article 2** et les expositions aux UV-C ont été réalisées dans les mêmes conditions. Les échantillons traités avec 4 h d'UV-C ont été suivis sur une période de 29 jours et ceux traités avec 8 h d'UV-C sur une période de 21 jours. Chaque biofilm est approximativement composé de 8×10^6 cellules selon les mesures de DO 750 nm, correspondant à des biofilms fins. Les mesures de la surface d'occupation du biofilm ainsi que des paramètres colorimétriques sont effectuées à différents jours de mesure. La première mesure (jour 0) est effectuée avant le traitement aux UV-C (valeur référence). Les mesures suivantes sont effectuées après le traitement aux UV-C.

Dosage des pigments chlorophylliens

Afin de mettre en relation les mesures colorimétriques avec les teneurs en pigments chlorophylliens, l'extraction et le dosage des *Chla* et *Chlb* ont été réalisées. Après avoir mesuré la couleur des biofilms, les blocs sont découpés suivant le contour du biofilm, broyés et plongés dans une solution de méthanol à 100 %. Après une trentaine de minute dans le solvant d'extraction, les extraits sont mis en tube et centrifugés à 5000 rpm pendant 5 min. Le dosage des *Chla* et *Chlb* a été réalisé selon la méthode décrite précédemment.

II.1.2. Les champignons filamenteux

II.1.2.1. Nature et provenance des champignons filamenteux

Deux souches de champignon ont été utilisées pour la réalisation des expérimentations complémentaires : *Verticilium* sp. et *Ulocladium* sp. Le genre *Verticilium* sp. (Famille des Plectosphaerellacées, souche blanche non mélanisée) a été isolé des prélèvements réalisés dans la grotte de Lascaux par le LRMH. Le genre *Ulocladium* sp. (Hyphomycète de la famille des Dematiacées, souche noire mélanisée) a été isolé des prélèvements effectués sur des peintures murales du château d'Ancy le Franc dans le département de l'Yonne (89). L'identification des deux genres par observations microscopiques a été réalisée au sein du pôle microbiologie du LRMH.

II.1.2.2. Conditions de culture des champignons

Les deux souches de champignons ont été cultivées en boîte de Petri sur un support gélosé (Malt Extract Agar) enrichi en matière nutritive (infusion cœur-cerveille, Becton, Dickinson and Company) (**Figure II.1-10**). Un volume de 100 µl de suspension fongique (infusion cœur-cerveille + glycerol dans des tubes ependorf de 1,5 ml) est étalé à l'aide d'un écouvillon stérile sur le milieu gélosé en conditions stériles. Directement après l'ensemencement dans les boîtes de Petri, les échantillons sont incubés dans une étuve à 24 °C pour le développement des colonies filamenteuses.

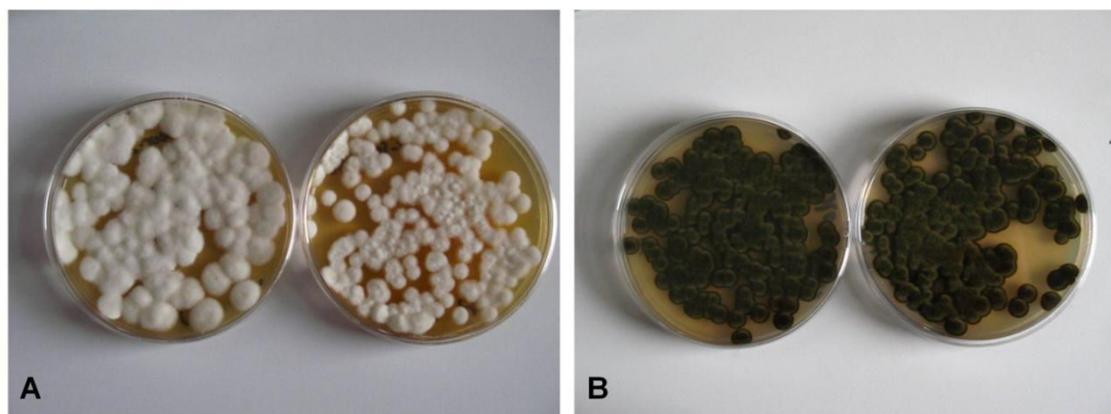


Figure II.1-10 : Culture des champignons sur milieu gélosé. A : *Verticilium* sp. B : *Ulocladium* sp.

II.1.2.3. Paramètres mesurés et méthodes d'analyses

II.1.2.3.1. *Dénombrement des Unités Formant Colonie (UFC)*

Cette technique est couramment utilisée en microbiologie pour dénombrer toutes sortes de micro-organismes (bactéries, champignons, levures...) présents dans un milieu liquide ou solide. Elle est basée sur le fait de considérer qu'une unité viable (spores, bactéries...) va former une colonie sur un milieu neuf. Le principe est de remettre en suspension la culture de champignon étudiée dans un volume connu (10 ml d'eau physiologique), et ensuite de procéder à une série de dilution (par entraînement) qui permet d'obtenir des concentrations décroissantes en spores (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ...). On prélève ensuite un volume défini (en général 0,1 ml) de chaque dilution, que l'on ensemence sur une surface gélosée neuve en boîte de Petri. On laisse incuber en étuve à 24°C le temps nécessaire de croissance pour chaque genre (4 à 5 jours pour *Verticilium* sp. et une dizaine de jours pour *Ulocladium* sp.), et on procède au comptage des colonies formées sur toutes les boîtes ensemencées. Pour que le comptage soit valable, il faut que le nombre de colonies soit compris entre 30 et 300. On retient ensuite le nombre de colonies compris dans cette gamme à la plus grande dilution, et on multiplie ensuite ce résultat par la dilution choisie. On obtient alors un nombre d'Unités Formants Colonies (UFC) par ml de solution mère. Le principe de la méthode est schématisé dans la **Figure II.1-11**.

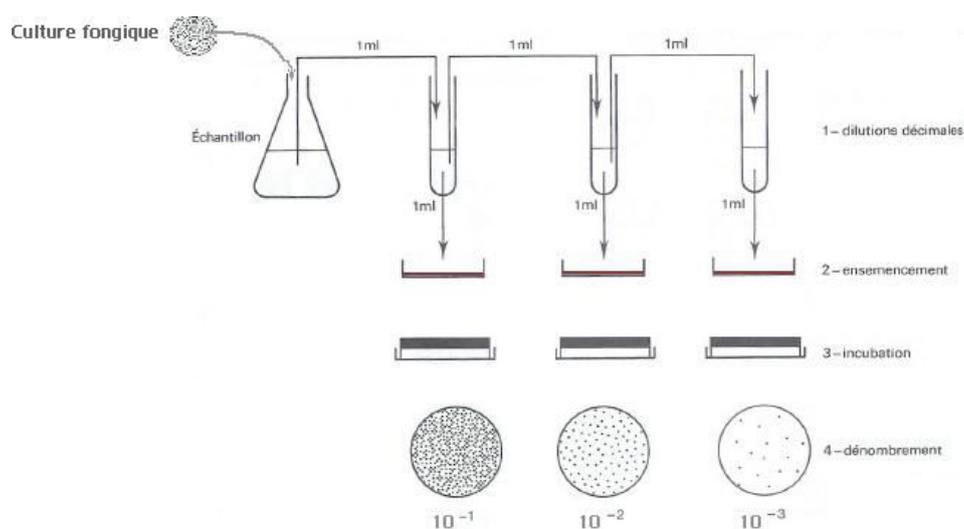


Figure II.1-11 : Principe schématisé du dénombrement des Unité Formant Colonies (UFC).

II.1.2.3.2. *Suivi de la prolifération*

Ces expériences n'ont été mises en place que sur le genre *Verticilium* sp. car le genre *Ulocladium* sp. présentait des difficultés de standardisation pour les cultures en boîtes de Petri (boîtes non uniformément recouvertes).

Après obtention d'une culture fongique uniforme dans la boîte de Petri, on effectue un prélèvement de « pastilles » à l'emporte pièce (8mm de diamètre, $n=3$), que l'on ensemence ensuite au centre d'un support gélosé neuf. Les échantillons sont photographiés à l'aide d'une loupe binoculaire reliée à un ordinateur (Stemi 2000-CS ZEISS) à raison d'une prise par jour pendant trois jours. L'outil « contour » du logiciel AxioVision Rel 4.6 est utilisé pour le calcul de la surface de colonisation en mm^2 .

II.1.3. Les matières picturales et pigments colorés

II.1.3.1. Nature et provenance

Les échantillons non biologiques utilisés au cours de cette thèse correspondent à plusieurs types de matières picturales ou pigments naturels (oxydes de fer rouge et jaune, ocre jaune, noir de manganèse et noir d'os) fournis par l'entreprise Ôkhra (Conservatoire des ocres et de la couleur, Roussillon, France).

Les oxydes de fer rouge et jaune proviennent de Madras (Inde) et sont constitués à 95 % d'oxyde de fer naturel. L'ocre jaune de Puisaye est un matériau ferrugineux extrait de la

Nièvre et de l'Yonne. Le noir de manganèse et le noir d'os proviennent de l'entreprise Kremer Pigmente (GmbH & Co. KG, Aichstetten, Allemagne).

II.1.3.2. Paramètres mesurés et méthodes d'analyse

II.1.3.2.1. *Analyse minéralogique par diffractométrie de rayons X*

Afin de détecter un éventuel effet des UV-C sur la structure minéralogique des différents types de matières picturales choisies, nous avons analysé les échantillons en utilisant une technique d'analyse fondée sur la diffraction des rayons X sur la matière : la diffractométrie de rayons X (DRX). Cette technique permet de déterminer la composition et la structure physico-chimique de matières cristallisées. Le résultat obtenu est un diagramme de diffraction dans lequel apparaît un ensemble de pics de diffraction dont l'emplacement et la hauteur permettent l'identification des minéraux et des éléments chimiques et dont la surface renseigne sur l'état de la cristallisation.

Chaque type de matière picturale est préalablement réduit en une fine poudre à l'aide d'un pilon et d'un mortier en agate. La poudre ainsi obtenue est ensuite disposée et aplanie sur une lame creuse placée sur le socle de la DRX avant analyse. L'appareil utilisé pour la mesure est un D8 Advance X-ray Diffractometer (BRUKER Analytical X-Ray Systems) commandé par ordinateur à l'aide du logiciel de mesure XRD Commandor. Chaque échantillon est mesuré deux fois : avant et après traitement aux UV-C. Le logiciel XRD Wizard a permis de comparer les deux diagrammes de diffraction en termes d'intensité, d'emplacement et de surface des pics. Les surfaces des pics avant et après traitement aux UV-C ont été comparées en calculant le coefficient de corrélation R^2 afin de mettre en évidence des différences entre les deux acquisitions.

II.1.3.2.2. *Mesures colorimétriques*

Le suivi de la couleur a été réalisé sur des échantillons d'oxydes de fer rouge et jaune appliqués sur des blocs de calcaire afin de créer une fine couche de peinture. Environ 0,3 g de pigments a été remis en suspension dans 5 ml d'eau distillée et appliqués au doigt de façon uniforme sur le bloc. L'appareil et les méthodes de mesure et de traitement des données sont les mêmes que ceux utilisés pour les biofilms d'algues. Pour chaque échantillon ($n = 3$), 9 points de mesure moyennés ont été utilisés (**Figure II.1-12**) et nous avons ensuite calculé la

moyenne des 3 réplicats.

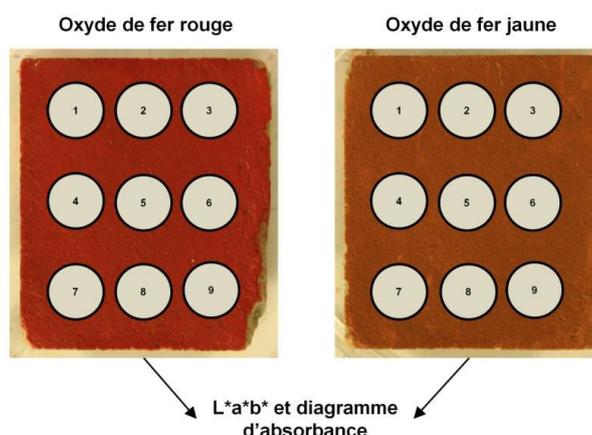


Figure II.1-12 : Méthode de mesure de la couleur sur les échantillons d'oxydes de fer.

Les coordonnées colorimétriques $L^*a^*b^*$ ainsi que le diagramme spectral ont été utilisés afin de détecter d'éventuels changements de la couleur après de longues durées de traitement aux UV-C. La première mesure a été réalisée avant le traitement aux UV-C (valeur référence, REF) et les suivantes après exposition aux UV-C.

II.1.4. Conditions expérimentales d'exposition aux UV-C

II.1.4.1. Matériels d'exposition

Les expositions aux UV-C ont été réalisées grâce à des systèmes d'irradiation fabriqués au sein du LCE. Ces systèmes d'irradiation seront nommés « UV-C box » dans les paragraphes suivants.

Les UV-C box (**Figure II.1-13**) sont constituées de 4 ballasts pouvant accueillir un néon UV-C de puissance variable. Trois types de néons UV-C ont été utilisés au cours de cette thèse : GTE SYLVANIA G30T8 G13 (80 W), PHILIPS G25T8 G13 (15 ou 25 W) et PURITEC HNS S G23 (11 W). Ces trois types de néons ont une longueur d'onde d'émission maximale à 253,7 nm et sont constitués de verre filtrant les longueurs d'ondes inférieures à 185 nm formant de l'ozone.

II.1.4.2. Réglages des paramètres d'exposition

L'ensemble des expositions aux UV-C utilisées dans la thèse ont été effectuées en

alternance, c'est-à-dire avec des périodes alternées d'allumage et d'extinction des néons (paramètre détaillé dans le **Tableau II.1-3**). Cette modalité d'exposition a été choisie afin de limiter l'impact thermique des néons UV-C. Les expositions ont également été réalisées dans une enceinte de culture réglée à 10°C et 95 % d'humidité afin d'éviter l'évaporation des suspensions d'algues lors de l'allumage des néons. La **Figure II.1-14** montre l'évolution de la température et du pourcentage d'humidité au cours d'une longue exposition aux UV-C (18 h). Les variations cycliques sont dues aux périodes d'allumage et d'extinction des néons. Sur l'ensemble du suivi la température moyenne est de $14,71 \pm 1,17$ °C et le taux d'humidité de $78,04 \pm 3,04$ %. Les quelques degrés d'écart par rapport aux conditions initiales ne constituent pas un stress thermique significatif sur les échantillons d'algues. Pour finir, toutes les expositions aux UV-C ont été programmées à l'aide d'un minuteur par mesure de sécurité.

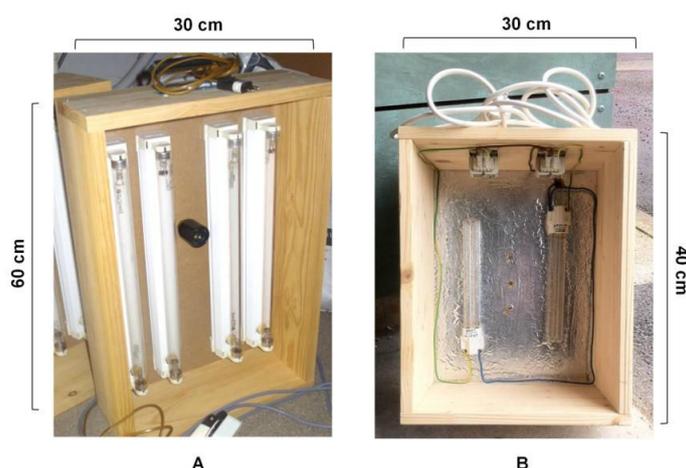


Figure II.1-13 : Matériel d'exposition aux UV-C. A : grande UV-C box (exposition au laboratoire et sur le terrain). B : petite UV-C box (exposition sur le terrain).

Tableau II.1-3 : Paramètres, durée d'exposition et dose d'UV-C reçue des différents traitements UV-C utilisés au cours de la thèse.

Echantillons	Paramètres d'exposition (puissance et alternance)	Durées d'exposition et doses d'UV-C reçues
Algues du sud-ouest (Chapitre 1)	80W En milieu liquide : exposition en continu Sur support solide : 90 min UV-C / 15 min	En milieu liquide / faibles et moyennes doses : 15, 20, 30, 60, 150, 180 et 300 min (7,2, 9,6, 14,4, 28,8, 72, 86,4 et 144 kJ m ⁻²) Sur support solide / moyennes et fortes doses : 3, 6 et 9 h (86,4, 172,8 et 259,2 kJ m ⁻²)
<i>Chlorella minutissima</i> (Chapitre 2)	75W En milieu liquide : 20 min UV-C / 10 min Sur support solide : 20 min UV-C / 10 min	En milieu liquide / très faibles et fortes doses : 10, 50 s, 1,5, 4, 8, 30 min, 1,5, 4 et 8 h (0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 20, 50, 150, 300 kJ m ⁻²) Sur support solide / fortes doses : 4 et 8 h (150 et 300 kJ m ⁻²)
Biofilms dans la grotte des Moidons (Chapitre 3)	Article 2 : 50W ; 30 min UV-C / 15 min Article 3 : 22W ; 30 min UV-C / 15 min	Article 2 / forte dose : 12 h (300 kJ m ⁻²) Article 3 / forte dose : 8 h (180 kJ m ⁻²)
Champignons et matières picturales (Chapitre 4)	Champignons : 60W ; 1 h UV-C / 30 min Matières picturales : 100W ; exposition en continu	Champignons / moyennes et fortes doses : 3 h 30 min, 7 h et 15 h (105, 210 et 450 kJ m ⁻²) Matières picturales / fortes et très fortes doses : 8 h, 13 h et 184 h (400, 655,2 et 9200 kJ m ⁻²)

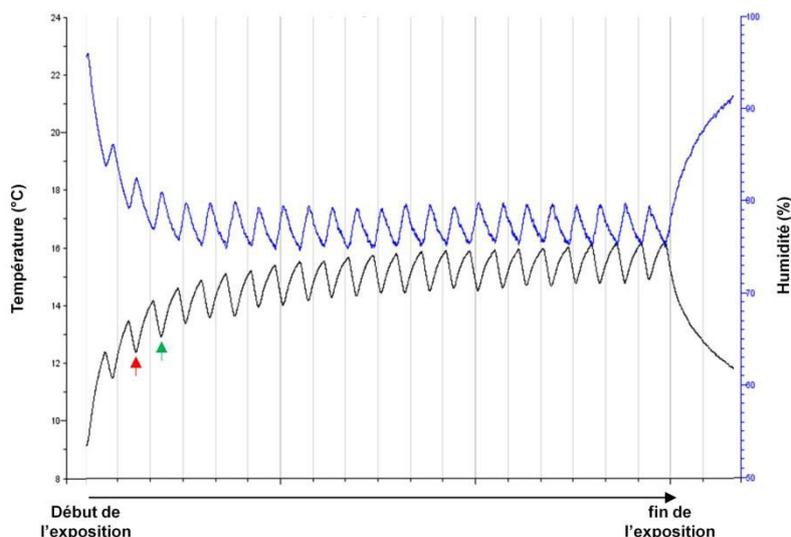


Figure II.1-14 : Suivi de la température et du pourcentage d'humidité lors des expositions aux UV-C en enceinte de culture. Flèche rouge : allumage. Flèche verte : extinction des néons UV-C.

II.1.4.3. Mesure des UV-C

Les mesures des doses d'UV-C reçues ont été réalisées à l'aide d'un photo-radiomètre enregistreur (Delta OHM HD 2102.2) équipé d'une sonde de mesure pour UV-C (LP 471 UVC Probe). Les valeurs sont données en $J\ m^{-2}$ et transformées ensuite en $kJ\ m^{-2}$. L'appareil a été fourni par le LRMH.

II.1.4.4. Traitements appliqués

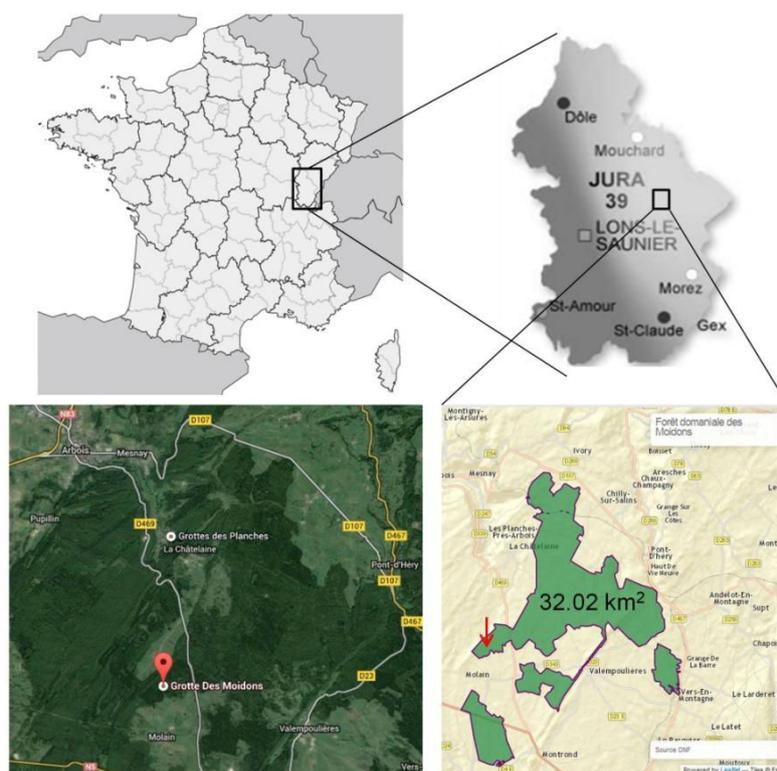
Au cours de cette thèse différents traitements aux UV-C ont été appliqués. Le **Tableau II.1-3** met en évidence l'ensemble des traitements utilisés au cours de la thèse en fonction des différents échantillons étudiés. Les doses d'UV-C (exprimées en $kJ\ m^{-2}$) sont classées de très faibles (quelques secondes d'exposition) à très fortes (plusieurs centaines d'heures d'exposition pour les matières picturales). En fonction des paramètres d'exposition utilisés tels que la puissance des néons UV-C, la distance entre les néons et l'échantillon et la durée du traitement, la dose d'UV-C reçue est variable. La dose d'UV-C en $kJ\ m^{-2}$ est donc utilisée dans cette thèse comme unité standard permettant de comparer les résultats entre eux ainsi qu'avec ceux présents dans la littérature.

II.2. Expérimentations menées sur le terrain

II.2.1. Présentation du site d'étude : la grotte des Moidons

II.2.1.1. Situation géographique et statut juridique

La grotte des Moidons est située dans le département du Jura (39) sur la commune de Molain. Elle se trouve dans la forêt domaniale des Moidons sur le plateau de Lons-le-Saunier à environ 10 km de la ville d'Arbois. La localisation détaillée ainsi que les coordonnées géographiques du site sont présentées dans la **Figure II.2-1**.



Coordonnées géographiques de l'entrée :
 $05^{\circ} 48' 21,5''$ E et $46^{\circ} 50' 20,7''$ N

Figure II.2-1 : Situation géographique du site d'étude de la grotte des Moidons

La grotte des Moidons est un site privé (SARL) géré par Isabelle et François Gauthier-Rohr. Elle est incluse dans une zone ZNIEFF (Zones Naturelles d'Intérêt Ecologique Faunistique et Floristique) de type II (ZNIEFF 430020536 - FORET DES MOIDONS, [site](#)

internet 4) de par la présence de 5 espèces de Chauve-souris de la [Directive européenne Habitats-Faune-Flore de 1992](#) (Grand et Petit rhinolophe, Vespertilion à oreilles échancrées, Grand murin et Oreillard commun).

II.2.1.2. Description du site et caractéristiques générales

Formation, découverte et dimensions

La grotte des Moidons a été formée dans une couche de calcaires du Jurassique (étages Bajocien et Bathonien) il y a plusieurs milliers d'années lors du retrait des glaciers. Elle a été découverte en 1966 par deux spéléologues, Pierre Murat et Fred Meyer. Avant 2013, l'entrée dans la grotte se faisait par un puits étroit d'environ 15 m de profondeur situé au niveau des escaliers de la salle principale (**Figure II.2-2**). Depuis le mois d'avril de l'année 2013, l'entrée s'effectue désormais par un tunnel d'une longueur de 70 m arrivant sur le côté est de la grotte. Avec une profondeur maximale de 30 m et une longueur de 250 m, la grotte est divisée en trois sections : la salle principale située au centre (partie la plus vaste) et 2 galeries (la galerie Nord et la galerie Sud) (**Figure II.2-2**).

Salle principale

Elle contient un grand nombre de formations carbonatées comme des stalagmites, stalactites, coulées stalagmitiques, piliers, dômes, draperies et concrétions coralloïdales. Le sol de cette partie de la grotte est constitué de dépôts fluvioglaciaires recouverts par une couche de calcite et de stalagmites. De nombreux matériaux issus de l'effondrement du plafond sont situés au centre de cette salle, au niveau de la dépression.

Galerie Sud

Cette partie de la cavité correspond à un conduit phréatique avec la présence de dépôts fluviatiles de galets et de graviers ainsi que de plusieurs « gours » (concrétions carbonatées remplies d'eau). Les murs ainsi que le plafond sont recouverts d'une couche de calcite. On note également une grande variété de concrétions carbonatées en tout genre et notamment des concrétions calcaires coralloïdes (formes nodulaires nommées « pop-corn »).

Grotte des Moidons

Commune de Molain,
Département du Jura (39)

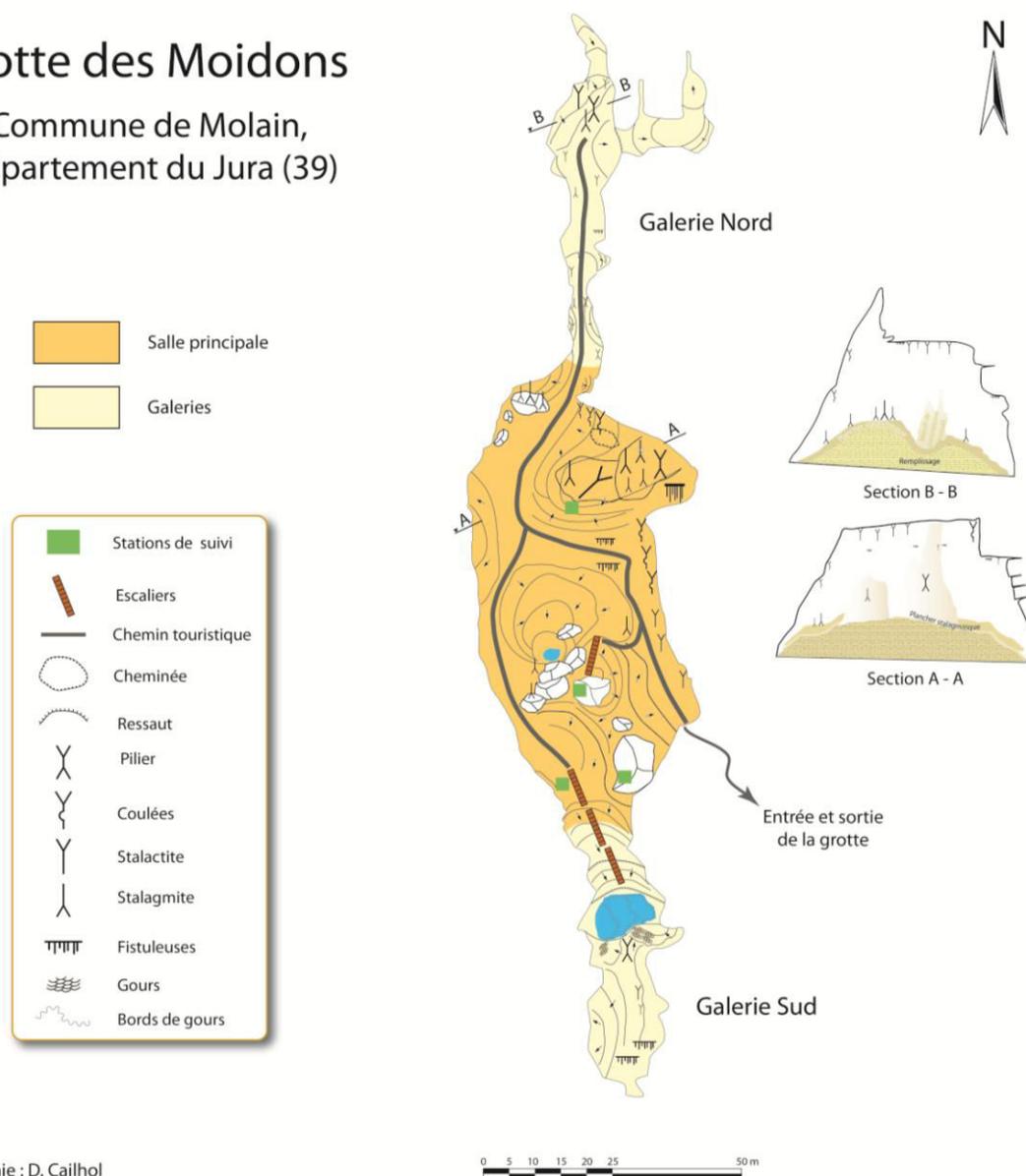


Figure II.2-2 : Cartographie et topographie de la grotte des Moidons.

Galerie Nord

La galerie Nord commence au niveau d'une faille de direction nord-sud et semblerait être par endroit remplie par des sédiments glaciaires. Elle est également riche en concrétions carbonatées avec la présence de draperies, stalagmites, stalactites et colonnes.

Circulation horizontale et verticale des eaux

La grotte des Moidons est considérée comme un système dynamique en termes de

circulation des eaux. Elle est située dans le bassin versant de la rivière la Cuisance qui émerge au niveau de la grotte des Planches située dans le cirque du Fer à Cheval proche d'Arbois. En ce qui concerne la circulation verticale des eaux, la grotte est caractérisée par différents taux d'infiltration. La présence de diaclases (microfissures dans le plafond calcaire) au-dessus de la salle principale et de la galerie Sud, provoque des infiltrations abondantes les jours de pluie. Ce phénomène est accentué par une pente de direction nord-sud d'environ 1,5 à 2 %. Les « gours » de la galerie Sud sont alimentés par ces infiltrations et les eaux circulent ensuite avec une direction sud-nord pour s'infiltrer majoritairement dans la dépression située au centre de la grotte et alimenter la Cuisance. Les infiltrations verticales dans la galerie Nord sont limitées étant donné un plafond calcaire beaucoup plus imperméable. De ce fait, la galerie Nord est considérée comme une zone isolée du reste de la grotte en termes de circulation des eaux.

La **Figure II.2-3** présente quelques photos de l'extérieur et de l'intérieur de la grotte.



Figure II.2-3 : Photographies du site d'étude de la grotte des Moidons

II.2.2. Paramètres mesurés et méthodes d'analyses

II.2.2.1. Cartographie et topographie de la grotte

La cartographie et topographie de la grotte des Moidons a été réalisée par Didier Cailhol, membre associé du laboratoire EDYTEM (Environnements, DYnamiques et Territoires de la Montagne) de l'Université de Savoie (Chambéry – Annecy). Le détail des appareils utilisés est donné dans l'**Article 3 (paragraphe III.3.1.2.2)**.

II.2.2.2. Mesures des paramètres abiotiques à l'échelle de la cavité

II.2.2.2.1. *Température et humidité*

La température et le pourcentage d'humidité de la cavité ont été suivis du 14 août au 16 septembre 2012 (1 mois) à l'aide d'enregistreurs automatisés de type HOBO (HOBO Data Loggers, U12-012 Onset Computer Corporation). Trois appareils ont été utilisés, chacun d'eux placé dans chaque partie de la grotte (salle principale, Galeries Nord et Sud) et enregistrant une mesure toutes les 4 minutes.

II.2.2.2.2. *Teneurs en CO₂*

Les teneurs en CO₂ atmosphérique de la grotte des Moidons ont été mesurées par Sylvain Collin du Comité Départemental de Spéléologie du Jura entre juillet 2009 et juillet 2012 (19 prises de mesures dans chaque partie de la grotte). L'acquisition des données a été effectuée avec un détecteur multi-gaz (MX6 Portable Multi Gas Detector, Industrial Scientific Corporation, USA).

II.2.2.2.3. *Dosages des éléments minéraux*

Cinq prélèvements d'eau et de sol ont été réalisés à différents endroits de la grotte afin de mesurer les concentrations en éléments minéraux. Trois échantillons ont été prélevés pour chaque zone. L'emplacement des zones d'échantillonnage est présenté dans la **Figure II.2-4**.

Pour l'analyse des sols, 0,5 g a été minéralisé dans une solution d'acide nitrique et d'acide chlorhydrique (2 ml HNO₃ + 5 ml HCL, gamme Optima, Thermo Fisher Scientific). Les échantillons sont ensuite incubés dans un système de minéralisation (DigiPrep) pendant 4 heures et 30 minutes. Le volume est ramené à 50 ml avec de l'eau ultra-pure puis filtré à 1 µm. Pour l'analyse des eaux, les échantillons sont seulement filtrés à 1 µm. Tous les

échantillons sont ensuite analysés en ICP optique (ICP OES, radial method, iCAP 6000 series, Thermo Scientific) et comparés à un matériel de référence certifié (ERM[®] CA011A, LGC Promochem). Les données sont exprimées en mmol l⁻¹ pour les eaux et µg g⁻¹ pour les sols.

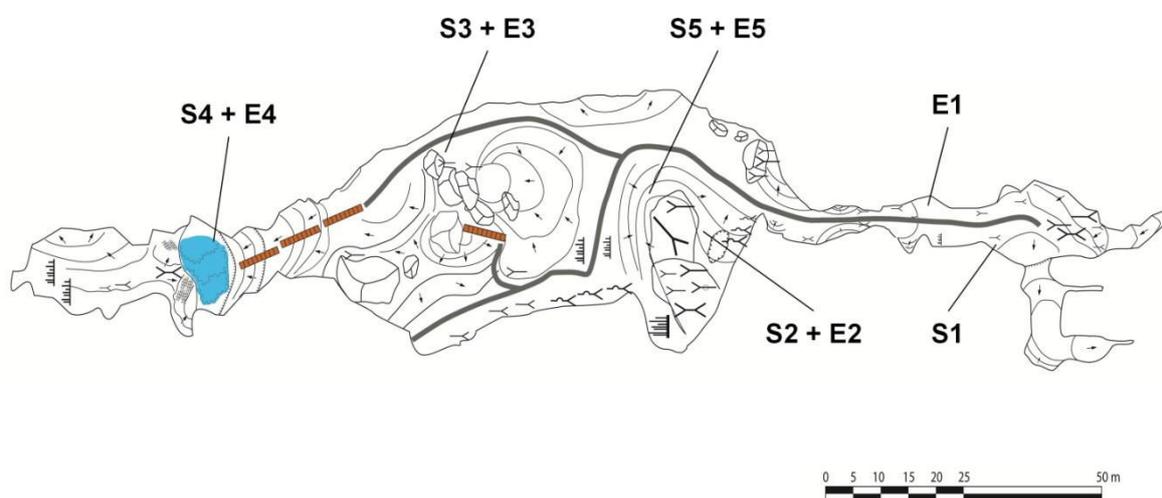


Figure II.2-4 : Localisation des prélèvements d'eau et de sol pour l'analyse des éléments minéraux. S : prélèvement de sol ; E : prélèvement d'eau.

II.2.2.2.4. Mesures de la vitesse des courants d'air

Les mesures de la vitesse des courants d'air dans la grotte ont été réalisées par Didier Cailhol à l'aide d'un anémomètre (TESTO 405). Deux mesures à la fin des galeries Sud et Nord et une mesure au centre de la salle principale ont été effectuées.

II.2.2.3. Mesures à l'échelle du biofilm

Les mesures effectuées à l'échelle du biofilm sont présentées dans l'**Article 3**. Elles concernent la quantité de lumière reçue (PAR, *Photosynthetically Active Radiation*), la distance à la source lumineuse, les caractéristiques générales du support basées sur la rugosité et la présence de dépôts sédimentaires ainsi que la surface de colonisation du biofilm mesurée grâce à une méthode d'analyse d'image. Certains biofilms ont été sélectionnés pour effectuer des mesures colorimétriques. Le principe général des mesures colorimétriques est expliqué dans le **paragraphe II.1.1.3.2** et le protocole détaillé concernant les mesures effectuées à l'échelle du biofilm est décrit dans l'**Article 3**.

II.2.2.4. Analyses des communautés microbiennes par cytométrie en flux et microscopie électronique

II.2.2.4.1. *Prélèvements sur biofilms*

Au total, 18 biofilms ont été échantillonnés afin de réaliser les analyses en cytométrie en flux et microscopie électronique. Les prélèvements ont été effectués à l'aide d'un écouvillon stérile (surface de prélèvement = 4 cm²) puis ensuite plongés dans des tubes ependorf de 1,5 ml contenant une solution de fixation à 2 % de paraformaldehyde (1 ml). Les échantillons sont ensuite congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80 °C. L'emplacement des prélèvements est présenté dans la **Figure II.2-5**. Les échantillons ont ensuite été envoyés à Marseille au PRECYM (Plate-forme REgionale de CYtométrie pour la Microbiologie, Marseille).

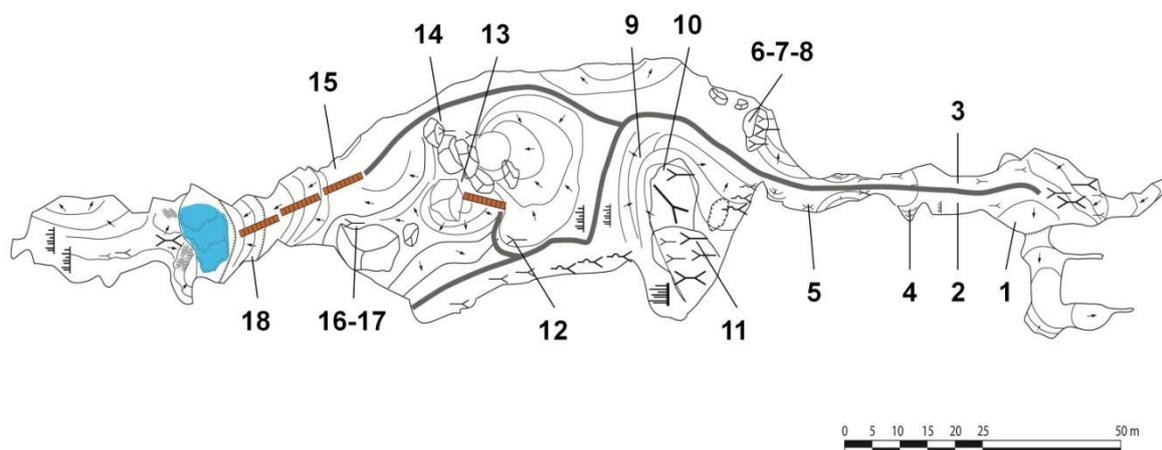


Figure II.2-5 : Localisation des prélèvements effectués sur des biofilms verts pour les analyses des communautés microbiennes par cytométrie en flux.

II.2.2.4.2. *Analyses en cytométrie et microscopie électronique à balayage*

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un cytomètre trieur de type BD InfluxTM Mariner (BD Biosciences) pour la détection des communautés d'ultra-phytoplancton (cellules unicellulaires photosynthétiques < à 10 µm) et des bactéries. Les cellules d'ultra-phytoplancton ont été excitées avec un laser à 488 nm et 4 signaux optiques ont été caractérisés : diffusion vers l'avant (FSC) liée à la taille des cellules, diffusion latérale (SSC) liée à la structure et à la forme des cellules, la fluorescence orange (FLO, 565 < λ < 595 nm)

liée à la phycoérythrine pour la détection des cyanobactéries et la fluorescence rouge (FLR, $\lambda > 630$ nm) liée à la chlorophylle *a*. Pour l'analyse des bactéries, les acides nucléiques ont été préalablement marqués avec une sonde fluorescente de type SYBR Green I ou II (Molecular Probes, Eugene, Oreg.) et la fluorescence verte a été caractérisée (FLG, $510 < \lambda < 550$). Les données et représentations graphiques ont été analysées et effectuées grâce au logiciel Summit™ (Dakocytomation).

Les observations au MEB ont été effectuées par HRSEM (microscopie électronique à balayage de haute résolution) (JSM-6320F, JEOL Company).

II.2.3. Conditions expérimentales d'exposition aux UV-C

Les expositions aux UV-C dans la grotte des Moidons ont été menées sur 4 biofilms : deux situés dans la salle principale et deux dans la Galerie Sud. La localisation ainsi que les photographies des biofilms sont présentées dans la **Figure III.2-9** de l'**Article 2** et la **Figure III.3-1** de l'**Article 3**. Les petites UV-C box ont été utilisées dans ce cas (**Figure II.1-13**).

Les biofilms LwB, LrB et StmB ont été traités avec une dose d'UV-C de 180 kJ m^{-2} (correspondant à environ 8 h d'allumage des lampes effectué en alternance : 30 min UV-C / 15 min) (exemple du système d'irradiation présenté dans la **Figure II.2-6**). Le biofilm de la salle principal et dont les résultats sont présentés dans l'**Article 2** a été traité avec une dose de 300 kJ m^{-2} (correspondant à une durée de traitement de 12 h).

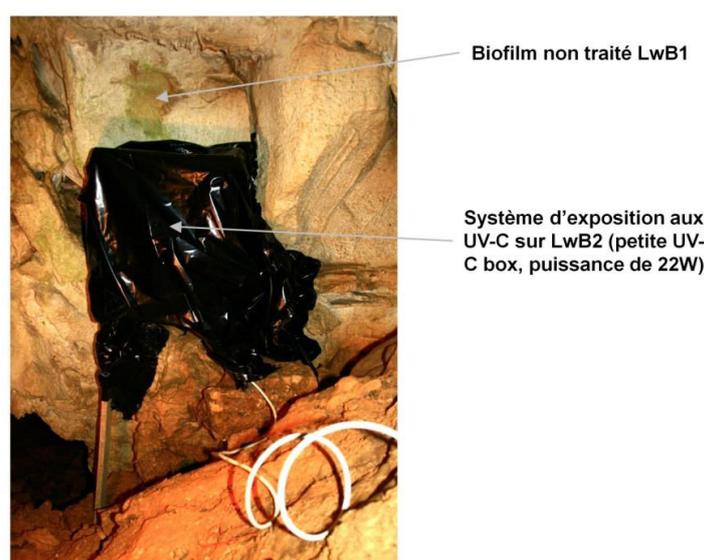


Figure II.2-6 : Système d'exposition aux UV-C sur la zone LwB (biofilm proliférant sur une paroi calcaire dans la Galerie Sud).

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Chapitre 1 : Etudes et analyses au laboratoire de l'effet du rayonnement UV-C sur plusieurs souches de micro-algues vertes

Ce chapitre présente les premiers résultats acquis au cours de la thèse et est divisé en deux parties. La première (**paragraphe III.1.1**) est rédigée sous la forme d'un article scientifique et la deuxième (**paragraphe III.1.2**) correspond à des résultats complémentaires obtenus dans les mêmes conditions expérimentales. Les échantillons biologiques utilisés dans ce travail correspondent à un mélange de diverses espèces d'algues prélevées dans différents sites touristiques du sud-ouest de la France (département de la Dordogne).

III.1.1. Effets des UV-C sur les paramètres physiologiques et macroscopiques des algues cultivées en milieu liquide et sur support solide (Article 1)

Cet article a été publié dans le journal *International Biodeterioration and Biodegradation* en Mars 2011. Les résultats présentés correspondent aux premières expériences et analyses menées en conditions contrôlées au laboratoire sur un mélange d'algues vertes prélevées dans trois sites touristiques du sud-ouest de la France (grottes de Jovelle et de Domme, abri sous-roche de Laugerie-Haute). Ce travail a pour objectif de mettre en avant et de comprendre les effets du rayonnement UV-C sur les algues que ce soit à l'échelle cellulaire sur des suspensions d'algues (mesure de la viabilité et de l'activité photosynthétique) ou à l'échelle du biofilm en mesurant certains paramètres macroscopiques comme le pourcentage de recouvrement et la surface d'occupation des algues cultivées sur un support solide (blocs de calcaire).

Le titre de l'article est « **UV-C irradiation as tool to eradicate algae in caves** » et les auteurs sont Fabien BORDERIE, Laurence ALAOUI-SEHMER, Naoufal RAOUF, Faisal BOUSTA, Geneviève ORIAL, Dominique RIEFFEL et Badr ALAOUI-SOSSE.

International Biodeterioration & Biodegradation 65 (2011) 579–584



Contents lists available at ScienceDirect

International Biodeterioration & Biodegradation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiod



UV–C irradiation as a tool to eradicate algae in caves

Fabien Borderie^a, Alaoui-Sehmer Laurence^a, Raouf Naoufal^a, Bousta Faisal^b, Orial Geneviève^b, Rieffel Dominique^a, Alaoui-Sosse Badr^{a,*}

^a Laboratoire Chrono-Environnement, UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA Université de Franche-Comté, 2 Place Leclerc, F-25030 Besançon Cedex, France

^b LRMH, 29 rue de Paris F-77420, Champs sur Marne, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 December 2010
Received in revised form
14 February 2011
Accepted 15 February 2011
Available online 21 March 2011

Keywords:
Algae
Eradication
UVC
Photosynthetic activity
Pigmentation
Survival rate
Macroscopic parameters

ABSTRACT

Algal proliferation has commonly been reported to occur on monuments, such as crypts, churches, and caves, as soon as artificial lighting is used. In this work we study the effects of UV–C irradiation on algae collected in different caves in Dordogne (southwest of France). First, the effect of UV–C irradiation was tested on algal cell suspensions during increasing exposure times. After treatment, the photosynthetic capacity was assayed using a polarimetric method, and algal cell viability was then estimated using a Trypan blue test after a rest period of 15 h. UV–C irradiation was then studied on algal cells cultivated on a solid support consisting of pieces of calcareous stone. Drops of concentrated algal cells were inoculated on stone and exposed to UV–C radiation for 3, 6, or 9 h. After this irradiation, half of the samples were submitted to a high white light intensity ($1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation, PAR) for 6 h while the other half were incubated in the culture room. Subsequently, algal macroscopic parameters such as covering rate and colonized area were measured by macro photography. Both experiments led to the conclusion that UV–C irradiation has deleterious effects on photosynthetic parameters and growth of algal cells.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abstract

Algal proliferation has commonly been reported to occur on monuments, like crypts, churches and caves as soon as artificial lighting is used. In this work we study the effects of UV-C irradiation on algae collected in different caves from Dordogne (South west of France). First, the effect of UV-C irradiation was tested on algal cell suspensions during increasing exposure times. After treatment, the photosynthetic capacity was assayed using a polarometric method and algal cell viability was then estimated using Trypan blue test after a rest period of 15 hours. UV-C irradiation was then studied on algal cells cultivated on a solid support consisting on pieces of calcareous stone. Drops of concentrated algal cells were inoculated on stone and exposed to UV-C radiation for 3, 6 or 9 hours. Consecutively to this irradiation, one half of the samples were submitted to a high white light intensity ($1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of Photosynthetically Active Radiation, PAR) during 6 hours while the other half was incubated in the culture room. Subsequently, algal macroscopic parameters such as covering rate and colonized area were measured by macro photography. Both experiments permitted to conclude that UV-C irradiation generates deleterious effects on photosynthetic parameters and growth of algal cells.

Keywords: Algae, eradication, UVC, photosynthetic activity, pigmentation, survival rate and macroscopic parameters.

III.1.1.1. Introduction

Caves, crypts or shelters under rock, constitute particular ecosystems regarding their biotic and abiotic factors. They are characterized by the fragile dynamic balance linked to environmental factors like temperature, moisture, carbonic gas content, charged salt water circulation, animal and plant populations (Brunet *et al.*, 2000). Such places and especially prehistoric caves of the south west of France (Lascaux, Domme, Jovelle, Laugerie-Haute, Montignac...) with mural paintings are often considered as worldwide humanity heritages and receive thousands of visitors per year. Painting illumination associated with the great number of visitors, led to the apparition of serious biological disturbances. A development of algae on walls of the Lascaux cave was reported for the first time in 1960 (Lefèvre, 1974), and was called “the green sickness” or “Lampenflora”.

Many chemical treatments have been used to remove algae or to control their extension.

Major disadvantages of these compounds are their persistence through years and the whole ecosystem contamination through lixiviation, a widespread phenomenon in humid places. Therefore, among new methods explored to limit those negative impacts on environment, the use of UV irradiation appears to be a suitable method for killing or at least limiting algae proliferation. Ultraviolet radiations are part of the light solar spectrum with intermediate wavelengths between visible light and X-rays. The UV-C part of these radiations, (250-280nm), is entirely filtered by the ozone layer of the earth atmosphere. The UV-B (280-315 nm) are partially filtered while the UV-A (315-400 nm) entirely reach terrestrial surface. Over the past decades, the effect of ultraviolet on photosynthetic organisms due to the depletion of ozone layer has been extensively studied. [Hermann *et al.* \(1994\)](#) and [Prasad *et al.* \(2004\)](#) have analysed the effect of UV radiation on two species of marine phytoplankton (*Dunalliella salina* and *Ochromonas danica*) and on one species of Cyanobacteria (*Plectonema boryanum*). They have shown that ultraviolet radiations (mainly UV-B) cause serious damages on the photosynthetic apparatus, especially a degradation of the protein D1 a main component of photosystem II. The DNA is also affected (DNA laddering) as reported by [Holzinger *et al.* \(2005\)](#).

This study aim to investigate the effect of UV-C irradiation on survival, proliferation and photosynthetic rates of cave-harvested algae according to the time of exposure.

III.1.1.2. Material and methods

III.1.1.2.1. ***Biological material and sampling procedure***

The organisms studied are a mixture of unicellular green algae strains harvested in three caves (Domme, Laugerie-Haute and Jovelle) of the Dordogne department (South West of France). This mixture is principally composed of *Klebsormidium flaccidum* (Klebsormidiales, Charophyceae), a filamentous green algae which colonize terrestrial and freshwater habitats and other unicellular green algae belonging to the classes of Chlorophyceae and Diniphycea. The precise identification of those species has not yet been achieved. The algal samples were collected with sterile scalpel and preserved until use.

III.1.1.2.2. ***Algal culture and UV-C exposure***

The growth of the algal cells was performed in a complete culture medium adapted to

algal development (cyanobacteria BG11 freshwater solution, C3061, SIGMA) to avoid any contamination by other organisms. The erlenmeyers (**Figure III.1-1**) were permanently horizontally agitated at 70 rpm for a proper oxygenation of the medium and exposed to a photoperiod of 13 h at $130 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 11 h in the dark with a thermoperiod of 24 °C and 18 °C respectively.

In order to mimic the natural conditions in caves, the algae were inoculated on limestone blocks (**Figure III.1-1**) of 6 cm in length, 4 cm in width and 6 mm in thickness provided by the LRMH (*Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques, Champs-sur-Marne, France*). A standardized protocol of algae inoculation has been elaborated to homogenize the number of algal cells deposited on the blocks. The maximum of culture medium containing the algae was removed by centrifugation at 500 g for 5 minutes. The algal cell concentration of the pellet was determined using a spectrophotometric method ([Barberousse et al., 2006](#)). The OD measured at 750 nm wavelength can be related to a concentration of algal cells per μl , using a linear regression equation previously established with the same algae strain. Usually, the pellet concentration was around of $5 \times 10^6 \text{ cells } \mu\text{l}^{-1}$. Aliquots of 150 μl , 350 μl or 1000 μl were deposited in the limits of a 1 cm diameter circle drawn on the block. The deposited volume corresponds respectively to 0.75×10^9 , 1.10^9 and 5×10^9 algal cells. Thickness of the algal stain increases with the volume of algal suspension deposited on the block and is ranges between at least 0.5 mm for the thin layer (150 μl) and 2.5 mm for the thick layer (1000 μl). The blocks were then transferred to the culture room until UV-C exposure.

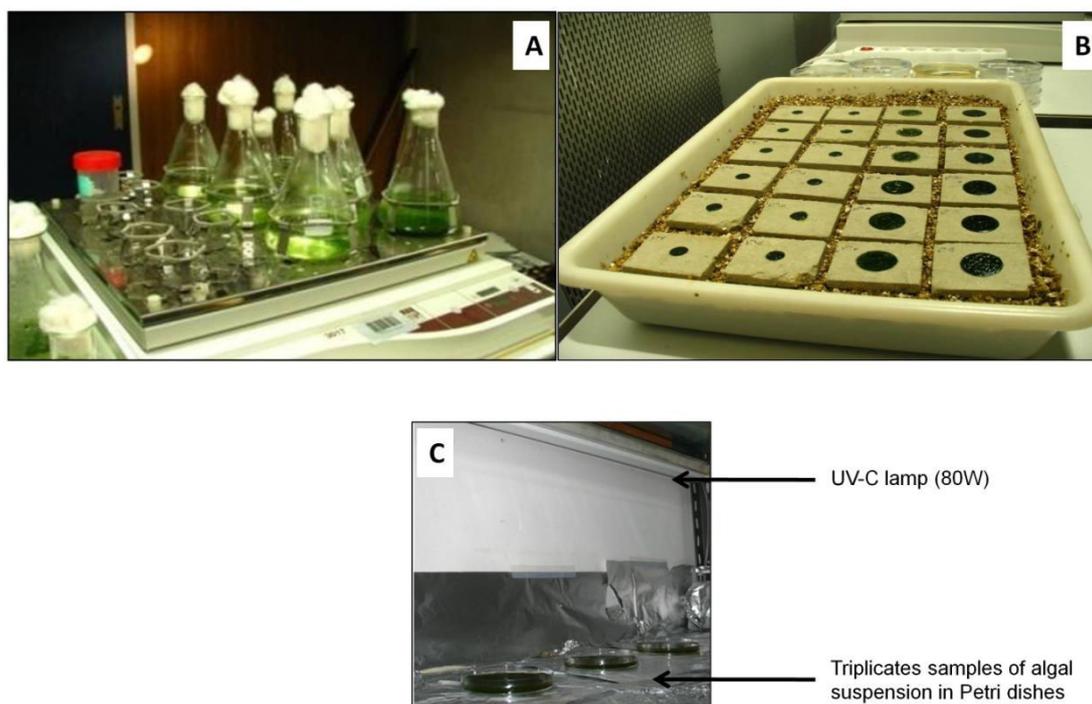


Figure III.1-1: Technical cultures of algae and exposure chamber. A: algal in freshwater BG11 in Erlenmeyer on agitator, B: algal inoculation on limestone blocks disposed on humid vermiculite for keep constant humidity rate, C: exposure chamber and irradiated samples of algae.

For all UV-C treatments, samples were placed in a 0.2 m^3 -closed chamber (**Figure III.1-1**) at 30 cm from the UV-C lamp (GTE SYLVANIA G30T8, 80w).

For algal cells cultivated in liquid medium, 3 ml of algal suspension were disposed in petri dishes (4 cm in diameter) without lid and were exposed to UV-C at 20, 30, 60 and 180 min. Triplicates were used for measurements. Analyses were carried out directly after UV exposure and after a rest period of 15 h in culture room.

For algal cells cultivated on solid support, the different light treatments are summarized in **Table III.1-1**. Exposure to UV-C was performed intermittently: 90 min UV-C followed by a rest period of 15 min in the dark. The increase of algal volume was correlated with an increase of exposure time. For treatment IV (see **Table III.1-1**), 6 h of high light (HL, $1380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) provided by CL 1500 ECO SCHOTT (150 W) were added to test a photoinhibition effect (Gevaert *et al.*, 2002).

Table III.1-1 : Exposure time according to algal volumes.

Treatments	Algal volumes (μL)	Exposure times
T I	150 (thin layer)	3h UV-C
T II	350 (middle layer)	6h UV-C
T III	1000 (thick layer)	9h UV-C
T IV	1000 (thick layer)	9h UV-C + 6h HL ^a

^a HL: High Light

III.1.1.2.3. *Biological and physiological parameters*

Algal cell viability after UV-C exposure was assayed by the Trypan blue method after a rest period of 15 hours. An aliquot (100 μl) of the algal suspension previously exposed to UV-C was mixed with 250 μl of Trypan blue solution (2,7-naphtalenedisulfonic acid,3,3'-((3,3'-dimethyl(1,1'-biphenyl)4,4'-diyl-) bis (azo), bis (5-amino 4-hydroxy-) tetrasodium) and 650 μl of BG11 and introduce in a Malassez cell. Living algal cells appeared uncoloured while dead cells showed a typical blue coloration due to their inability to exclude the Trypan blue. Dead and live cell counting was then performed under a microscope with a manual counter. The survival rate was calculated in comparison to control.

The effect of UV-C irradiation on the photosynthetic capacity was assessed by a polarometric method (Oxygraph System, Hansatech). After standardization of algal cell concentration (10^5 cells ml^{-1}), an aliquot of algae suspension previously submitted or not to UV-C irradiance was introduced in the oxygraph. The total volume was adjusted to 2 ml with culture medium and the system was allowed to stabilize a few minutes in the dark. The oxygen evolution recorded during that period showed oxygen consumption due to algal cells respiration in the dark. The light provided by CL 1500 ECO SCHOTT (150 W) was then switched on at a weak intensity ($340 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and oxygen concentration was increased when photosynthesis started. When light intensity was increased to $1380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (high light, HL), the produced oxygen rate decreased and this was attributed to a photoinhibition effect.

Concerning the algae cultivated on solid support, the measured parameters were the colonized area and the covering rate, like being macroscopic parameters. Samples were photographed with a macrophotography setup using a microscope connected to a camera and a computer (Stemi 2000-CS ZEISS). Colonized area (mm^2) was automatically measured with

the AxioVision Rel 4.6 software before and after exposure. Covering rate (%) was calculated with ImageJ software before and after exposure. For all treatments, both parameters were measured one week after UV-C exposure.

III.1.1.3. Results

III.1.1.3.1. *Survival rate after UV-C exposure*

An UV-C exposure of algal cells cultivated on liquid medium strongly affects their survival ability (expressed as a percentage of living cells compared to control) as showed in **Figure III.1-2**. After 60 min of UV-C exposure followed by a rest period of 15 h, the cell viability was reduced to 60 % compared with the control and after 180 min of exposure only a few surviving cells could be observed (95 % decrease compared with the control). Therefore, the survival rate seriously decreased with exposure time.

Results were although obvious by simple visual observation of samples exposed to UV-C radiation, as shown in **Figure III.1-3 A**. After 180 min of exposition, the green colour due to chlorophyll was disappeared, attesting bleaching of the photosynthetic pigments and disorganization of the photosynthetic apparatus. Moreover, after re-inoculation of a sample exposed to UV-C in a fresh medium, no algal proliferation could be observed (**Figure III.1-3 B**), confirming the effect of the UV-C treatment on cell viability.

III.1.1.3.2. *Effect on gaseous exchanges*

Figure III.1-2 showed that photosynthetic activity was strongly affected by UV-C, even with short exposure time. The inhibition of photosynthesis was detected immediately after the UV-C exposure and was reinforced after a consecutive rest period of 15 h (data not shown). After 60 min and 180 min of UV-C irradiation, photosynthetic activity was abolished and O₂ consumption was even measured. This consumption of O₂ could indicate a strong photorespiration and/or respiration activity. High light intensity (1380 μmol photons m⁻² s⁻¹) induced a stronger O₂ consumption than a weaker light intensity (350 μmol photons m⁻² s⁻¹) which was relevant with the hypothesis of photorespiration increase (data not shown).

III.1.1.3.3. *Effect on macroscopic parameters*

Two parameters were determined when algae were grown on blocks: the covering rate

expressed in percent and the colonized area expressed in mm².

At the beginning of the experiment, after deposition of algal cells on the blocks, a green spot characterized by a multiple cell layers was formed. The thickness of the spot was positively correlated with the green tint intensity (data not shown). When the cells were grown at optimal conditions in growth chamber, green tint intensified. Treatment with UV-C resulted in a loss of green colour until bleaching reflecting chlorophyll degradation. The covering rate is an interpretation of the measured variation of colour intensity - or bleaching. The colonized area is the real surface covered by the algae at the end of the experiment. It characterized the expansion of the algae on the blocks during growth period.

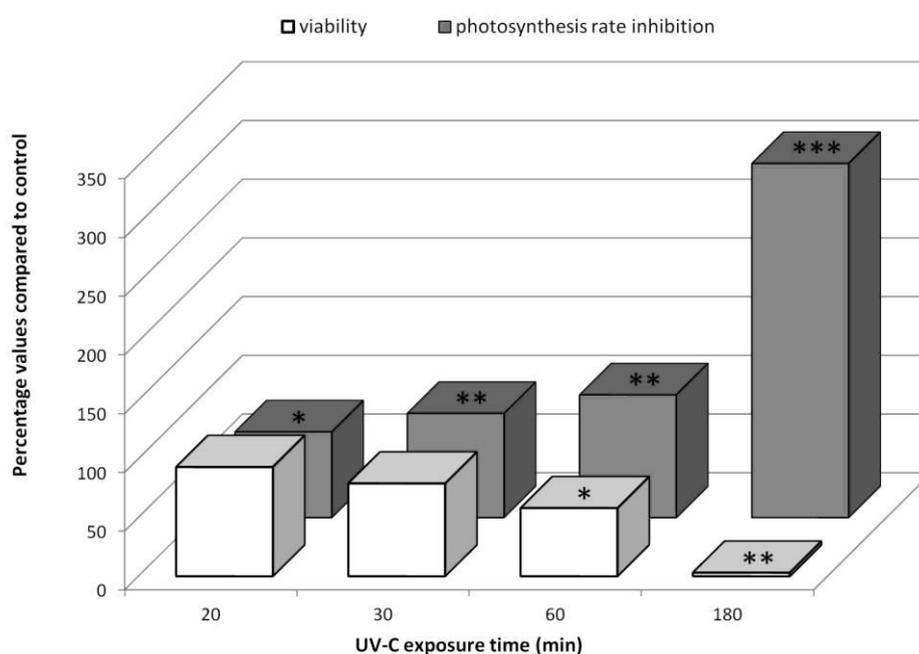


Figure III.1-2: Viability and photosynthesis rate inhibition of algal cells according to the UV-C exposure time. Stars represent significant differences with Anova test compared to control sample at $p < 0.05$ for *, $p < 0.01$ for ** and $p < 0.001$ for ***.

Algal biofilm grows in optimal conditions on limestone blocks. The results showed a respective extension rate of 15 % (data not significant) and 19 % (significant at $p < 0.05$) per week for treatment II and III (Table III.1-1 and Figure III.1-4 A). The difference observed between the two treatments is explained by the greater number of algal cells deposited in treatment III, which allow a faster extension of the colonized area.

Unlike that, UV-C irradiation followed by a rest period of one week, cause a decrease of colonized area of 21 % and 13 % for treatment II and III respectively (data not significant,

Figure III.1-4 B).

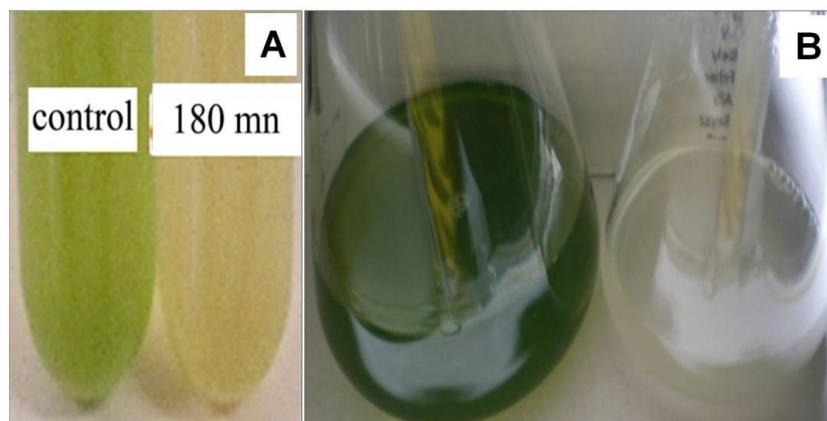


Figure III.1-3: Control and exposed (180 min of UV-C) samples. A: just after exposition, B: 2 weeks later after re-sowing in fresh culture medium.

Even if the irradiation time was higher in treatment III, the algae proliferation was less affected than in treatment II. This result could be a consequence of the three times greater number of algal cells deposited in treatment III than in treatment II. Thus, the algal upper cell layer seemed to have a protective effect against UV-C. Concerning treatment IV, the post UV-C high light exposition enhanced the effect of UV-C irradiation. Even if the quantity of algae and the exposure time were the same between treatments III and IV, the colonized area decreased by 26 % (data not significant, **Figure III.1-4 B**).

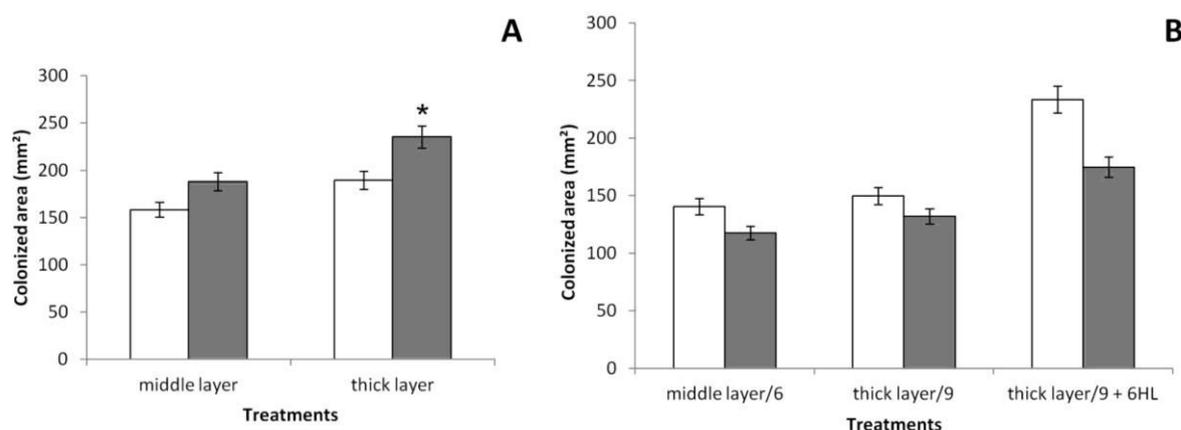


Figure III.1-4: Effect of UV-C exposure on algae colonized area for control samples (A) and exposed samples (B). White: colonized areas measured closely after the deposition, grey: colonized areas determiner after 1 week of growth. Numbers in x-axis represent exposure time in hours. HL: High Light. Star represents significant difference with Anova test at $p < 0.05$. Error bars are \pm SE values for triplicates. (For more information about treatments, see Table 1).

The covering rate of control algal culture on limestone blocks increased significantly between 16 and 25 % depending on the quantity of algae deposited, after 1 week of culture (**Figure III.1-5 A**). After UV-C exposure (**Figure III.1-5 B**), the covering rate was unchanged for treatments II and III, while it decreased by respectively 38 % (significant at $p < 0.001$) and 15 % (significant at $p < 0.05$) for treatments I and IV. In treatment I, the relatively weak number of algae deposited may explain the drastic decrease (38 %) of covering rate since they formed a thin layer through which UV-C could easily cross. In treatment II and III, the thickness of the algal layer may have acted as a shield, preserving the underlying cells from UV-C effects. The UV-C consecutive high light irradiation applied in treatment IV greatly reinforced the deleterious effects of UV-C exposure. Indeed, the covering rate decreased by 13 % for treatment IV compared to 4 % in treatment III (**Figure III.1-5 B**).

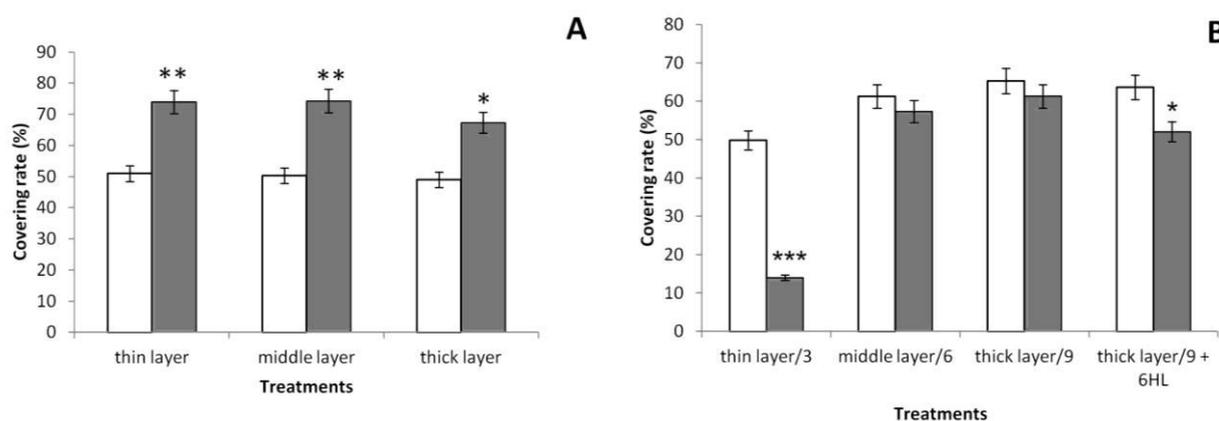


Figure III.1-5: Effect of UV-C exposure on algae covering rate for control samples (A) and exposed samples (B). White: covering rate measured closely after the deposition, grey: covering rate determined after 1 week of growth. Numbers in x-axis represent exposure time in hours. HL: High Light. Stars represent significant differences with Anova test at $p < 0.05$ for *, $p < 0.01$ for ** and $p < 0.001$ for ***. Error bars are \pm SE values for triplicates. (For more information about treatments, see Table 1).

III.1.1.4. Discussion

UV-C with highly energetic photons is able to destroy chemical bonds of biomacromolecules, leading to an array of cell injuries (Stapleton, 1992). Many studies showed an alteration of photosystems (I and II) and enzymes activities after UV exposure which induced a decrease of the photosynthetic capacity (Hermann *et al.*, 1996; Gomez *et al.*, 1998). Our results showed that after various times of UV-C exposure, the photosynthetic

activity of algae was strongly decreased and even annihilated (**Figure III.1-2**) which could be related to a degradation of their photosynthetic apparatus. After an irradiation of 60 min of UV-C, an O₂ consumption was even detected, which could be explained by a strong photorespiration and or by a reinforcement of respiration. This was moreover in concordance with the drastic decrease of chlorophyll contents (data not shown). Similar results have been reported by Jayakumar *et al.* (1999) working on *Azolla microphylla*, an aquatic fern submitted to UV-C. They showed that an increase of exposure time led to more and more important damages on photosynthetic apparatus and pigment contents.

The disturbance of the photosynthetic pathway might have serious repercussions on the survival ability of the algal cells (Bolige *et al.*, 2005; Karsten *et al.*, 2007). Our results showed a decrease in survival ability of algal cells when the exposure time increased (**Figure III.1-2**). Iriti *et al.* (2007) working on tomato protoplasts show a drastic increase of cell mortality after UV-C exposure. The reduced algal cell viability was especially obvious after 15 h post-treatment rest period, which indicated that death was not immediate. In fact, Danon and Gallois (1998) show that UV-C irradiance induces programmed cell death (PCD) on animal as well as on plant cells. That PCD might be involved in the mortality observed in this work. Moreover, after UV-C exposure, algal cells that were re-inoculated on fresh medium were unable to proliferate (**Figure III.1-3 B**). In fact, UV-C radiation is already known for their ability to generate oxidative stress and for their genotoxicity effect (Takahashi *et al.*, 2006). Exposure of *Euglena gracilis* to UV-C induces a production of cyclobutane-pyrimidine dimers, DNA photoproducts involved in cellular lethality, senescence and mutagenesis. After irradiance, these *Euglena* cells are unable to proliferate, as observed in the case of algae used in this study.

To our knowledge, few studies were carried out on the UV-C effect on fixed algal colony. The obtained results showed that UV-C exposure decreased the colonized area (**Figure III.1-4 B**) which means that the ability of algae to expand and to colonize their environment was annihilated. This decrease was observed whatever the time of exposure and whatever the quantity of algal cells.

In the same way, the covering rate decreased after UV-C exposure (**Figure III.1-5 B**). The covering rate was linked to the colouring of algal colony deposited on the limestone. A decreased covering rate indicated a bleaching of some cells of the colony related to chlorophyll degradation followed by a decreased in cell viability. That effect was especially

obvious in case of treatment I, when a little number of algal cells were deposited on blocks. Therefore, it appeared that the thickness of the algal colony was of first importance concerning the efficiency of UV-C radiation in the algal development limitation. More the number of algal cells deposited is important, longer was the UV-C exposure time to obtain a significant reduction of covering rate. This phenomenon was imputable to the disposition of algae one on each other, forming multiple cell layers on the limestone blocks. Underlying cells then benefited from a protective effect from the overlying layers that filtered the UV-C radiations. An additional protective effect might also take place in the underlying cell layers, which consist in an increased synthesis of protective pigments like flavonoïds and/or anthocyanins. Such increased levels of flavonoïds and anthocyanins are in fact reported by [Sarghein et al. \(2008\)](#) working on *Capsicum longum* submitted to UV-C irradiation.

Finally, a particular attention had also been ported to treatment IV. In this case, the same number of algal cells was deposited on the block and the same UV-C exposure was applied as in treatment III, but at the end of the UV-C exposure, algae were submitted to high light for 6 hours. The results showed that the covering rate was more severely decreased in that case than in case of treatment III (**Figure III.1-5 B**). Photoinhibition is a well-understood phenomenon. In high light conditions, the quantity of energy received by photosystems might excess their ability to convert them into chemical energy. The observed result consist in a bleaching consecutive to a degradation more and less deep of damaged photosystems. In marine alga, *Laminaria saccharina* exposure to an excessive light, induce a decrease in efficiency of the electron transport chain leading to a fall in the quantum yield of PS II ([Gevaert et al., 2002](#)). The photoinhibition might be of highest importance, especially in our case because the algae used in this study were adapted to low light sources in caves. It would be interesting to investigate this light sensitivity, by studying the ratio chlorophyll a and chlorophyll b.

In this study, the effects of UV-C irradiation are investigated only on algal strains. However, microorganisms like filamentous fungi have been reported in caves and particularly in Lascaux's. One genus, *Ulocladium* sp. (black fungi with melanin), causes particular problems for the conservation of mural paintings, since it synthesizes protective melanin pigments under UV irradiation ([Suryanarayanan et al., 2004](#); [Singaravelan et al., 2008](#)). Further experiments will be set up to optimize UV irradiation in order to control black fungi proliferation.

III.1.1.5. Conclusion

This study showed that UV-C exposure responses depend on support of culture, thus the effects were more deleterious when algae were cultivated on liquid medium. Exposure to high light increased the observed damages. Overall, the experimental approaches observed on algal cells cultivated in liquid medium could be also applied to algae cultivated on limestone blocks.

In future experiments, we will determine the most efficient irradiation time according to the thickness of the algal colony cultivated on solid support.

The relationships between microorganisms and physical support (rocks) and the effects of UV irradiation on pigments used in mural paintings will also be analyzed.

Finally, optimization of this alternative method for *in situ* conditions could be used to eradicate or to limit the proliferation of algae in caves.

Acknowledgements

We thank the *Ministère de la Culture* (France) for its financial support and Marie Le Jean for her valuable advices.

References

Barberousse, H., Tell, G., Yepremian, C., Coute, A., 2006. Diversity of algae and cyanobacteria growing on building facades in France. *Algological Studies* 120, 83-110.

Bolige, A., Kiyota, M., Goto, K., 2005. Circadian rhythms of resistance to UV-C and UV-B radiation in *Euglena* as related to “escape from light” and “resistance to light”. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 81,43-54.

Brunet, J., Fortier, L., Stefanaggi, M., Vouvé, J., Malaurent, P., 2000. Conservation et protection de l’art préhistorique. LRMH, Direction de l’architecture et du patrimoine du ministère de la Culture et de la Communication.

Danon, A., Gallois, P., 1998. UVC radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 437, 13-136.

Gevaert, F., Creach, A., Davoult, D., Holl, A.C., Seuront, L., Lemoine, Y., 2002. Photo-inhibition and seasonal photosynthetic performance of the seaweed *Laminaria saccharina* a simulated tidal cycle: chlorophyll fluorescence measurements and pigments analysis. *Plant, cell and environment* 25, 859-872.

Hermann, H., Häder, D.P., Köfferlein, M., Seidlitz, H.K., Ghetti, F., 1995. Effects of UV radiation on photosynthesis of phytoplankton exposed to solar simulator light. *Journal of photochemistry and photobiology* 34, 21-28.

Holzinger, A., Lutz, C., 2005. Algae and UV irradiations: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* 37, 190-207.

Iriti, M., Guarnieri, S., Faoro, F., 2007. Responsiveness of *Lycopersicon pimpinellifolium* to acute UV-C exposure : Histocytochemistry of the injury and DNA damage. *Acta Biochemica Polonica* 54(2), 273-280.

Jayakumar, M., Eyini, M., Selvinthangadurai, P., Lingakumar, K., Premkumar, A., Kulandaivelu, G., 1999. Changes in pigment composition and photosynthetic activity of aquatic fern (*Azolla microphylla* Kaulf.) exposed to low doses of UV-C (254 nm) radiation. *Research of Biological Sciences, Madurai Kamaraj University, Madurai-625021, India.*

Karsten, U., Karsten, U., Lembcke, S., Schumann, R., 2007. The effects of ultraviolet radiation on photosynthetic performance, growth and sunscreen compounds in aeroterrestrial biofilm algae isolated from building facades. *Planta* 225, 991-1000.

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

Prasad, S.M., Zeeshan, M., 2004. Effects of UV-B and monocrotophos, singly and in combination, on photosynthetic activity and growth of non-heterocystous cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Environmental and Experimental Botany* 52, 175-184.

Sarghein, SH., Carapetian, J., Khara, J., 2008. Effects of UV-radiation on photosynthetic pigments and UV absorbing compounds in *Capsicum longum* (L.). *International Journal of Botany* 4 (4), 486-490.

Singaravelan A., Grishkan I., Beharav A., Wakamatsu K., Ito S., Nevo E., 2008. Adaptive Melanin Response of the Soil Fungus *Aspergillus niger* to UV Radiation Stress at “Evolution Canyon”, Mount Carmel, Israel. *Plos One*, Vol.3.

Stapleton, A.E., 1992. Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell* 4, 1353-1358.

Suryanarayanan Trichur S., Ravishankar Jagadesa P., Venkatesan Govindan and Murali Thokur S., 2004. Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte. *Mycol. Res.* 108, 974–978.

Takahashi, A., Shibata, N., Nishikawa, S., Ohnishi, K., Ishioka, N., Ohnishi, T., 2006. UV-B light induces an adaptative response to UV-C exposure *via* photoreactivation activity in

Euglena gracilis. Photochem. Photobiology Sci. 5, 467-471.

III.1.2. Effets des UV-C au niveau du contenu pigmentaire

Dans l’**Article 1** nous avons vu que la viabilité ainsi que l’activité photosynthétique des algues en suspension étaient nulles ou totalement inhibées pour des durées d’exposition supérieure ou égale à 1 heure (28,8 kJ m⁻²). Rappelons que nos recherches s’orientent à la fois sur des traitements efficaces en terme d’éradication des algues (mort des cellules) mais également en terme de décoloration et de dégradation des pigments naturels (chlorophylles et caroténoïdes) présents dans les cellules d’algues. Après avoir observé qu’il y avait un effet de décoloration des cellules d’algues sans doute lié à une dégradation des chlorophylles (effet « bleaching ») après une exposition de 180 minutes (86,4 kJ m⁻²) aux UV-C, nous avons voulu savoir quels étaient les effets d’expositions croissantes aux UV-C sur les pigments chlorophylliens (Chla et Chlb) et non chlorophylliens (Car).

III.1.2.1. Conditions expérimentales et dosages des pigments

La culture des algues en milieu liquide ainsi que les conditions d’exposition aux UV-C sont les mêmes que celle utilisées dans l’**Article 1** (**paragraphe III.1.1.2.2**). L’extraction et le dosage des pigments chlorophylliens (Chla et Chlb) et non chlorophylliens (Car) ont été réalisés d’après une méthode présentée dans l’étude de [Devesa et al. \(2007\)](#). Le protocole détaillé est présenté dans l’**Article 2**, **paragraphe III.2.3.2.4**. Le **Tableau III.1-2** présente l’ensemble des durées d’exposition et doses reçues d’UV-C utilisées dans le Chapitre 1.

Tableau III.1-2 : Correspondances des durées d’exposition aux UV-C utilisées dans le Chapitre 1 en doses reçues (en kJ m⁻²).

Durée de l’exposition en minutes / (heures)	Dose reçue en kJ m ⁻²
15 / (0,25)	7,2
20 / (0,33)	9,6
30 / (0,5)	14,4
60 / (1)	28,8
150 / (2,5)	72
180 / (3)	86,4
300 / (5)	144
360 / (6)	172,8
540 / (9)	259,2

III.1.2.2. Résultats

La **Figure III.1-6** présente les résultats obtenus en ce qui concerne le dosage des pigments chlorophylliens et non chlorophylliens des suspensions d'algues exposées à des durées croissantes d'UV-C.

Dans un premier temps, on remarque que la durée du traitement influence de façon non linéaire les concentrations en chlorophylles. En effet, pour des durées d'exposition de 15 et de 30 minutes les teneurs en Chl*a* (respectivement de $7,18 \pm 0,78$ et de $6,31 \pm 0,20 \mu\text{g ml}^{-1}$) sont significativement supérieures à celles mesurées chez les échantillons témoins ($4,19 \pm 0,17 \mu\text{g ml}^{-1}$) ($p = 2 \times 10^{-5}$ pour 15 min et $p = 6 \times 10^{-4}$ pour 30 min). Des résultats similaires sont également observés pour la Chl*b* mais pour des durées d'exposition de 60 et 150 minutes (teneurs respectives de $3,41 \pm 0,63$ et de $3,24 \pm 0,13 \mu\text{g ml}^{-1}$) par rapport aux valeurs témoins ($2,06 \pm 0,17 \mu\text{g ml}^{-1}$) ($p = 0.001$ pour 80 min et $p = 0.004$ pour 150 min). Enfin, la durée maximale d'exposition (300 minutes) diminue significativement les teneurs en Chl*a* ($1,61 \pm 0,22 \mu\text{g ml}^{-1}$) par rapport aux échantillons témoins ($p = 9 \times 10^{-5}$), alors qu'elle n'induit pas de changement pour les teneurs en Chl*b*. En ce qui concerne les teneurs en caroténoïdes, aucun changement n'est observé pour des durées d'exposition de 15 et de 30 minutes, alors qu'une diminution significative et croissante survient à partir de 60 minutes d'exposition ($1,25 \pm 0,13 \mu\text{g ml}^{-1}$) et ce jusqu'à 300 minutes ($0,16 \pm 0,01 \mu\text{g ml}^{-1}$) par rapport aux valeurs témoins ($2,09 \pm 0,13 \mu\text{g ml}^{-1}$) ($p = 8 \times 10^{-5}$ pour 60 min, $p = 5 \times 10^{-7}$ pour 150 min et $p < 1 \times 10^{-7}$ pour 300 min). La durée maximale (300 minutes) entraîne plus de 90 % de diminution de la teneur en caroténoïdes, plus de 60 % pour la Chl*a*, mais n'induit pas de changement dans les teneurs en Chl*b*.

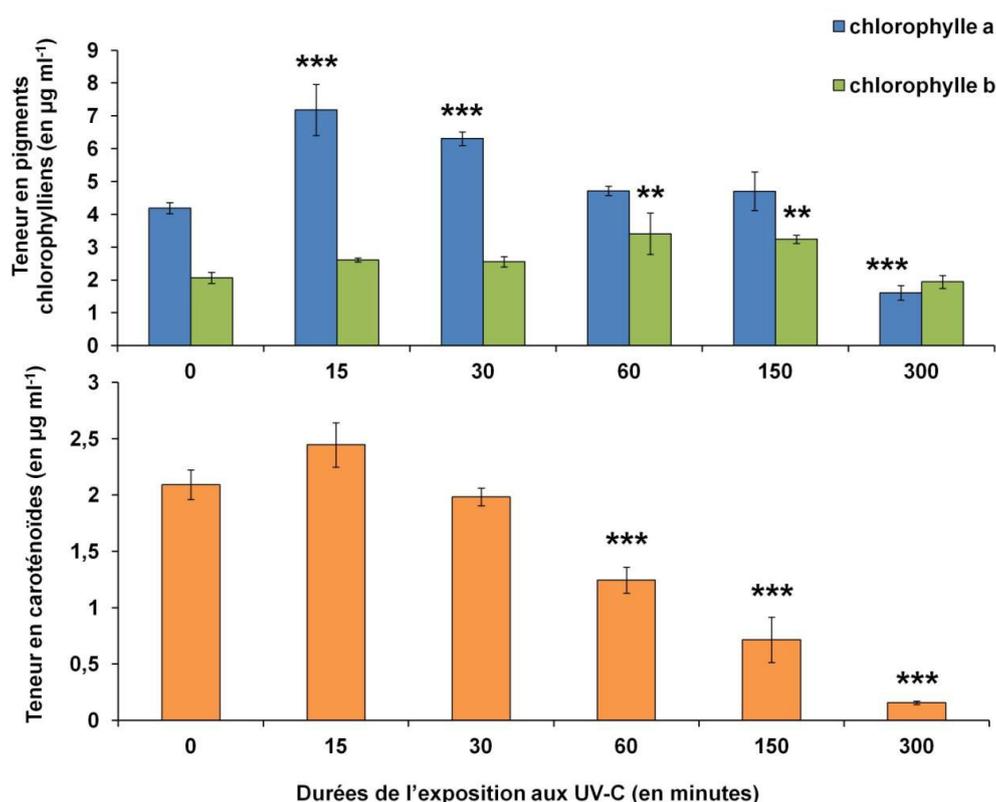


Figure III.1-6 : Teneurs en pigments des algues exposées à des durées croissantes d'UV-C. Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$). Les étoiles représentent des différences significatives à $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.001$ (***) par rapport au jour 0 (test de Tukey HSD).

III.1.2.3. Discussion des résultats

Au cours de cette expérience, deux phénomènes distincts ont été observés : l'augmentation des teneurs en chlorophylles (durées d'exposition inférieures à 300 min) et leur dégradation (à partir de 300 min). Pour comprendre l'augmentation des teneurs en chlorophylles après exposition aux UV-C, nous avons cherché à savoir quelles étaient les voies de synthèse et de dégradation des chlorophylles chez les organismes photosynthétiques. La teneur en chlorophylles d'une cellule au cours du temps résulte d'un équilibre dynamique entre la synthèse et la dégradation de ces molécules. Lors du fonctionnement optimal d'un organisme photosynthétique, la durée de vie des molécules de chlorophylle est limitée, et celles qui sont dégradées sont remplacées par des molécules nouvellement synthétisées : c'est le "turn-over" des chlorophylles. Lors d'un stress environnemental, la dégradation des chlorophylles conduisant à une décoloration de l'organisme photosynthétique est couramment observée (Hörtensteiner et Kräutler, 2011). La dégradation des chlorophylles peut résulter de différents facteurs. Certains de ces facteurs sont des facteurs endogènes, liés au cycle normal

de développement et de sénescence de la plante ou de ses organes (jaunissement des feuilles à l'automne, maturation des fruits...), d'autres, ainsi qu'il a été mentionné précédemment, sont des facteurs exogènes entraînant la mort prématurée des cellules (maladies, polluants, stress environnementaux, traitements comme les UV par exemple...[Folly, 2000](#)). La dégradation des chlorophylles, qu'elle soit d'origine endogène ou consécutive à un stress biotique ou abiotique, est gouvernée chez les Embryophytes par une succession de réactions enzymatiques dont les premières sont catalysées respectivement par la chlorophyllase, la magnésium déchélatase et la phéophorbide *a* oxygénase ([Matile et al., 1999](#) ; [Folly, 2000](#) ; [Costa et al., 2006](#) ; [Chairat et al., 2013](#)). La Chlb issue de la Chla lors de sa synthèse retourne à nouveau lors du processus de dégradation vers sa forme Chla grâce aux actions successives de la Chlb réductase puis de la dihydroxy-chlorophylle *a* réductase. L'état des connaissances est moins avancé chez les micro-organismes photosynthétiques mais l'examen des génomes de certaines Chlorophycées, en particulier *Chlamydomonas reinhardtii* ([Hörtensteiner et Kräutler, 2011](#)), révèle la présence de gènes codant pour des protéines à séquences très homologues à celle de la phéophorbide *a* oxygénase. Des formes de phéophytinase, une enzyme analogue de la chlorophyllase sont en outre présentes chez tous les eukaryotes photosynthétiques.

Plusieurs auteurs ont démontré que l'activité des enzymes de la voie de dégradation était régulée en réponse à divers stress environnementaux et notamment sous l'action du rayonnement ultraviolet et plus particulièrement les UV-C. Les études de [Costa et al. \(2006\)](#), [Chairat et al. \(2013\)](#) et [Pongprasert et al. \(2011\)](#) ont analysé l'effet du rayonnement UV-C respectivement sur une variété italienne de Broccoli, sur le Broccoli chinois et sur la Banane afin de montrer que les UV-C pouvaient être utilisés pour limiter les phénomènes de sénescence et notamment de dégradation des chlorophylles de ces fruits et légumes pour augmenter leur durée de stockage. Ils ont examiné les effets de différents traitements aux UV-C (allant de 0,03 à 14 kJ m⁻²) sur l'activité enzymatique (chlorophyllase, Mg-déchélatase et peroxydase) et sur les teneurs en chlorophylles de ces aliments. Dans chacune de ces études il a été démontré que sous exposition aux UV-C, l'activité de ces enzymes était moins importante et que la dégradation des chlorophylles était retardée par rapport aux échantillons n'ayant pas subis de traitement aux UV-C.

Les résultats que nous avons observés sur les algues sont en accord avec les observations de ces auteurs. L'hypothèse que nous pouvons formuler est donc que l'activité

des enzymes de la voie de dégradation ait été directement ou indirectement inhibée par l'action des UV-C. En effet, une baisse de l'activité des enzymes de la voie de dégradation conduirait à une augmentation de la teneur en chlorophylle comme celle observée dans les échantillons soumis à des irradiations de 15 et 30 min, ce qui correspond respectivement à des doses reçues de 7,2 et 14,4 kJ m⁻². De plus ces doses d'UV-C sont très similaires à celles utilisées dans l'étude de [Costa et al. \(2006\)](#) (4, 7, 10 et 14 kJ m⁻²). Le même phénomène d'augmentation de la teneur en chlorophylle se manifeste au niveau de la Chl**b** mais cette fois pour des doses d'exposition plus importantes. Alors que le contenu pigmentaire en Chl**b** n'est pas affecté pour les faibles doses de 7,2 et 14,4 kJ m⁻², celui-ci augmente pour des doses de 28,8 et 72 kJ m⁻². Il est possible que les enzymes impliquées dans la dégradation de la Chl**b** soient moins sensibles aux effets des rayonnements UV-C que celles impliquées dans la dégradation de la Chl**a**.

Pour des doses d'exposition plus fortes toutefois, les résultats obtenus indiquent une diminution significative de la teneur en Chl**a**. Il en est probablement de même pour la Chl**b** – bien que nos résultats ne permettent pas de l'affirmer avec certitude – pour des doses plus élevées d'UV-C. Une telle dégradation des pigments photosynthétiques a déjà été rapportée *in vitro* par [Zvezdanović et al. \(2009\)](#) sur des extraits pigmentaires de feuilles d'Épinard. En effet, ces auteurs ont pu mettre en évidence une dégradation graduelle des extraits de chlorophylle en fonction du temps d'exposition aux UV-C, avec une dégradation quasi complète après 10 minutes de traitement. Ils ont également observé que les UV-C étaient, parmi les trois types d'UV, ceux qui induisaient les dommages les plus importants au niveau des pigments. Néanmoins, il s'agit là d'un test *in vitro*, réalisé sur des molécules de pigment totalement isolées de leur contexte cellulaire habituel. En effet, au niveau cellulaire, les molécules de Chl**a** et **b** sont liées à des complexes protéiques et leur sensibilité est sans doute très différente. Une seconde étude, réalisée *in vivo* cette fois sur une espèce de cyanobactérie, *Microcystis aeruginosa* - et donc plus proche de nos conditions expérimentales - a permis à [Ou et Gao \(2012\)](#) de montrer qu'il n'y a pas, sur cette espèce, de diminution immédiate des teneurs en Chl**a** en fonction des doses d'UV-C utilisées. Ces auteurs ont cependant observé une diminution progressive dans le temps après la fin de l'exposition. Il apparaît également dans cette étude que la Chl**a** soit plus résistante aux rayonnements UV-C que ne l'est la Chl**b** alors que dans notre cas, il semblerait au contraire que se soit l'inverse puisqu'aucune

diminution significative de la concentration en Chl b n'a été observée même après le traitement le plus fort (300 minutes d'exposition).

Enfin, il faut noter également que, comme le suggère l'étude de [Ou et Gao \(2012\)](#), la dégradation des chlorophylles peut avoir lieu de manière différée dans le temps. Dans leurs travaux, les auteurs rapportent que le temps nécessaire à la dégradation totale des chlorophylles est d'autant plus réduit que les durées d'expositions aux UV-C sont grandes ; ainsi, une dégradation totale de la Chl a a été observée dans les 2 jours après une exposition à 42 kJ m $^{-2}$ alors que pour une dose de 0,35 kJ m $^{-2}$ la dégradation n'a été totale qu'après 6 jours. Les doses que nous avons utilisées se situent entre 7,2 et 150 kJ m $^{-2}$ et les mesures ont été effectuées directement après la fin du traitement, ce qui ne nous a malheureusement pas permis de vérifier sur cette manipulation le potentiel effet à retardement des UV-C sur les teneurs en chlorophylles.

Cependant, le catabolisme de la chlorophylle ne se résume pas à une dégradation du pigment lui-même. *In vivo*, les molécules de chlorophylle sont liées à des apoprotéines constitutives des photosystèmes I et II (PS I et PS II) ou des LHC (« Light Harvesting Complex ») qui sont les éléments des antennes collectrices de photons. Au niveau du PS I et du PS II seule la Chl a est présente, tandis que les LHC comportent de la Chl a et également de la Chl b . Des études menées sur des mutants "stay green" ont permis de mettre en évidence l'existence de protéines régulatrices impliquées dans la régulation de la dégradation des apoprotéines de l'antenne lors des processus de sénescence. En l'absence de ces protéines, les LHC ne sont pas dégradés et le catabolisme de la chlorophylle, en particulier la Chl b n'a pas lieu ou est fortement décalé dans le temps ([Hörtensteiner, 2009](#)). Bien qu'à notre connaissance aucune donnée ne soit disponible à l'heure actuelle concernant l'existence d'une telle régulation chez les micro-organismes photosynthétiques, de tels paramètres pourraient également être impliqués dans la dégradation des chlorophylles de ces organismes. Les résultats présentés dans ce travail font état d'une plus grande sensibilité de la Chl a par rapport à la Chl b . On constate en effet une diminution des teneurs en Chl a à une dose appliquée d'UV-C de 144 kJ m $^{-2}$ alors que la Chl b n'est pas affectée. Une explication possible de ce phénomène pourrait être une plus grande vulnérabilité à la dégradation des chlorophylles et apoprotéines des antennes internes aux photosystèmes par rapport aux chlorophylles et apoprotéines des LHC.

Enfin, nous avons également étudié les effets des UV-C sur les teneurs en caroténoïdes. Les caroténoïdes sont des pigments non photosynthétiques secondaires qui sont considérés comme des pigments antioxydants jouant un rôle de protection contre le stress oxydatif généré par l'exposition au rayonnement UV. Ils ont effet la capacité de piéger les espèces réactives de l'oxygène (ROS) afin de protéger la cellule et ses composants contre certaines réactions de photooxydation (Sinha *et al.*, 2001 ; Stahl et Sies, 2003 ; Ma et Gao, 2010 ; Zlatev *et al.*, 2012). Plusieurs auteurs ont montrés une augmentation des teneurs en caroténoïdes sous exposition aux UV-A et UV-B chez différentes espèces d'algues (Yakovleva et Titlyanov, 2001 ; Lee et Shiu, 2009 ; Schmidt *et al.*, 2012). Nous n'avons pas trouvé de résultats similaires concernant les UV-C, ce qui suggère que les caroténoïdes seraient plutôt sensibles à ce rayonnement. Nos résultats semblent confirmer cette hypothèse puisque nous avons observé une diminution significative de la teneur en caroténoïdes dès une heure d'exposition aux UV-C. Au cours de la deuxième étude (**paragraphe III.2**), nous étudierons les relations potentielles entre les teneurs en caroténoïdes et les concentrations en H₂O₂ (ROS) d'une espèce d'algue (*Chlorella minutissima*) exposée aux UV-C.

III.1.3. Synthèse du chapitre 1

Dans ce chapitre nous avons étudié l'effet de différentes durées d'exposition aux UV-C sur les paramètres physiologiques et macroscopiques de différentes souches cavernicoles de micro-algues. Nous avons choisi d'analyser l'effet du rayonnement UV-C au niveau de deux types d'organisation biologique : celui de la suspension d'algues (à l'échelle cellulaire) et celui du biofilm (plusieurs couches cellulaires). Le choix de travailler sur ces deux types d'organisation nous a tout d'abord permis d'obtenir des réponses quant aux effets des UV-C sur des paramètres essentiels tels que la viabilité et l'activité métabolique des algues (photosynthèse et respiration) (**paragraphe III.1.1, Article 1**) et les teneurs en pigments (**paragraphe III.1.2**) mais également de mettre en évidence l'effet du rayonnement UV-C sur une structure complexe telle que le biofilm.

Dans l'**Article 1** nous avons observé que l'activité photosynthétique était significativement diminuée après une exposition de 20 minutes (baisse de plus de 70 %) pour atteindre une inhibition totale après une exposition de 60 minutes. Pour ces mêmes durées d'exposition, la viabilité n'était diminuée que de 7 % après 20 minutes et de 40 % après 60 minutes. Ces résultats nous ont permis de montrer :

- 1) que l'activité photosynthétique était premièrement et sévèrement diminuée sous exposition aux UV-C, même pour de faibles durées d'exposition,
- 2) que la baisse de la viabilité n'était pas directement liée à la baisse de l'activité photosynthétique,
- 3) que 1) et 2) permettent de démontrer que les algues sont capables au moins un certain temps de maintenir une activité et une viabilité cellulaire même lorsque l'appareil photosynthétique est fortement endommagé (respiration de stress),
- 4) que pour une durée d'exposition supérieure à une heure, la viabilité diminuait.

Donc, à l'échelle de la suspension d'algues, un traitement de 180 minutes ($86,4 \text{ kJ m}^{-2}$) permet d'obtenir des résultats satisfaisants en termes d'éradication des cellules algales. De plus, nous avons pu mettre en évidence qu'une telle durée de traitement conduisait à des effets irréversibles puisqu'une population d'algues traitées n'était pas capable de re-proliférer après repiquage dans un milieu neuf (**Figure III.1-3**). Nous avons pu observer sur cette figure qu'il

y avait une décoloration partielle de la suspension algale juste après l'exposition aux UV-C (180 min, 86,4 kJ m⁻²). Cela suggère, en accord avec les résultats obtenus au niveau du contenu pigmentaire (**Figure III.1-6**), que cette durée n'est pas suffisamment efficace pour dégrader l'ensemble des chlorophylles. En effet, la concentration en Chla n'est significativement diminuée qu'à partir de 300 minutes (environ 150 kJ m⁻²) alors que pour cette même durée d'exposition, la teneur en Chlb n'est pas affectée, d'où une persistance de la coloration verte. Cependant, la **Figure III.1-3** de l'**Article 1** montre qu'après 1 semaine de culture en milieu neuf, une suspension soumise à une dose de 86,4 kJ m⁻² est totalement décolorée et blanchie suggérant une dégradation complète des chlorophylles au cours du temps. L'étude approfondie des effets immédiats et différés dans le temps des UV-C sera traitée dans le **Chapitre 2 (paragraphe III.2.3)** dans lequel nous présenterons les résultats obtenus sur l'espèce *Chlorella minutissima*.

La deuxième partie des résultats présentés dans ce chapitre concerne l'effet des UV-C à l'échelle du biofilm. Une méthode d'ensemencement des algues sur support solide a été adoptée afin de recréer la structure d'un biofilm (couches multiples de cellules). Les résultats obtenus ont montré que l'épaisseur du biofilm était un paramètre important conditionnant l'efficacité du traitement. Dans les grottes l'épaisseur des biofilms d'algues peut être très variable (de quelques micromètres à plusieurs millimètres) dépendant des conditions environnementales permettant une accumulation de matériel biologique plus ou moins importante. Il est donc nécessaire en premier lieu d'évaluer l'intensité de la colonisation avant d'effectuer un traitement aux UV-C (ce point sera notamment traité dans le **paragraphe III.2.4** et le **Chapitre 3**). De plus, sur les biofilms comme sur les suspensions cellulaires, l'efficacité du traitement peut ne se révéler qu'après un certain temps de repos. Des résultats complémentaires à ceux de l'**Article 1** permettant d'observer une diminution de la surface d'occupation se poursuivant après la fin de l'exposition aux UV-C seront présentés dans le **Chapitre 2 (paragraphe III.2.4)** avec un temps de suivi beaucoup plus long d'une vingtaine de jours et en utilisant les mesures colorimétriques apportant un complément d'information quant à l'effet des UV-C à l'échelle du biofilm.

III.2. Chapitre 2 : Etudes et analyses au laboratoire de l'effet du rayonnement UV-C sur *Chlorella minutissima* prélevée sur le site d'étude de la grotte des Moidons

Dans ce chapitre nous présenterons les résultats obtenus en conditions contrôlées sur une algue verte unicellulaire, *Chlorella minutissima*, prélevée sur le site d'étude de la grotte des Moidons.

Dans un premier temps, nous présenterons les résultats obtenus sur la capacité d'adaptation physiologique de *C. minutissima* cultivée en conditions « grottes » (**paragraphe III.2.1**). Ensuite, nous avons étudié et analysé l'effet du rayonnement UV-C sur *C. minutissima* à travers plusieurs expériences. Dans la première (**paragraphe III.2.2**), nous étudierons l'effet de doses / durées croissantes d'exposition aux UV-C sur *C. minutissima* au niveau de la viabilité, de l'activité métabolique ainsi que du contenu pigmentaire. Cette expérience, couplée avec les résultats obtenus dans le **Chapitre 1**, nous a ensuite amené à sélectionner deux doses d'UV-C (150 et 300 kJ m⁻²) pour étudier leurs effets immédiats et différés dans le temps (suivi pendant 21 jours) à l'échelle cellulaire et moléculaire (étude du stress oxydatif et de la fragmentation de l'ADN). Ces résultats seront présentés dans une deuxième expérience sous la forme d'un article scientifique (**paragraphe III.2.3, Article 2**) publié dans le journal International Biodeterioration and Biodegradation. Enfin, une troisième et dernière expérience (**paragraphe III.2.4**) sera consacrée à l'étude des paramètres macroscopiques et colorimétriques des algues cultivées sur support solide. Nous verrons dans cette partie que l'étude des paramètres colorimétriques a permis d'apporter des informations supplémentaires quant à l'effet du rayonnement UV-C à l'échelle du biofilm.

III.2.1. Adaptation physiologique de *C. minutissima* en fonction des conditions de culture

III.2.1.1. Conditions expérimentales

Deux méthodes de culture ont été utilisées ici afin de mettre en évidence certaines adaptations physiologiques de *C. minutissima* en fonction de la température, de la quantité de lumière et de nutriments. Pour la première méthode de culture, appelée conditions « optimales », une photopériode de 16 h à 130 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avec une température de 22 ± 1 °C a été adoptée en chambre de culture. La deuxième méthode, appelée conditions « grottes », est caractérisée par une photopériode de 6 h à 20 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ à une température de 10 ± 1 °C et a été effectuée à l'aide d'une enceinte de culture (phytotron). Les paramètres de la condition « grottes » correspondent aux valeurs mesurées sur un des biofilms échantillonnés dans la grotte des Moidons un jour de visite. Enfin, dans la dernière modalité de culture, toujours réalisée en conditions « grottes », nous avons fait varier les concentrations en nutriments en diluant le milieu de culture BG11 100 fois pour atteindre des concentrations faibles en nutriments (conditions oligotrophiques). Les résultats des dosages des éléments chimiques dans les eaux et les sols de la grotte ainsi que dans le milieu de culture BG11 sont présentés dans l'**Annexe 2**.

Après une quinzaine de jours de culture des algues dans ces conditions, un repiquage a été effectué (transplantation dans un milieu neuf) et les paramètres tels que le nombre de cellules et les teneurs en chlorophylles ont été suivis sur plusieurs jours.

III.2.1.2. Résultats et discussion

La courbe de croissance de *C. minutissima* cultivée en conditions « optimales » est présentée dans la **Figure III.2-1**. Le suivi a été effectué sur plus de 21 jours avec 16 points de mesure durant cette période. On distingue 3 phases de croissance : la phase de latence et d'accélération (1), la phase exponentielle de croissance (2) et la phase stationnaire (3).

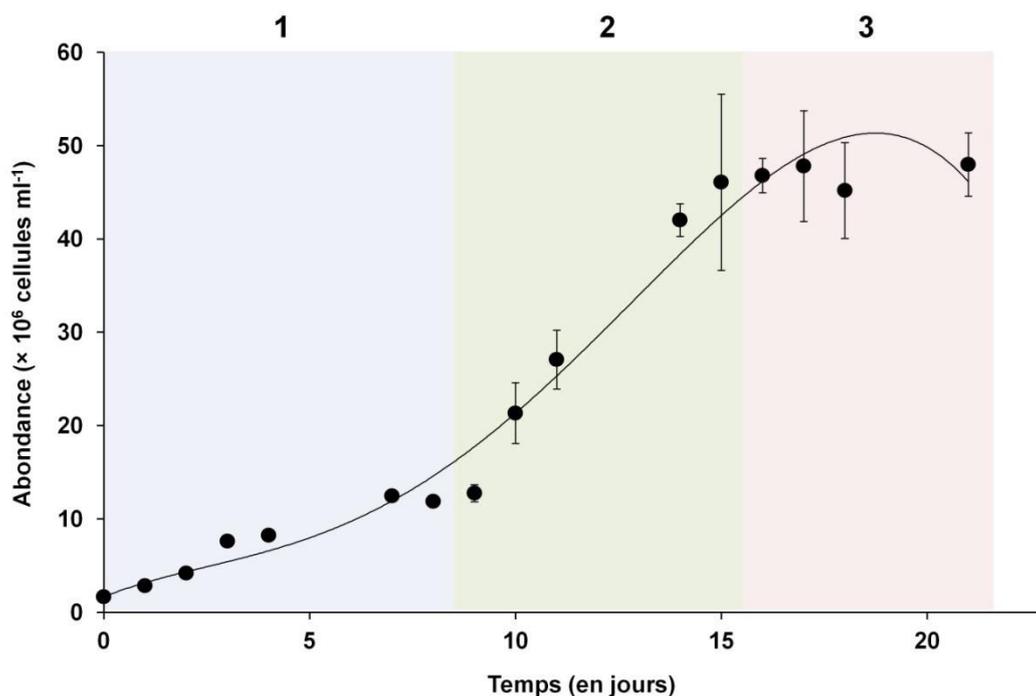


Figure III.2-1 : Courbes de croissance de *C. minutissima* cultivée en conditions « optimales ». 1 : phase de latence et d'accélération. 2 : phase exponentielle. 3 : phase stationnaire. Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$).

La phase de latence et d'accélération est tout d'abord caractérisée par une croissance très faible ; les cellules ont en effet besoin d'un temps pour s'acclimater aux nouvelles conditions de culture, puis après s'être acclimatées elles entament une phase dite d'accélération au cours de laquelle la population croît grâce à la reproduction végétative (division des cellules mères en cellules filles identiques) (Richmond, 2004 ; Clément-Larosière, 2012). Ensuite vient la phase exponentielle de croissance où, dans des conditions optimales la population algale s'accroît très fortement. C'est durant cette phase que le taux maximal de croissance est atteint (Richmond, 2004). Enfin, la phase stationnaire est caractérisée par la diminution de la disponibilité d'un élément essentiel, comme la lumière, l'azote, le phosphore ou le carbone..., qui va diminuer la vitesse de croissance. Le nombre de cellules produites est égal au nombre de cellules mortes et la croissance est donc nulle (Richmond, 2004 ; Clément-Larosière, 2012). Dans ce cas précis, la lumière n'est pas un facteur limitant alors que la diminution en éléments nutritifs constituerait donc la première explication de cette phase stationnaire, probablement suivie par la phase de sénescence (non visible sur le graphique) qui conduit à la sénescence de la population (Richmond, 2004). Le taux de croissance (μ) dans ces conditions, du début à la fin de l'expérience, est de $0,16 \text{ j}^{-1}$.

Cela signifie qu'il faut 6,25 jours pour obtenir une nouvelle cellule. Le taux de croissance maximal (μ_{\max} calculé lors de la phase exponentielle) est de $0,21 \text{ j}^{-1}$.

La **Figure III.2-2** présente la courbe de croissance de la même algue (*C. minutissima*) mais cultivée en conditions « grottes ». Le suivi a été effectué sur 27 jours avec 17 points de mesure durant cette période. Sur les trois phases observées et décrites précédemment, seules 2 sont présentées ici : la phase de latence et d'accélération (1) et la phase exponentielle (2). La phase 1 est caractérisée par une durée beaucoup plus longue par rapport à celle observée en conditions « optimales » de croissance (de 8 à 17 jours). La phase exponentielle a donc été retardée et se poursuit jusqu'à la fin du suivi, tandis que la phase 3 de sénescence n'apparaît pas sur le laps de temps au cours duquel ont été faites les mesures.

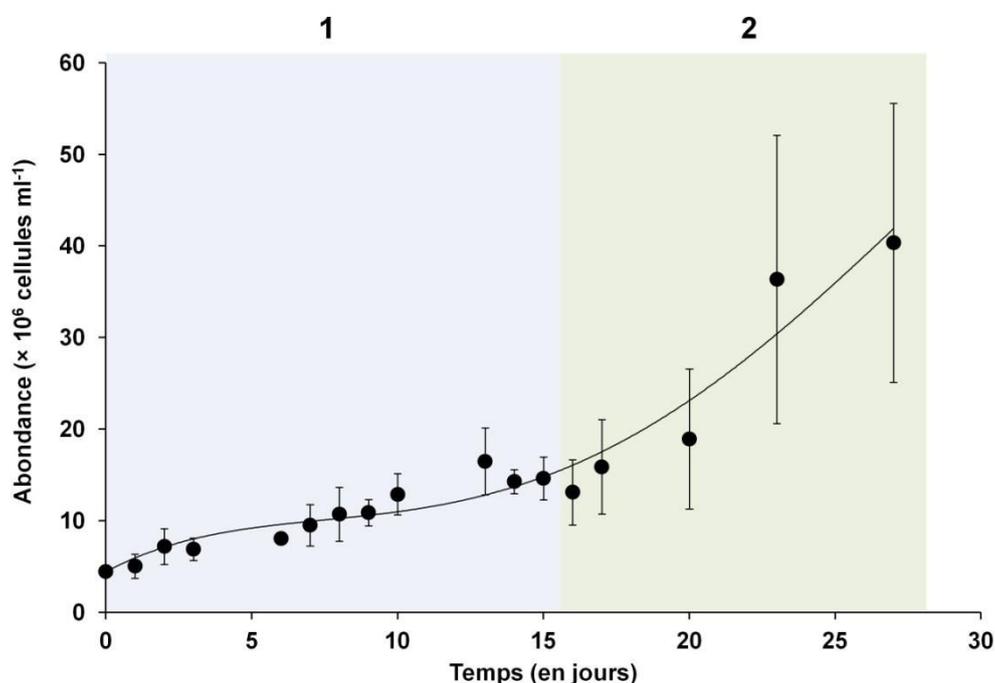


Figure III.2-2 : Courbes de croissance de *C. minutissima* cultivées en conditions « grottes ». 1 : phase de latence et d'accélération. 2 : phase exponentielle. Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$).

Le taux de croissance de *C. minutissima* cultivée en conditions « grottes » est de $0,08 \text{ j}^{-1}$ sur toute la durée de l'expérience. La croissance est plus lente qu'en conditions « optimales » étant donnée une quantité de lumière plus faible, diminuant ainsi l'intensité de l'activité métabolique des cellules d'algues. La phase de latence et d'accélération (phase 1) est donc beaucoup plus longue (une quinzaine de jours en conditions « grottes » contre environ 1 semaine en conditions « optimales ») et le taux de croissance maximal calculé lors de la phase

exponentielle est également fortement diminué dans ces conditions. Celui-ci est divisé par 2 par rapport à celui calculé en conditions « optimales » (μ_{\max} de 0,21 à 0,10 j^{-1}).

Nous avons ensuite comparé les taux de croissance de deux cultures d'algues soumises aux conditions de culture « grottes » mais avec des quantités de nutriments différentes. Sur la **Figure III.2-3**, la première courbe (BG11 1x) correspond à la croissance des algues cultivées en présence d'une quantité optimale de nutriments (milieu de culture BG11 non dilué), alors que la deuxième courbe (BG11 dilué à 0,01x) correspond approximativement à la quantité de nutriments que nous avons mesurée dans les eaux et les sols de la grotte des Moidons (conditions oligotrophiques).

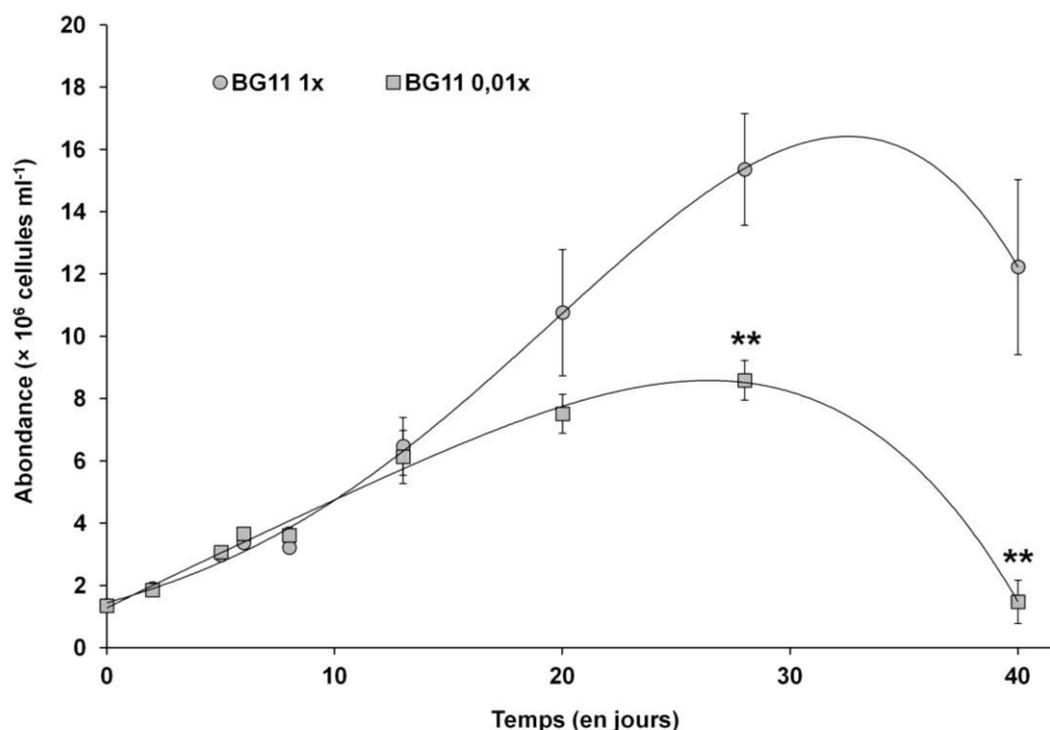


Figure III.2-3 : Comparaison des courbes de croissance de *C. minutissima* cultivées en conditions « grottes » en fonction de la quantité de nutriments dans le milieu. BG11 1x : quantité normale de nutriments. BG11 0,01x : quantité faible en nutriment. Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$). Les étoiles représentent des différences significatives entre traitements pour un jour donné à $p < 0,01$ (***) (test t).

On remarque dans un premier temps que les allures des courbes sont assez similaires, avec des phases de croissance exponentielle puis de sénescence à partir du 28^{ème} jour en conditions oligotrophiques et à partir du 33^{ème} jour en conditions optimales. Il y a cependant une différence significative de croissance entre les deux modes de culture à partir du 28^{ème}

jour ($p = 0,004$) et jusqu'au 40^{ème} jour de mesure ($p = 0,003$). En conditions oligotrophiques, le nombre de cellules algales présentes au 40^{ème} jour a été divisé par 4 par rapport à celui du pic de croissance enregistré au 28^{ème} jour. Cette diminution indique que les cellules ne sont plus capables de produire suffisamment d'énergie pour leur maintenance et meurent. Notons également que le suivi de la croissance des cellules d'algues lors de cette expérience a permis de détecter la phase de sénescence au-delà du 35^{ème} jour de mesure (phase non visible lors des premières expériences).

Enfin, dans une dernière expérience, nous avons analysé le contenu pigmentaire des cellules d'algues cultivées en conditions « optimales » et en conditions « grottes ». L'adaptation des micro-organismes photosynthétiques aux faibles conditions lumineuses peut-être étudiée en déterminant le rapport $Chla / Chlb$ (Falkowski *et al.*, 1981 ; Kitajima *et Hogan*, 2003 ; Reed *et al.*, 2012) qui renseigne sur la taille de l'antenne collectrice de la lumière (les LHC pour *Light Harvesting Complex*). En conditions d'éclairement optimal, un rapport $Chla / Chlb$ de 3 est très courant chez les micro-organismes photosynthétiques (Folly, 2000). Lors des dosages des chlorophylles pour les cultures d'algues cultivées en conditions « optimales » ($130 \mu\text{moles photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), nous avons observé des rapports de l'ordre de 3 pendant 7 jours de suivi. Un rapport inférieur à 1 indique une proportion plus importante de $Chlb$ par rapport à la $Chla$ et donc une photo-acclimatation avec des antennes collectrices de grande taille (Richmond, 2004). La **Figure III.2-4** illustre le phénomène des changements du contenu pigmentaire lorsque les algues sont cultivées en conditions « grottes ». Les résultats indiquent une augmentation progressive de la $Chlb$ par rapport à la $Chla$, entraînant ainsi une baisse significative du rapport $Chla / Chlb$ à partir du 14^{ème} jour de mesure. La comparaison des rapports pour les deux modes de culture adoptés confirment que les cellules de *C. minutissima* se sont « photo-acclimatées » à des faibles quantités de lumière en modifiant leur contenu pigmentaire (augmentation des teneurs en $Chlb$) afin d'optimiser le captage de la lumière et ainsi de maintenir leur activité photosynthétique.

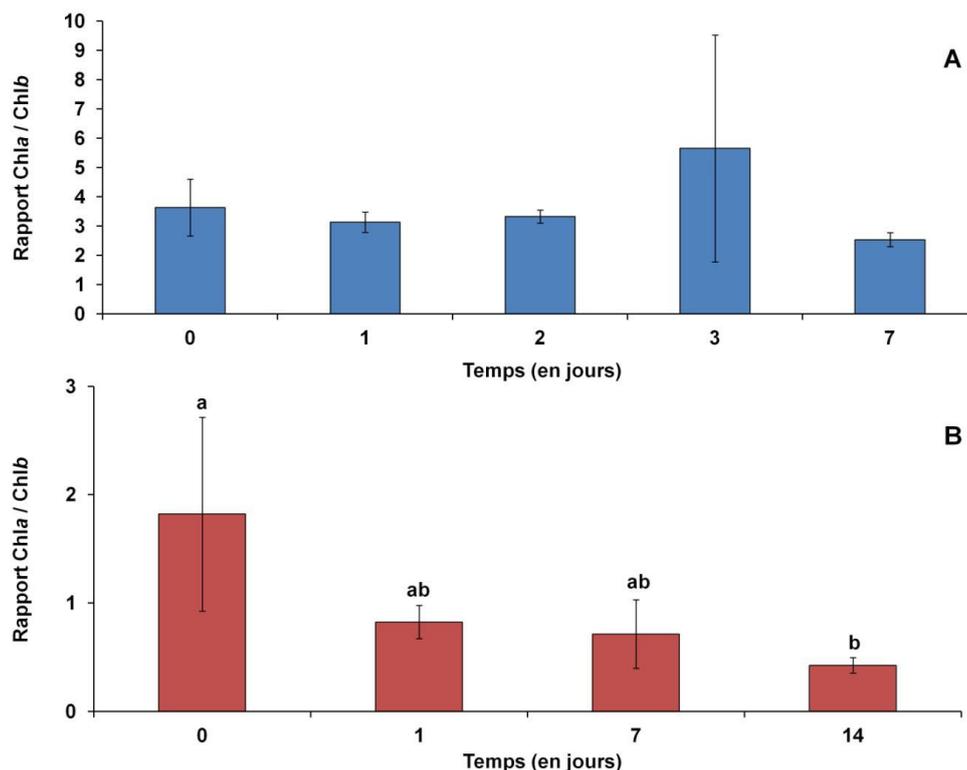


Figure III.2-4 : Suivi dans le temps des rapports Chla / Chlb chez *C. minutissima*. A : conditions de culture « optimales ». B : conditions de culture « grottes ». Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types (n = 3). Des lettres différentes indiquent une différence significative en fonction du jour de mesure à $p < 0,05$ (test de Friedmanmc pour échantillons appariés).

III.2.1.3. Conclusion et remarques

L'ensemble des résultats obtenus au cours des diverses expériences décrites précédemment nous a permis de mettre en évidence certaines adaptations physiologiques de *C. minutissima* en fonction des conditions de culture que nous avons adoptées au laboratoire.

Premièrement, nous avons vu que la disponibilité en lumière semblait réguler la vitesse de croissance de *C. minutissima* et provoque également des changements au niveau pigmentaire pour faciliter le captage des photons lumineux en faibles conditions d'éclairement. Le manque de nutriments est quant à lui considéré comme un facteur limitant puisqu'en conditions oligotrophiques l'épuisement de la population algale est atteint beaucoup plus rapidement qu'en condition nutritive optimale. Certains auteurs comme [Chen et al. \(2011\)](#) ont montré chez l'espèce *Dunaliella tertiolecta* (microalgue verte marine) qu'une diminution des teneurs en fer, cobalt, magnésium et molybdène (que l'on retrouve dans la composition du BG11) entraînait une diminution de la croissance algale.

Les concentrations en éléments minéraux adoptées dans la modalité « BG11 0,01x » se

rapprochent de celles mesurées dans les eaux et les sols de la grotte des Moidons. Cependant, les concentrations utilisées ne reflètent pas directement la biodisponibilité des nutriments utilisés par les algues proliférant dans la grotte. En effet, comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, les algues prolifèrent sous la forme de biofilms constitués de multiples organismes facilitant ainsi l'accès aux ressources nutritives (Caneva *et al.*, 2008 ; Berdoulay, 2008). De plus, bien que les quantités en nutriments mesurées dans la grotte restent faibles, il y a malgré cela un renouvellement constant de ces nutriments par les échanges avec l'extérieur (eaux d'infiltration...). Les algues cultivées au laboratoire sont maintenues dans des erlenmeyers fermés ce qui conduit à un épuisement total des nutriments bout d'un certain nombre de jour. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'adopter les conditions de culture « grottes » mais avec une quantité optimale de nutriments (BG11 1x) pour la suite des expériences, ce qui nous permet de disposer d'une réserve de matériel biologique frais le plus longtemps possible.

III.2.2. Analyses à l'échelle cellulaire de l'effet de doses / durées croissantes d'UV-C chez *C. minutissima*

III.2.2.1. Conditions expérimentales

Dans cette partie nous analyserons l'effet du rayonnement UV-C sur trois paramètres : la viabilité cellulaire par estimation du nombre de cellules vivantes, l'activité métabolique par la mesure des échanges gazeux et le contenu pigmentaire par l'extraction et le dosage des pigments chlorophylliens (Chla et Chlb). Les algues sont cultivées en conditions « grottes » en milieu liquide (suspensions cellulaires) et sont soumises à différentes doses / durées d'exposition aux UV-C allant de 0 (échantillons témoins) à 8 h (ou 300 kJ m^{-2}) (3 lampes UV-C de 25 W à 25 cm ; puissance totale de 75 W ; environ $10,5 \text{ j m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Pour les différents traitements aux UV-C, 40 ml de suspension algale à 2×10^7 cellules ml^{-1} sont disposés dans des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre. Pendant toute la durée de l'exposition, les algues ne sont pas agitées afin de les laisser sédimenter au fond de la boîte et ainsi créer des couches multiples de cellules mimant la structure d'un biofilm. Les mesures et analyses sont effectuées directement après la fin de l'irradiation.

III.2.2.2. Résultats

La **Figure III.2-5** représente le nombre de cellules vivantes par millilitre en fonction de la dose / durée d'exposition aux UV-C. Aucun changement significatif du nombre de cellules vivantes n'est observé pour des doses allant de 0,1 à 50 kJ m⁻² (de 10 s jusqu'à 1 h et 30 min d'exposition). Après une dose d'UV-C reçue de 150 kJ m⁻², correspondant à 4 h d'exposition, une diminution significative de 35 % par rapport aux échantillons témoins a été observée ($p = 0,0244$). Cet effet est plus important encore après une exposition de 8 h (300 kJ m⁻²) avec cette fois une diminution significative du nombre de cellules vivantes proche de 70 % par rapport aux échantillons témoins ($p = 1 \times 10^{-5}$).

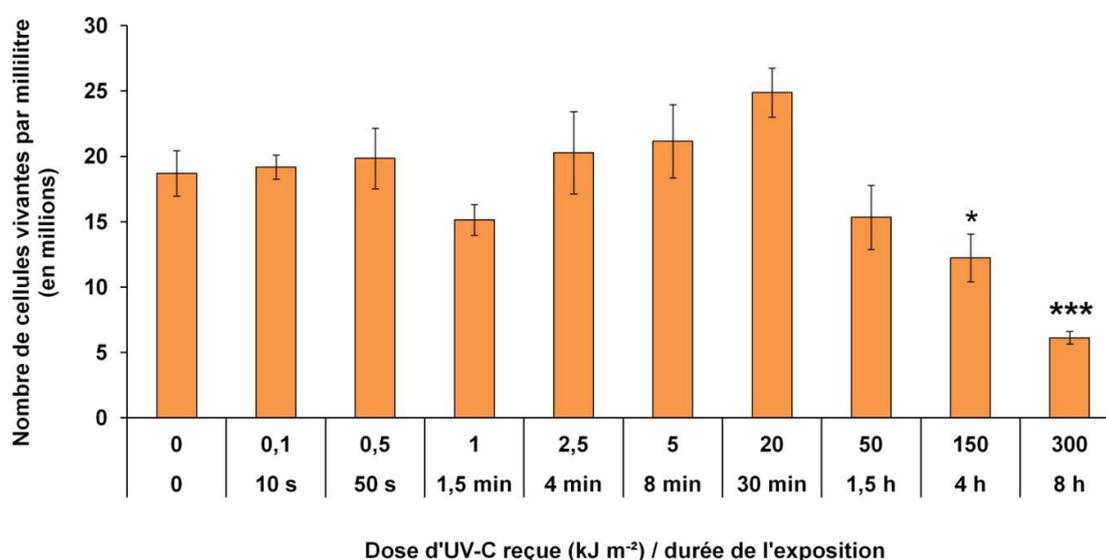


Figure III.2-5 : Nombre de cellules vivantes (en millions) chez *C. minutissima* exposée à des doses / durées croissantes d'exposition aux UV-C. Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$). Les étoiles représentent des différences significatives à $p < 0,05$ (*) et $p < 0.001$ (***) par rapport à l'échantillon témoin (test de Tukey HSD).

Le suivi des échanges gazeux (évolution des concentrations en oxygène) a été pratiqué sur les mêmes échantillons. Dans la **Figure III.2-6** sont présentées les données de la photosynthèse nette (variation entre photosynthèse brute et respiration) en fonction des doses / durées d'exposition aux UV-C. Des valeurs positives indiquent qu'il y a une augmentation de la concentration en O₂ dans le milieu réactionnel, ce qui est la marque d'une photosynthèse brute dominante sur l'activité respiratoire des algues. En revanche des valeurs négatives indiquent qu'il y a une diminution de la concentration en O₂ dans le milieu réactionnel, ce qui

est au contraire la marque d'une photosynthèse brute très diminuée et d'une prédominance de l'activité respiratoire.

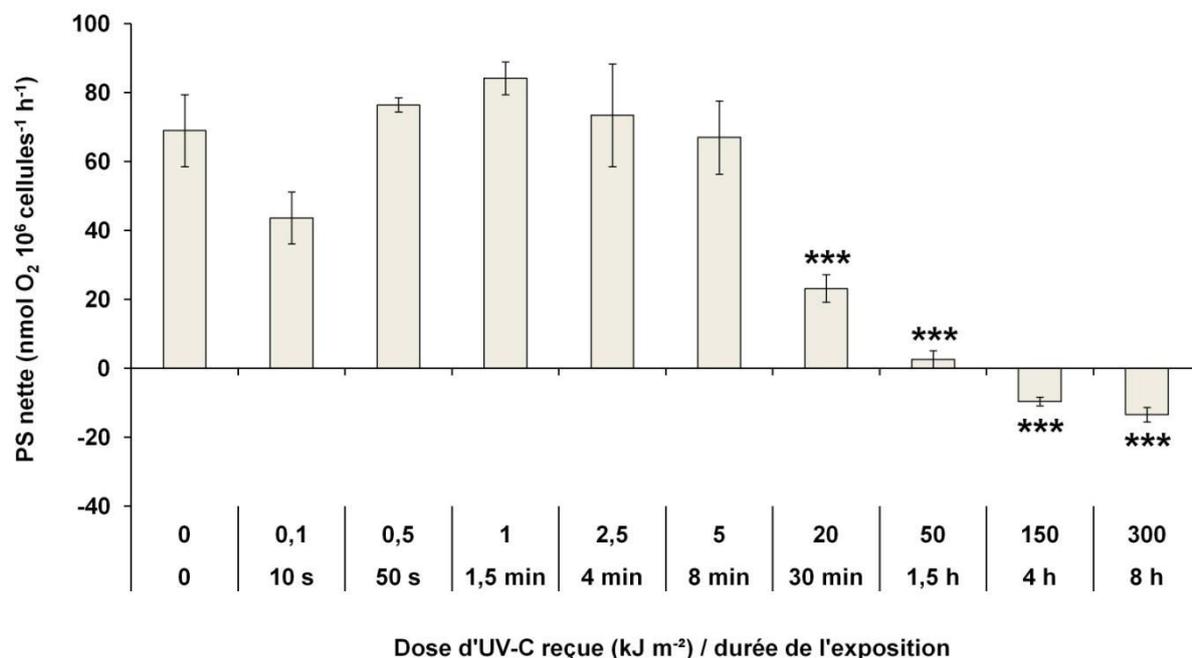


Figure III.2-6 : Mesure des échanges d’oxygène (nmol d’O₂ 10⁶ cellules⁻¹ h⁻¹) chez *C. minutissima* exposée à des durées / doses croissantes d’UV-C. Valeurs exprimées en moyennes ± écart-types (n=3). Les étoiles représentent des différences significatives à $p < 0,05$ (*) et $p < 0,001$ (***) par rapport au jour 0 (test de Tukey HSD).

Ces résultats montrent qu’à partir de 20 kJ m⁻², soit 30 min d’exposition aux UV-C, la photosynthèse nette des algues (23,22 ± 2,48 nmol O₂ 10⁶ cellules⁻¹ h⁻¹) est significativement diminuée de 66 % par rapport aux échantillons témoins (68,98 ± 10,47 nmol O₂ 10⁶ cellules⁻¹ h⁻¹) ($p = 2 \times 10^{-5}$). Ensuite, pour une dose de 50 kJ m⁻² (1 h et 30 min d’exposition), l’activité photosynthétique est presque totalement inhibée (96 % ; 2,65 ± 1,24 nmol O₂ 10⁶ cellules⁻¹ h⁻¹) ($p = 1 \times 10^{-7}$ par rapport aux témoins). Pour les doses maximales d’UV-C, c’est-à-dire 150 (4 h) et 300 kJ m⁻² (8 h), l’activité photosynthétique nette est totalement inhibée et on note une activité respiratoire prédominante chez les algues (-9,59 ± 2,11 pour 4 h et -13,43 ± 8,15 nmol O₂ 10⁶ cellules⁻¹ h⁻¹ pour 8 h). Ces mesures sont significativement différentes de celles effectuées sur les échantillons témoin ($p = 1 \times 10^{-7}$).

Les résultats des dosages des teneurs en Chla et Chlb en fonction des doses / durées croissantes d'UV-C sont présentés dans la **Figure III.2-7**.

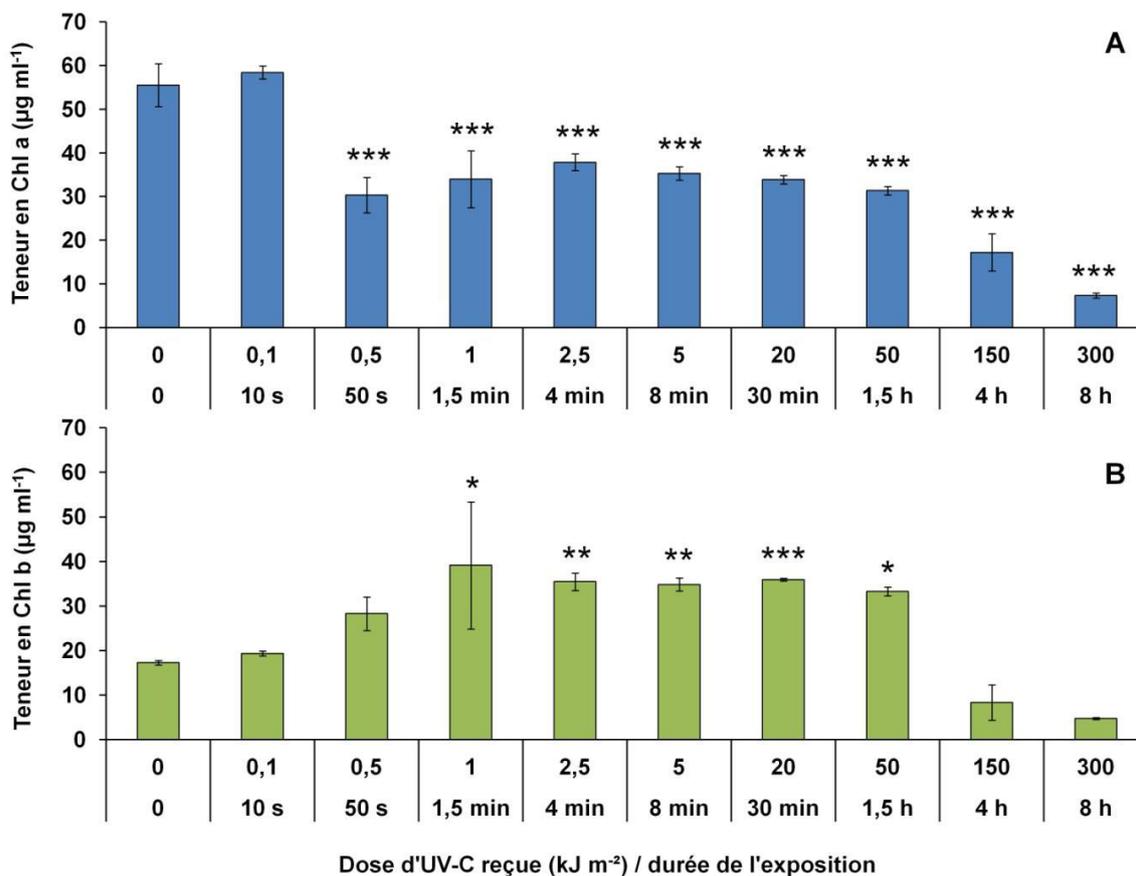


Figure III.2-7 : Teneurs en pigments chez *C. minutissima* exposée à des doses / durées croissantes d'exposition aux UV-C. A : teneurs en chlorophylle a (µg ml⁻¹). B : teneurs en chlorophylle b (µg ml⁻¹). Valeurs exprimées en moyennes ± écart-types (n=3). Les étoiles représentent des différences significatives à $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***) par rapport au jour 0 (test de Tukey HSD).

Les teneurs en Chla sont significativement diminuées ($p = 4 \times 10^{-7}$) après une dose d'UV-C de 0,5 kJ m⁻² (environ 50 s d'exposition ; diminution de 45 % par rapport aux témoins). Ensuite, jusqu'à une exposition de 50 kJ m⁻² (1 h 30 min), les teneurs en Chla sont toujours significativement différentes des échantillons témoins mais la diminution n'est pas accentuée par rapport aux mesures effectuées pour la dose de 0,5 kJ m⁻². On remarque cependant une diminution significative plus importante des teneurs en Chla pour les doses de 150 (4 h d'exposition ; diminution de 70 % ; $p = 1 \times 10^{-7}$) et 300 kJ m⁻² (8 h d'exposition ; diminution de 87 % ; $p = 1 \times 10^{-7}$). En ce qui concerne les teneurs en Chlb, les résultats sont sensiblement différents. En effet, après une exposition de 1 kJ m⁻² (1 min 30 s) et jusqu'à 50

kJ m^{-2} (1 h 30 min) d'UV-C, les teneurs en Chl b sont significativement supérieures à celles mesurées chez les échantillons témoins. On observe ensuite une diminution (non significative) respectivement de 32 et 52 % pour des doses de 150 et 300 kJ m^{-2} .

III.2.2.3. Discussion des résultats

Comme nous l'avons remarqué dans les résultats présentés dans le **Chapitre 1**, l'activité photosynthétique des cellules de *C. minutissima* a également été presque totalement inhibée (96 %) après une durée d'exposition de 1 h et 30 min (50 kJ m^{-2}). Bien que les suspensions cellulaires n'aient été volontairement pas agitées lors des traitements aux UV-C, cela suggère que le rayonnement UV-C a pu atteindre l'ensemble des cellules et, étant donné que les UV-C sont absorbés par toutes les biomolécules et structures cellulaires, les différents compartiments et composés cellulaires impliqués dans les réactions de la photosynthèse ont été sévèrement endommagés (Upadhyaya *et al.*, 2007 ; Kowalski, 2009 ; Zvezdanović *et al.*, 2009 ; Gill et Tuteja, 2010 ; Ma et Gao, 2010 ; Tao *et al.*, 2010 ; Ou *et al.*, 2012 ; Yin *et al.*, 2013). Comme le montrent les résultats des mesures des échanges gazeux, les algues sont cependant capables de maintenir une activité métabolique de base même après de fortes doses d'UV-C reçues (150 et 300 kJ m^{-2}) en mettant en place ce que l'on appelle une respiration de stress (Aguilera *et al.*, 1999).

En ce qui concerne les résultats de la viabilité, très peu de cellules mortes ont pu être observées sous microscope avec la méthode de coloration au Bleu de Trypan. La viabilité n'a été que partiellement diminuée avec les traitements les plus forts, à savoir 4 et 8 h d'exposition aux UV-C correspondant à 150 et 300 kJ m^{-2} (respectivement 35 et 70 % de diminution). Ces taux sont nettement inférieurs à ceux observés dans le **Chapitre 1** (viabilité < à 5 % après une dose d'environ 86,4 kJ m^{-2}). Cependant, il convient de rappeler que les matériels biologiques utilisés sont différents dans les deux types de manipulation (mélange de micro-algues dans le **Chapitre 1** et *C. minutissima* dans le **Chapitre 2**), ce qui pourrait en partie expliquer cette différence. Par ailleurs, la méthode de comptage au Bleu de Trypan utilisée ici n'a pas apporté pleinement satisfaction car il est possible que le colorant n'ait pas correctement pénétré dans les cellules pourtant mortes. La mortalité cellulaire de *C. minutissima* dans cette expérience a donc probablement été sous-estimée.

En ce qui concerne l'effet du rayonnement UV-C sur le contenu pigmentaire des cellules de *C. minutissima*, nous n'avons pas observé, même à des doses d'irradiation

comparables, d'augmentation des teneurs en Chla comme cela avait été le cas dans le **Chapitre 1** sur un mélange d'espèces. C'est au contraire, une diminution significative qui a été observée et ce dès de faibles doses d'UV-C (à partir de $0,5 \text{ kJ m}^{-2}$). Ce résultat semble indiquer une absence d'inhibition des enzymes impliquées dans la voie de dégradation des chlorophylles chez cet organisme. En ce qui concerne les teneurs en Chlb, une augmentation de la concentration a été mise en évidence à partir de 1 kJ m^{-2} . La dégradation de la Chla accompagnée d'une augmentation de la concentration en Chlb observées chez *C. minutissima*, laissent supposer un dysfonctionnement des premières étapes de la voie de dégradation des chlorophylles au niveau des enzymes responsables de la dégradation de la Chlb en Chla.

III.2.2.4. Conclusion et remarques

L'étude de l'effet de doses / durées d'exposition aux UV-C a été dans cette partie – comme dans le Chapitre 1 – effectuée directement après la fin de l'irradiation. Ceci nous a permis d'analyser les effets immédiats des UV-C chez *C. minutissima* et ainsi de mettre en avant un ou plusieurs traitements efficaces en termes d'éradication des algues. Nous avons vu que cette efficacité dépendait effectivement de la dose reçue et que les paramètres choisis pour estimer cette efficacité pouvaient se révéler plus ou moins performants. Ainsi, l'activité photosynthétique est très diminuée avec de faibles doses d'UV-C, alors que le contenu pigmentaire au contraire n'est pas aussi affecté même après de fortes doses. Comme nous l'avons mentionné dans le **Chapitre 1**, la dégradation des chlorophylles après traitement aux UV-C est sans doute aussi conditionnée par le facteur temps. Ces résultats n'ont pas permis de vérifier si on observait une dégradation graduelle des chlorophylles au cours du temps. Dans la prochaine étude, nous avons donc décidé de sélectionner les durées de 4 et 8 h (fortes doses), afin d'étudier leurs effets chez *C. minutissima* au cours du temps (sur une période de 21 jours). En plus des mesures de l'activité métabolique et du dosage des chlorophylles et des caroténoïdes, nous avons également cherché à détecter une éventuelle induction du stress oxydatif (mesure des concentrations en H_2O_2) et à mettre en évidence certaines voies de mort cellulaire programmée (comme la fragmentation de l'ADN par exemple).

III.2.3. Dommages cellulaires et moléculaires observés chez *Chlorella minutissima* exposée à de fortes doses d'UV-C (Article 2)

Le titre de l'article est : "Cellular and molecular damage caused by high UV-C irradiation of the cave-harvested green alga *Chlorella minutissima*: implications for cave management" et les auteurs sont Fabien BORDERIE, Laurence ALAOUI-SEHMER, Faisal BOUSTA, Badr ALAOUI-SOSSÉ et Lotfi ALEYA.



Cellular and molecular damage caused by high UV-C irradiation of the cave-harvested green alga *Chlorella minutissima*: Implications for cave management



Fabien Borderie^a, Laurence Alaoui-Sehmer^a, Faisal Boust^b, Badr Alaoui-Sossé^a, Lotfi Aleya^{a,*}

^a Laboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249, Université de Franche-Comté, 16 route de Gray, F-25030 Besançon, France
^b Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques, USR 3224, 29 rue de Paris, F-77420 Champs-sur-Marne, France

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 21 March 2014
 Received in revised form 30 April 2014
 Accepted 18 May 2014
 Available online

Keywords:
 Algae
 Caves
 Conservation
 UV-C irradiation
 Bleaching effect
 DNA damage

ABSTRACT

Algal biofilms in caves visited by tourists are a significant threat to karstic formations. They cause a dirty greenish appearance on cave formations and provoke biophysical and biochemical erosion. Seeking an alternative to the use of chemicals, we investigated the effects of high doses of UV-C irradiation on the green alga *Chlorella minutissima*-dominating biofilms in the Moidons Cave (Jura, France). The algae were harvested and subjected to laboratory subculturing under conditions similar to the conditions in the cave (low temperatures and a short photoperiod with weak light intensities). After one or two doses of UV-C of 150 or 300 kJ m⁻², the samples were incubated for 21 days, and the physiological parameters (pigment concentrations and photosynthetic activity) were monitored every seven days. Hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA) concentrations were also measured to detect oxidative stress, and analyses of DNA integrity were performed. The results showed that all UV-C treatments caused chlorophyll bleaching with completely inhibited metabolic activity. In addition, high UV-C doses caused oxidative stress and programmed cell death. Irradiation was tested on a natural biofilm that proliferated in the Moidons Cave. Colorimetric measurements of the treated biofilm indicated that UV-C treatment caused significant chlorophyll bleaching.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Highlights

- Algal biofilms in caves are a major problem for managers.
- Use of chemicals must be replaced by more environmentally friendly processes.
- UV-C doses were investigated in laboratory on *Chlorella* harvested in Moidons Cave.
- Results show irreversible cellular and molecular damages.
- UV-C was then tested on a cave's biofilm and showed a strongly bleaching effect.

Graphical abstract

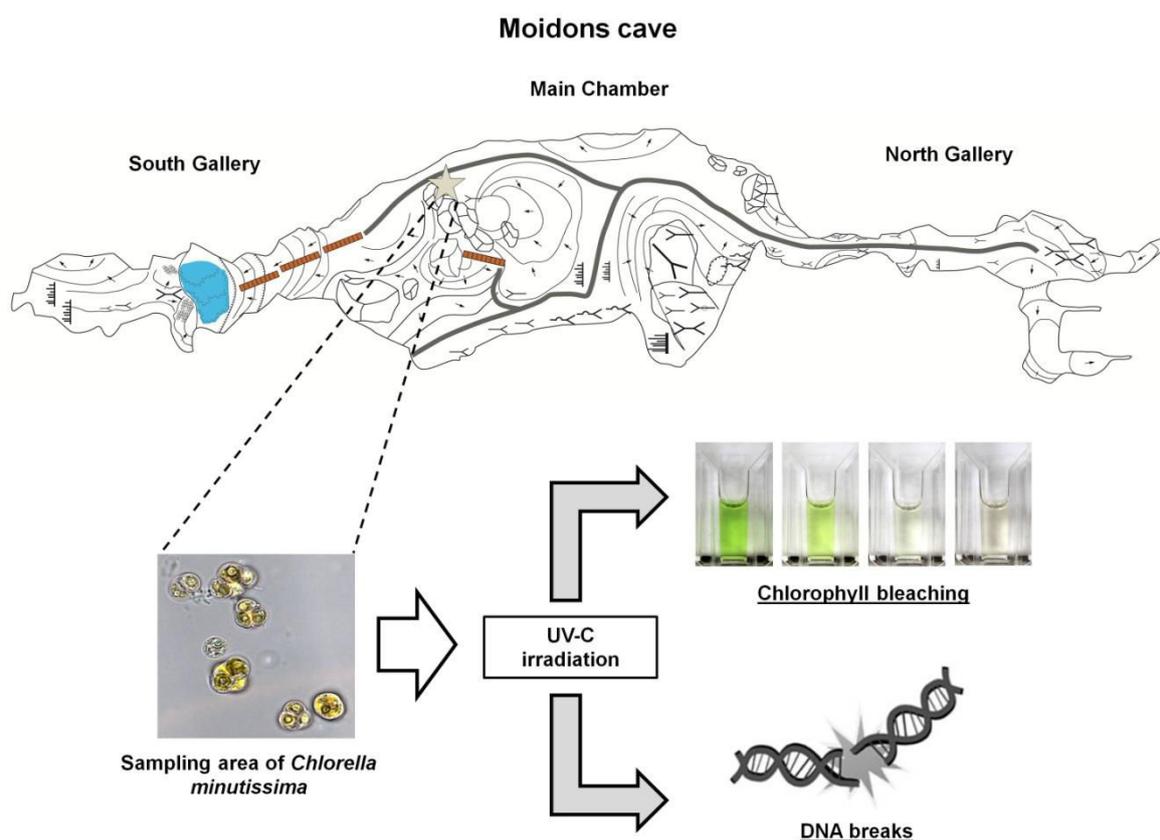


Figure III.2-8: Graphical abstract.

Abstract

Algal biofilms in caves visited by tourists are a significant threat to karstic formations. They cause a dirty greenish appearance on cave formations and provoke biophysical and biochemical erosion. Seeking an alternative to the use of chemicals, we investigated the effects of high doses of UV-C irradiation on the green algae *Chlorella minutissima*-dominating biofilms in the Moidons Cave (Jura, France). The algae were harvested and subjected to laboratory subculturing under conditions similar to the conditions in the cave (low temperatures and a short photoperiod with weak light intensities). After one or two doses of UV-C of 150 or 300 kJ m⁻², the samples were incubated for 21 days, and the physiological parameters (pigment concentrations and photosynthetic activity) were monitored every seven days. Hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA) concentrations were also measured to detect oxidative stress, and analyses of DNA integrity were performed. The results showed that all UV-C treatments caused chlorophyll bleaching with completely inhibited metabolic activity. In addition, high UV-C doses caused oxidative stress and programmed cell death. Irradiation was tested on a natural biofilm that proliferated in the Moidons Cave. Colorimetric measurements of the treated biofilm indicated that UV-C treatment caused significant chlorophyll bleaching.

Keywords: Algae; caves; conservation; UV-C irradiation; bleaching effect; DNA damage.

III.2.3.1. Introduction

For decades, numerous authors have investigated microalgal and cyanobacterial proliferation and its devastating effects on fisheries, aquaculture and recreational activities in many freshwater and coastal ecosystems (Aleya *et al.*, 1994; Halpern *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2012). However, subterranean environments such as caves, in which the soil and walls may be subject to degradation due to algal biofilm proliferation, are not well understood. Caves are fragile ecosystems that are characterized by stable microclimates and darkness (Groth *et al.*, 1999; Simon, 2012). The opening of a cave for tourist visits requires the installation of artificial light to enable the visibility of cave formations. These significant structural modifications and the presence of visitors, who may introduce algal spores and cells, have disturbed the dynamic balance of preexisting factors. These circumstances apply to Moidons Cave (Jura, France), which was discovered in 1966 and has been opened to the public for 6 months of the year since 1989. Moidons Cave is well known for their variety of cave formations, such as stalagmites, stalactites, draperies, pillars and ponds. Over time, soil and cave formations have become greenish due to biofilm formation from the presence of chlorophyll, which is caused by the proliferation of the pioneer unicellular green alga *Chlorella minutissima* (Fott and Nováková). This proliferation has caused progressive biodeterioration of cave formations due to biochemical and/or biophysical erosion (Warscheid and Braams, 2000; Scheerer *et al.*, 2009).

Similar biodeterioration was observed in the world-famous Lascaux Cave (Dordogne, France), which was closed to the public in 1963 due to algal proliferation that threatened the integrity of unique and renowned 17,000-year-old prehistoric paintings. The opening of the site to the public in 1943 and the large numbers of tourists, who visited the caves for a period of 20 years, have caused the massive development of the unicellular green alga *Bracteacoccus* sp. (Lefèvre, 1974). Both *Bracteacoccus* sp. and *C. minutissima* may have originated from the exterior via visitors, air fluxes or specific arthropod species (Jurado *et al.*, 2008). These algal strains can acclimate to low light and conditions with a sufficient supply of carbon dioxide (Jurado *et al.*, 2008; Aleya *et al.*, 2011).

To protect and conserve heritage materials, two types of chemical treatments are currently being explored: the first type of treatment involves preventive treatments that consist of the application of well-known water-repellent products, which are used in the

restoration of historical monuments, to stone surfaces (Moreau *et al.*, 2008); the second type of treatment involves curative treatments, which are used in caves to treat areas contaminated by algae. However, curative treatments, which include algaecides, herbicides and other biocides that are directly applied by spraying the contaminated area, are environmentally hostile processes because these chemical solutions may seep into the surrounding area, infiltrate the karstic web and contaminate the groundwater. Consequently, the use of chemical treatments has been heavily criticized; as a result, European regulations require that chemical treatments be replaced by new environmentally friendly processes.

The use of UV irradiation is a suitable alternative to chemical treatments. Three categories of UV irradiation are defined by their wavelengths: UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) and UV-C (200-280 nm). The latter is considered to be the most harmful to living organisms due to its short wavelength; it produces highly energetic photons and exhibits germicidal properties. These characteristics are sufficient not only for disinfecting surfaces or surgical tools (Menetrez *et al.*, 2010) but also for application prior to the conventional treatment of wastewater to eliminate hydrocarbons (Shirayama *et al.*, 2001). UV irradiation—primarily UV-B and UV-C—is also known to induce intracellular accumulation of harmful reactive oxygen species (ROS), which are known to attack and degrade most biomolecules, particularly lipid membranes, proteins and DNA (Ma and Gao, 2010), and may also hinder photosynthesis (Janknegt *et al.*, 2007). The accumulation of ROS, particularly hydrogen peroxide (H₂O₂), is now assumed to be a signal for programmed cell death (PCD) in photosynthetic organisms (Gadjev *et al.*, 2008).

Although many studies have indicated the effect of UV-C irradiation on plants (Najeeb *et al.*, 2011) and both freshwater and marine microalgae and cyanobacteria (Moharikar *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2010; Ou *et al.*, 2012). The use of UV-C in cave environments has been suggested by several studies (Grobbelaar, 2000; Mulec and Kosi, 2009) but not extensively investigated. The only available studies are our previously published studies (Borderie *et al.*, 2011, 2014), in which we analyzed and monitored the effect of UV-C irradiation on several green algal strains in laboratory and *in-situ* conditions.

Because *C. minutissima* is the dominant taxon that covers the formations in the Moidons Cave, we isolated a single clone of this common planktonic freshwater alga in defined laboratory conditions and investigated the immediate and long-term effects of two

extreme doses of UV-C irradiation (150 and 300 kJ m⁻²) on its photosynthetic activity, pigment concentrations, lipid peroxidation, hydrogen peroxide concentrations and DNA integrity for a period of 21 days. To test the applicability and efficiency of UV-C treatment on a natural green biofilm that is growing in the cave, we conducted colorimetric measurements to highlight the bleaching effect of UV-C irradiation for a period of 12 consecutive months and proposed precautions and considerations for UV-C treatments in *in-situ* conditions.

III.2.3.2. Materials and methods

III.2.3.2.1. *Study Site*

The Moidons Cave is situated in the town of Molain (department of Jura, France) in the Moidons State Forest (05° 48' 21.5'' E and 46° 50' 20.7'' N) (**Figure III.2-9**). Composed of Jurassic limestone with a maximum depth and approximate length of 30 m and 250 m, respectively, the cave contains three sections: the Main Chamber, which is situated in the center, the North Gallery and the South Gallery. A small subterranean stream flows through the cave and emerges at the cirque of *Fer à Cheval* near the town of Arbois. The surface above the cave is covered by a rich brown soil, in which a mixture of deciduous (pedunculate and sessile oak and common beech) and coniferous (silver fir) trees grow. **Table III.2-1** summarizes the main physico-chemical characteristics of the site. The temperature was monitored in September 2012 with HOBO Data Loggers (U12-012 Onset Computer Corporation). The 'Comité Départemental de Spéléologie du Jura' (CDSJ) provided CO₂ rates recorded in percentages, that were measured in the cave from July 2009 to July 2012 (values in **Table III.2-1** correspond to the mean of 19 mesures from different periods of the year). An analysis of minerals in the water samples was performed with an inductively coupled plasma optical emission spectrophotometer (ICP OES, radial method, iCAP 6000 series, Thermo Scientific) and compared with a certified material reference (ERM[®] CA011A, LGC Promochem). The samples were collected in October 2012. The samples from the Main Chamber and the North Gallery correspond to infiltration of the waters, and the samples from the South Gallery were collected in a karstic trap.

Table III.2-1: Physico-chemical characteristics of the Moidons Caves according to the location.

Location	Temperature (°C)	CO ₂ rate (%)	Minerals in water (mmol L ⁻¹)				
			Ca	K	Na	P	Mg
North Gallery	9.96 ± 0.85	0.29 ± 0.21 (W-S)	2.26 ± 0.27	<0.01	0.030 ± 0.003	<0.01	0.034 ± 0.001
		1.16 ± 0.23 (S-F)					
Main Chamber	10.31 ± 0.94	0.2 ± 0.2 (W-S)	2.12 ± 1.35	<LD	0.022 ± 0.001	<0.01	0.030 ± 0.000
		1.14 ± 0.23 (S-F)					
South Gallery	8.83 ± 0.73	0.34 ± 0.34(W-S)	2.38 ± 0.61	<0.01	0.025 ± 0.001	<LD	0.036 ± 0.001
		1.22 ± 0.16 (S-F)					

Main Chamber, North and South Gallery are localized in the **Figure III.2-9**. Temperature values are means ± S.D. of one month recording. W-S: CO₂ recording performed in Winter-Spring period (means ± S.D., n=7); S-F: CO₂ recording performed in Summer-Fall period (means ± S.D., n=12). Ca: calcium; K: potassium; Na: sodium; P: phosphorus; Mg: magnesium; data are expressed in mmol L⁻¹ (means ± S.D., n=3). < LD: under detection limit.

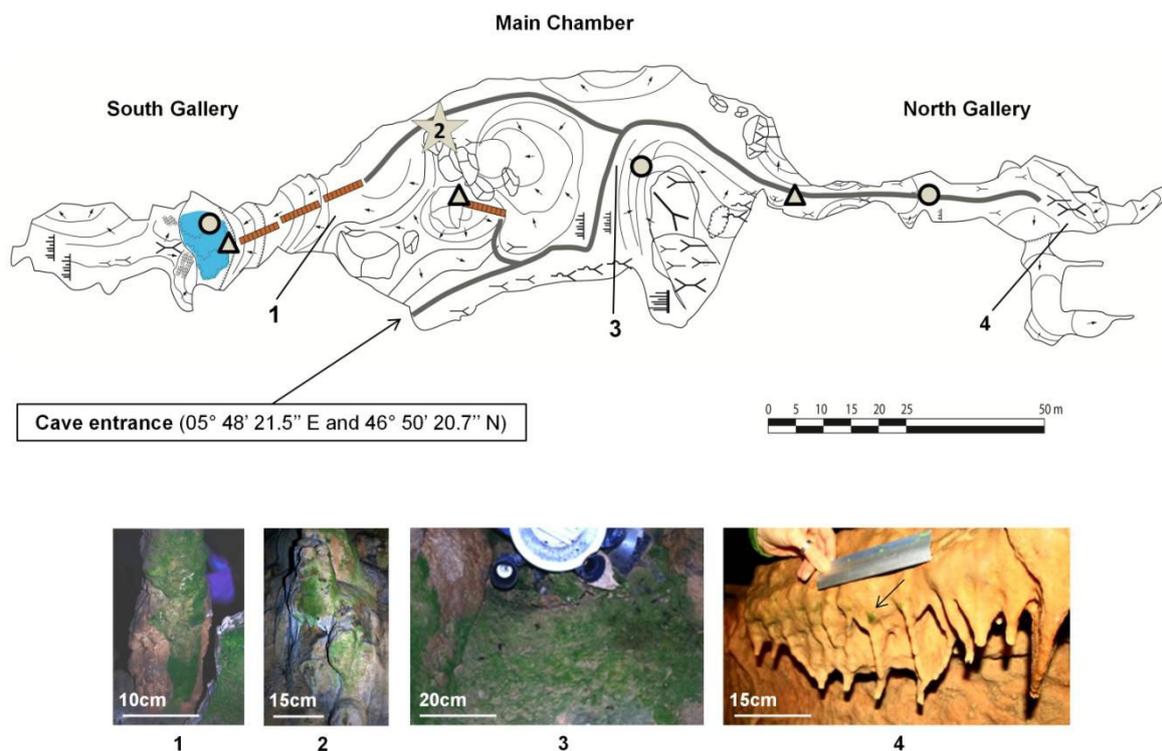


Figure III.2-9 : Section and plan of the Moidons Cave (Jura, France). The star represents the sampling location of *Chlorella minutissima*. The circles and triangles represent water sampling and CO₂ measurements, respectively. The numbers correspond to the pictures below the map: 1) green biofilm on stalagmite (South Gallery), 2) green biofilm on limestone formation (Main Chamber), 3) green biofilm on clay soil (Main Chamber) and 4) green spots on draperies (North Gallery).

III.2.3.2.1. *Harvesting, identification and culturing conditions of C. minutissima*

In 2011, algal cells were harvested using a sterile swab from a green biofilm that developed on a limestone formation in the Main Chamber (**Figure III.2-9**, picture 2). The light intensity in this zone, which is located 3 m from the light source, was $0.9 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Microscopic observation and identification using the identification key of [John *et al.* \(2002\)](#) revealed that, according to the cell size range of < 2 to approximately $3 \mu\text{m}$, the samples were primarily composed of *Chlorella minutissima* (Fott and Nováková). Few cells of *Bracteacoccus* sp. and *Scenedesmus* sp. have also been observed in the sample. After identification, the algal cells were inoculated in a sterile culture medium (BG11 freshwater solution, C3061, SIGMA). After several months of culture, weekly microscopic observations were performed; *C. minutissima* appeared predominant over time, and the *Bracteacoccus* and *Scenedesmus* genera completely disappeared.

A stock culture of algal suspension was developed in a culture chamber in a 6 h-18 h light/dark cycle at 10 ± 1 °C with $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 90 % relative humidity in a BG11 medium (cyanobacteria BG11 freshwater solution, C3061, SIGMA. Because the light intensity in the cave's harvest zone— $0.9 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ —was impossible to obtain in the culture chamber, we selected $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, which corresponded to a light intensity that was situated 20-30 cm from the same light source. To maintain healthy cultures, regular transplantation into fresh BG11 medium was performed every 15 days. Prior to the experiments, subcultures that were grown in the same culture conditions instead of stock cultures were maintained in an exponential-growth phase by counting cells using a microscope and manual counter. After algal suspensions of 2×10^7 cells ml^{-1} were attained, the algal cells were dark-adapted for 24 hours prior to the beginning of the experiments.

III.2.3.2.2. *UV-C treatments*

Exposures were performed with a UV-C Box (**Figure III.2-10**) that contained three UV-C lamps (Philips, 25 watts each = 75 W, λ max = 254 nm). To limit the thermal effects, such as vaporization of the culture medium, the box was placed inside the culture chamber when a temperature of 10 °C was attained. The temperature during UV-C exposure did not exceed 15 °C (even for long exposures), which we consider to be a zero thermal impact. For UV-C treatments, algal suspensions were used when they achieved exponential growth after 15 days of culture and contained approximately 2×10^7 cells ml^{-1} . Triplicates of 40 ml were placed in Petri dishes without lids at a distance of 25 cm from the UV-C lamps. Two effective lengths of UV-C exposure were selected for this study: 4 hours (approximately 150 kJ m^{-2}) and 8 hours (approximately 300 kJ m^{-2}). Two sample groups were subjected to one UV-C exposure (1E4, one exposure of 4 hours and 1E8, one exposure of 8 hours). Two additional sample groups were subjected to two UV-C exposures (2E4—two exposures of 4 hours and 2E8—two exposures of 8 hours). The values were measured in kJ m^{-2} using a photo/radiometer (Delta OHM HD 2102.2), which was equipped with a UV-C probe. Each UV-C exposure was performed alternatively using switch-on (20 min) and switch-off periods (10 min) of the UV-C lamps.

Figure III.2-10 summarizes the experimental design of the UV-C treatments and the sampling strategy. After treatment, the algal suspensions were stored in the culture chamber for an incubation period of 21 days.

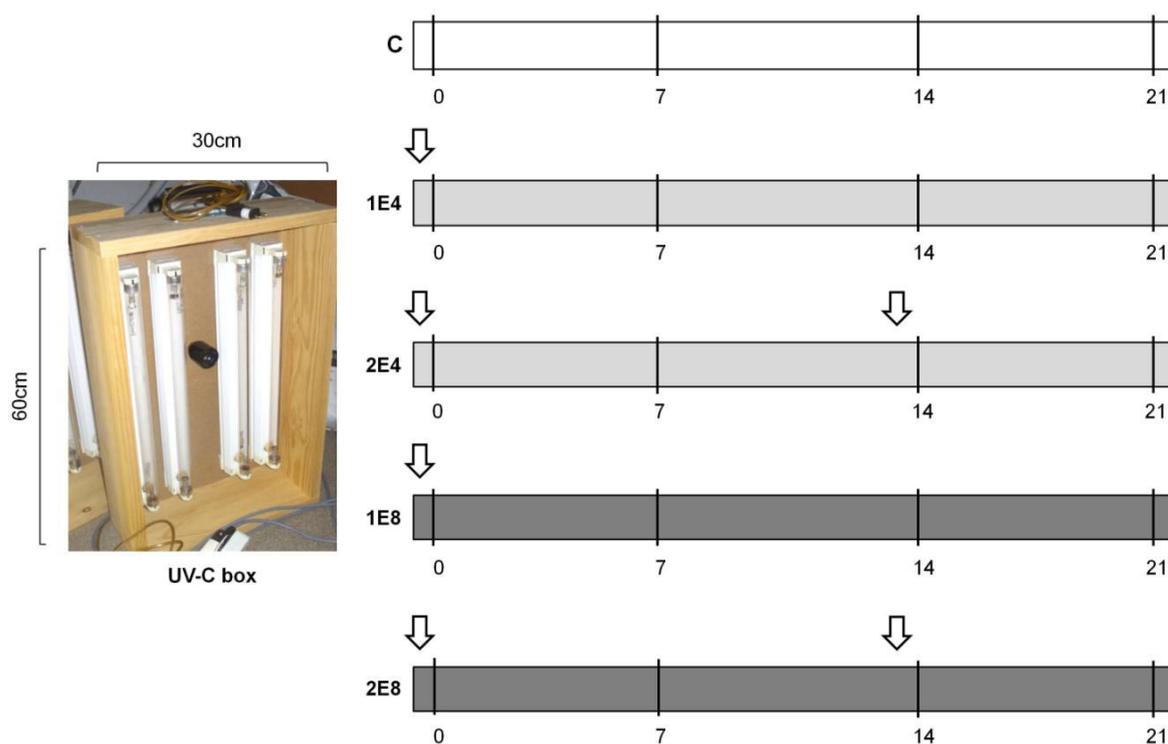


Figure III.2-10 : Experimental design of the UV-C treatments and the sampling strategy. C: control (without UV-C exposure); 1E4: one exposure of 4 h; 2E4: two exposures of 4 h; 1E8: one exposure of 8 h; and 2E8: two exposures of 8 h. The white arrows indicate UV-C exposures (prior to day 0 and prior to day 14). Triplicate measures ($n=3$) were performed every seven days on days 0, 7, 14 and 21.

III.2.3.2.3. *Proliferation monitoring using optical density*

Cellular abundance was investigated by serial measurements with an optical density of 750 nm (Aleya *et al.*, 2011) using a double beam UV/VIS spectrophotometer (Uvikon 923, Bio-Tek Instruments). Preliminary calibrations were performed on the algal culture; the results showed that measurements at 750 nm were directly proportional to the cell concentrations ($R^2 = 0.97$). For all control and treated samples, the optical density was measured at 0, 7, 14 and 21 days.

III.2.3.2.4. *Pigment extraction*

The extraction of photosynthetic (chlorophyll *a*, Chl*a* and chlorophyll *b*, Chl*b*) and accessory pigments (carotenoids, Car) was performed with 100 % methanol. Four ml of algal suspension was centrifuged at 4000 g for 10 min, and the pellet was re-suspended with 1 ml of methanol. After 30 min of incubation in an ultrasonic bath (sweep mode at 50 W, Fisher

Scientific), the samples were centrifuged at 4000 g for 5 min and the optical density (OD) was recorded on the extract with a double beam UV/VIS spectrophotometer (Uvikon 923, Bio-Tek Instruments). To calculate the chlorophyll concentrations, we employed equations by [Devesa et al., \(2007\)](#).

$$\text{Chla } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 16.72 \times \text{OD}_{665.2} - 9.16 \times \text{OD}_{652.4}$$

$$\text{Chlb } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 34.09 \times \text{OD}_{652.4} - 15.28 \times \text{OD}_{665.2}$$

$$\text{Car } (\mu\text{g ml}^{-1}) = (1000 \times \text{OD}_{470} - 1.63 \times \text{Chla} - 104.96 \times \text{Chlb})/221$$

Using the same spectrophotometer, the absorption spectra from 300 to 700 nm were recorded for all samples.

III.2.3.2.5. *Oxygen exchanges recording*

Oxygen concentrations were determined at room temperature (25 °C) using a DW2/2 Electrode Chamber equipped with a S1 oxygen electrode disc (Hansatech Instruments). Two ml of each algal suspension were placed in the dark-adapted chamber for a few minutes. The samples were continuously stirred to prevent algal sedimentation. The respiration (R) was determined in the dark by the slope calculated in the linear part of the curve, whereas gross photosynthesis (PG) was expressed by the slope of the linear part of the curve obtained under light conditions. At 340 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, the light was provided by a CL 1500 ECO SCHOTT (150 W) cold source. Under light conditions, PG and R occur simultaneously. The variations between PG and R determine whether algal cells are in a photosynthetic (PG > R, positive values) or respiratory phase (PG < R, negative values) by calculation of the net photosynthesis (PN) using the following equation:

$$\text{PN } (\text{nmol O}_2 \text{ } 10^6 \text{ cells}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \text{PG} - \text{R}.$$

The slopes of the curves, which were automatically calculated using Hansatech Software, are expressed in $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$. Net photosynthesis was standardized in $\text{nmol O}_2 10^6 \text{ cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$ by cell counting prior to the oxygen measurements.

III.2.3.2.6. *Lipid peroxidation*

Lipid peroxidation was determined by detecting thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), particularly malondialdehyde (MDA). Protocol and calculation formulae have been adapted from the work of [Tian and Yu \(2009\)](#) with some modifications. Approximately 0.03 g of fresh weight (FW) was incubated in an ultrasonic bath for 20 min (sweep mode) with 1.5 ml 100 mM phosphate buffer + 0.2 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA). After rapid centrifugation to remove cellular debris, 1 ml of 0.5 % (w/v) thiobarbituric acid (TBA) + 20 % (w/v) TCA was added to 800 μl of the extract and the mixture was incubated for 30 min at 100 °C. The TBARS concentrations were determined by measuring the absorbance at 532 and 600 nm with a spectrophotometer, which were calculated with the following formula:

$$\text{Concentration of TBARS } (\mu\text{mol g}^{-1} \text{ FW}) = (A_{532} - A_{600})/\mathcal{E}$$

where \mathcal{E} is the extinction coefficient of MDA ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

III.2.3.2.7. *Determination of hydrogen peroxide concentration*

The hydrogen peroxide concentration (H_2O_2) was measured using the ferric oxidation-xylenol orange (Fe-XO) complex in the nanomolar range. The final protocol has been adapted from the studies of [Gay et al., \(1999\)](#) and [Cheeseman \(2006\)](#). Approximately 0.05 g of fresh weight was incubated in an ultrasonic bath for 20 min (sweep mode) with 1.5 ml 100 mM phosphate buffer + 0.2 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA). After centrifugation to remove cellular debris, 200 μl of Fe-XO (250 μM ammonium ferrous (II) sulfate, 100 μM sorbitol, 100 μM xylenol orange, 25 mM sulfuric acid and 5 ml ethanol adjusted to 10 ml with distilled H_2O) were added to 800 μl of the extract. After incubation for 40 min at room temperature, the H_2O_2 concentrations were determined according to a standard curve, which was established using a similar procedure by measuring absorbance at 560 nm. The results are also expressed in $\text{nmol g}^{-1} \text{ FW}$.

III.2.3.2.8. *Fluorescence microscopy*

500 μl of the algal suspension at 1×10^8 cells ml^{-1} , which were either exposed to 4 hours of UV-C or unexposed, were stained with 50 μl of DNA fluorescent marker (Hoechst 32258, Sigma Aldrich) and observed under a fluorescence microscope (Axio Imager M2p, ZEISS) with UV excitation using a DAPI shift-free filter (EX G 365, BS FT 395, EM BP 445/50) to observe cellular nuclei under blue light emission.

III.2.3.2.9. *Flow cytometry*

To detect programmed cell death (PCD), DNA fragmentation was measured with a flow cytometer (CXP Cytometer, Beckman Coulter) using a TUNEL kit (In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche). Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) is a method for detecting breaks in DNA strands (“nicks”) by labeling free 3’-OH termini by enzymatic reaction (Negoescu *et al.*, 1996). Prior to TUNEL labeling, 100 μl at 2×10^7 cells ml^{-1} , which were exposed and unexposed to UV-C, were fixed after the end of the treatment (day 0) with freshly prepared 4 % paraformaldehyde in PBS with pH 7.4. After thawing, the cells were washed with PBS and permeabilized with freshly prepared 0.1 % triton X-100 in 0.1 % sodium citrate and labeled with the TUNEL reaction mixture. The cells were washed with PBS to eliminate the TUNEL reaction mixture and subsequently analyzed with a flow cytometer (FL1 channel 488/525 nm, 20000 events at average speed, log mode). The results are expressed as the percentage of TUNEL-positive cells.

III.2.3.2.10. *Field experiments*

In October 2012, the UV-C treatment was tested on a biofilm located in the Main Chamber (picture 3 in **Figure III.2-9**). The treatment was administered using the UV-C box that was employed in the laboratory experiments, in which the biofilm receiving a dose of 300 kJ m^{-2} (as for treatment 1E8). During a period of twelve months, colorimetric and photographic monitoring were employed to assess the effect of UV-C irradiation.

Colorimetric measurements were obtained with a spectrophotometer (CM-600d KONICA MINOLTA, illuminant D65, SCI mode and 8 mm diameter target mask) and the CIELAB color system, which is organized with three axes that define a spherical coordinate system: L^* , a^* and b^* (Prieto *et al.*, 2004, 2010; Sanmartín *et al.*, 2010, 2011). The dark-light

scale (L^*) is associated with the lightness of the color and ranges from bottom (value: 0, black) to top (value: 100, white). The a^* and b^* scales are associated with changes in redness-greenness (positive a^* is red and negative a^* is green) and changes in yellowness-blueness (positive b^* is yellow and negative b^* is blue). Only a^* values were selected because they can reflect the presence of a green biofilm better than the L^* and b^* values. Twenty averaged measurements were obtained at the same location before (reference values noted REF) and after UV-C treatment (1 day) and after 6, 8, 10 and 12 months. Photographic monitoring was performed simultaneously.

III.2.3.2.11. *Statistical analyses*

Potential differences between the different treatment groups (control versus UV-C-treated) were analyzed using an ANOVA test and a pairwise comparison test (Tukey HSD) after verifying the normality (One-sample Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of the variances (Bartlett test of equality of variances).

Because the samples were paired and to highlight the differences between measurement periods for a given treatment, the Friedman test and multiple comparisons between days (Friedmanmc in the pgirmess library) were performed. The Friedman test was also performed on colorimetric measurements during the field experiments to assess the differences between measurement periods for a^* values.

All statistical analyses were performed with R.2.14 software ([R Development Core Team, 2011](#)) at a significant level of 0.05.

III.2.3.3. Results

III.2.3.3.1. *Chlorophyll concentration*

A gradual decrease in chlorophyll concentration, which is consistent with the UV-C dose and the post-irradiation period, was observed for the B-band (blue, 436 nm) and the Q-band (red, 665 nm) intensities compared with the absorbance in the control group (**Figure III.2-11**). At 436 nm, the control samples show a maximal absorbance of 3.66, whereas the treated samples show maximal absorbance values of 1.06, 0.57, 0.51 and 0.14 for curves 2, 3, 4 and 5, respectively. Similar results were observed at 665 nm with a maximal absorbance of

2.17 for the control samples and maximal absorbance values of 0.7, 0.37, 0.32 and 0.08 for curves 2, 3, 4 and 5, respectively. We noted that the maximal absorbance for curves (3) and (4) at 436 and 665 nm are similar. The UV-C dose received in treatment 1E4 (one exposure of 4 h; curve 4) is lower than the UV-C dose received in treatment 1E8 (one exposure of 8 h; curve 3); however, these doses were measured after a seven-day rest period. The comparison of these two curves indicates that the bleaching of chlorophylls does not stop after the end of irradiation. For treatment 1E8, low absorbance was recorded (0.14 and 0.08 at 436 and 665 nm, respectively) on day 7.

The kinetic plots of chlorophyll bleaching (**Figure III.2-12**) indicate that the control samples show a kinetic accumulation (slope at 0.0169) of total chlorophyll concentration due to algal growth throughout the 21 days. A significant increase ($p < 0.05$) in total chlorophyll concentration (**Table III.2-2**) was observed on day 21 ($117.72 \pm 12.87 \mu\text{g ml}^{-1}$) compared with day 0 ($55.03 \pm 1.89 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Conversely, kinetic reductions in total chlorophyll concentration were observed for all UV-C treatments during this experiment. Initially (day 0), two groups of treated samples are distinct: the samples treated for 4 hours (24.96 ± 0.60 and $25.59 \pm 5.10 \mu\text{g ml}^{-1}$) and the samples treated for 8 hours (12.31 ± 1.74 and $11.86 \pm 1.83 \mu\text{g ml}^{-1}$) (**Table III.2-2**). We observed significant decreases ($p < 0.05$) of 55 and 77 % for treatments 1E4 and 1E8, respectively, compared with the control samples. The UV-C dose of 300 kJ m^{-2} (1E8) produced greater chlorophyll bleaching, which increased over 7, 14 and 21 days, compared with the dose of 150 kJ m^{-2} directly after irradiation.

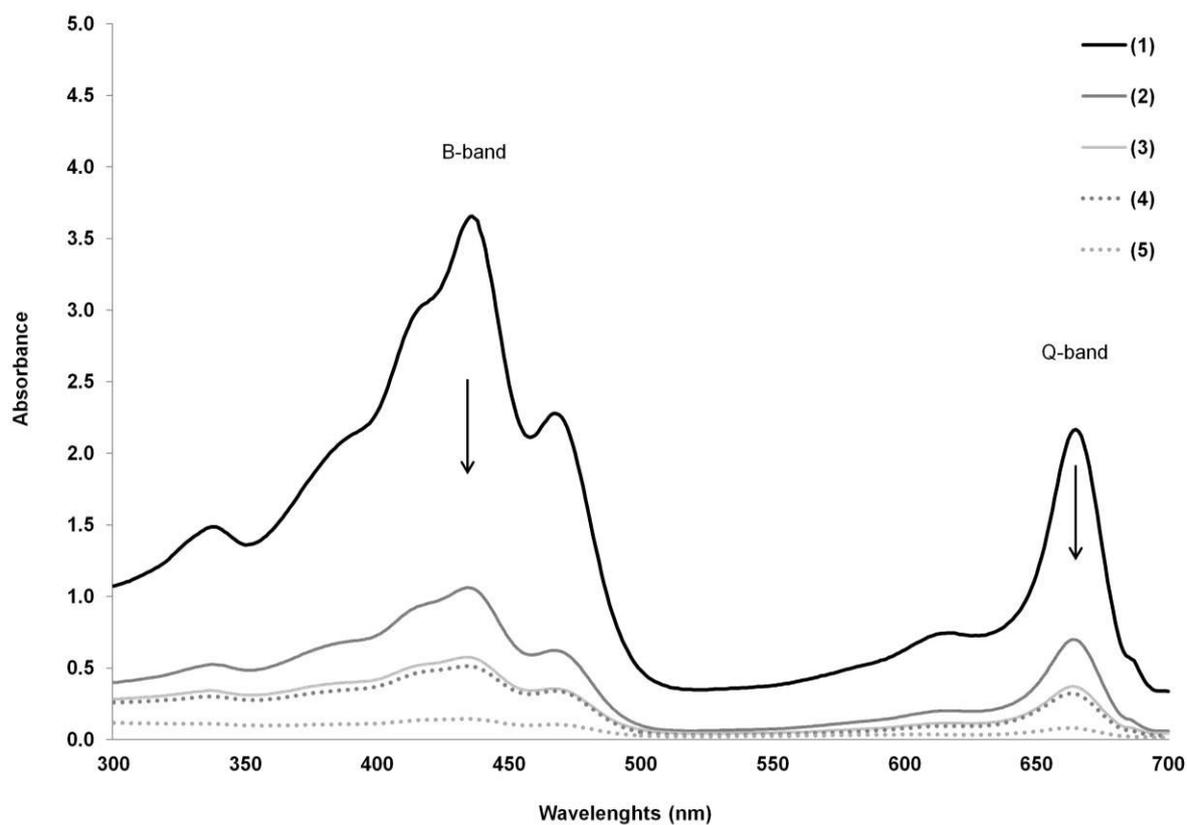


Figure III.2-11 : Absorption spectra of the pigment extracts. (1): control; (2): 1E4 on day 0; (3): 1E8 on day 0; (4): 1E4 on day 7 and (5): 1E8 on day 7. B-band: blue region and Q-band: red region. Black arrows indicate a decrease in absorbance, which is referred to as the “hypochromic effect”.

For all UV-C treatments, the total chlorophyll concentration decreased significantly after a seven-day rest period compared with the control that was performed on the same day. In addition, no significant differences were observed among the UV-C treatments. Compared with the control, reductions of 90 and 95 % were observed for 1E4 and 1E8, respectively.

Table III.2-2 : Total chlorophyll, carotenoid and oxygen exchanges according to the UV-C treatments and the time after each irradiation.

	UV-C treatments	Time after UV-C treatment (days)			
		0	7	14	21
Total chlorophylls ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	C	55.03 \pm 1.89 (a)	69.29 \pm 10.16 (a)	98.07 \pm 12.17 (a)	117.72 \pm 1287 (a)
	1E4	24.96 \pm 0.60 (b)	7.37 \pm 3.17 (b)	2.46 \pm 2.62 (b)	0.63 \pm 0.53 (b)
	1E8	12.31 \pm 1.74 (c)	3.42 \pm 0.60 (b)	0.71 \pm 0.49 (b)	0.46 \pm 0.37 (b)
	2E4	25.59 \pm 5.10 (b)	7.48 \pm 1.76 (b)	0.38 \pm 0.14 (b)	0.33 \pm 0.21 (b)
	2E8	11.86 \pm 1.83 (c)	1.53 \pm 0.57 (b)	0.24 \pm 0.27 (b)	1.66 \pm 0.13 (b)
	Carotenoid ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	C	<i>0.0005</i> \pm 0.0 (a)	<i>0.0005</i> \pm 0.0 (a)	<i>0.0005</i> \pm 0.0 (a)
1E4		<i>0.0005</i> \pm 0.0 (a)	0.08 \pm 0.04 (a)	0.32 \pm 0.23 (a)	0.45 \pm 0.23 (b)
1E8		<i>0.0005</i> \pm 0.0 (a)	0.05 \pm 0.17 (a)	0.17 \pm 0.1 (a)	0.21 \pm 0.1 (ab)
2E4		<i>0.0005</i> \pm 0.0 (a)	0.1 \pm 0.1 (a)	0.03 \pm 0.02 (a)	0.07 \pm 0.08 (ab)
2E8		<i>0.0005</i> \pm 0.0 (a)	0.09 \pm 0.08 (a)	0.07 \pm 0.08 (a)	0.23 \pm 0.24 (ab)
Oxygen exchanges ($\text{nmol O}_2 10^6 \text{ cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$)		C	54.91 \pm 4.71 (a)	45.50 \pm 3.87 (a)	46.08 \pm 7.52 (a)
	1E4	-9.59 \pm 2.11 (b)	-1.46 \pm 0.62 (b)	-3.58 \pm 1.63 (b)	0.81 \pm 1.36 (b)
	1E8	-13.43 \pm 8.15 (b)	-2.63 \pm 3.16 (b)	-0.52 \pm 0.55 (b)	1.73 \pm 2.74 (b)
	2E4	-10.50 \pm 1.67 (b)	-3.83 \pm 0.84 (b)	-3.64 \pm 4.01 (b)	-1.09 \pm 0.71 (b)
	2E8	-11.93 \pm 6.51 (b)	-0.56 \pm 2.56 (b)	0.16 \pm 0.73 (b)	2.28 \pm 1.10 (b)

Data are means \pm S.D. (n=3). Italic values (*0.0005*) correspond to half the detection limit of carotenoids ($0.001 \mu\text{g ml}^{-1}$). Bold types indicate significant differences at $p < 0.05$ compared to the measure performed at the day 0 for a given treatment (Friedman multiple comparison test for paired samples). Letters in brackets indicate significant differences at $p < 0.05$ between treatments for a given day (Tukey HSD after ANOVA test).

On day 21, a low chlorophyll concentration was recorded for all treatments (averaged values range from 0.33 ± 0.21 to $1.66 \pm 0.13 \mu\text{g ml}^{-1}$, **Table III.2-2**).

We observed that chlorophyll concentrations in treatments 1E4 and 1E8 (0.63 ± 0.53 and $0.46 \pm 0.37 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively) were significantly different from the measurements obtained on day 0, with a reduction of more than 95 %. Bleaching kinetics are more pronounced for 1E4 and 2E4 (two exposures of 4 h) (slope values of -0.0553 and -0.0669, respectively) compared with 1E8 and 2E8 (two exposures of 8 h) (slope values of -0.0474 and -0.0336, respectively) (inserted table in **Figure III.2-12**) because values for day 0 are higher for 1E4.

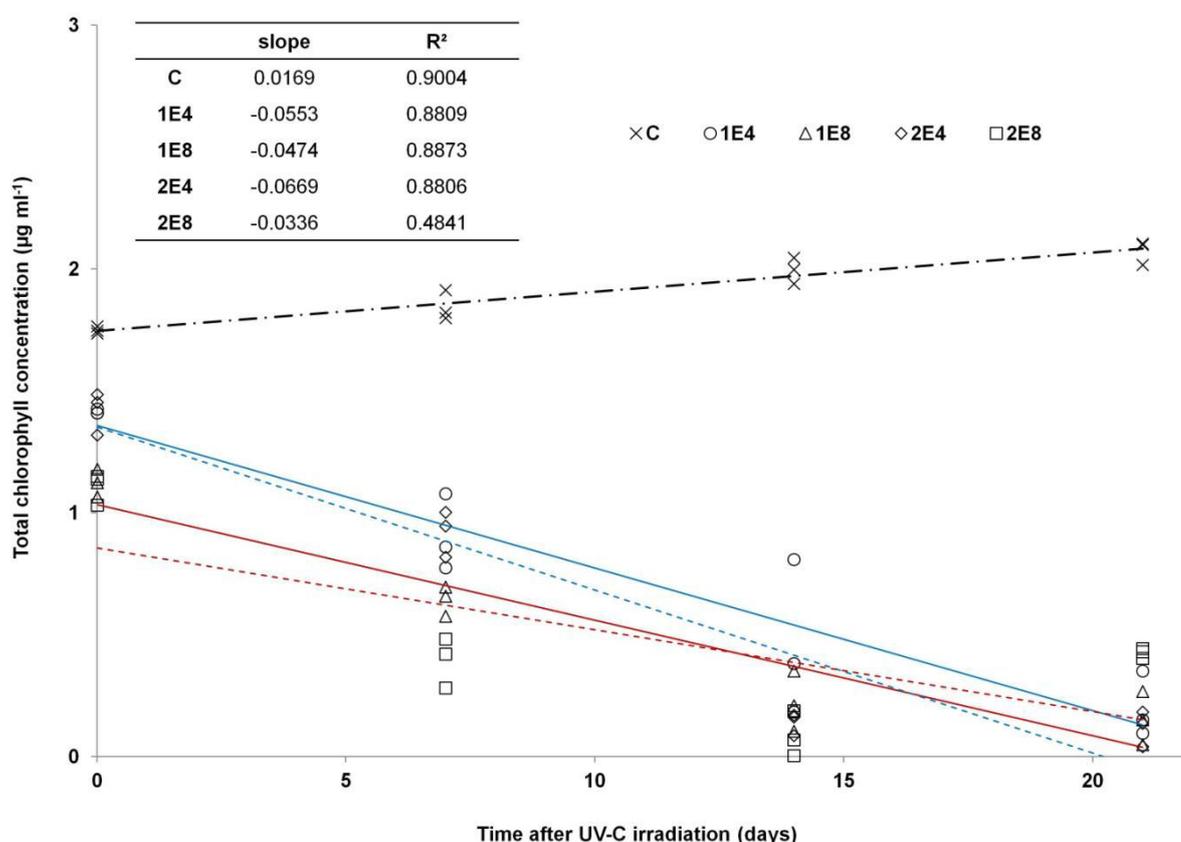


Figure III.2-12 : Kinetic plots of total chlorophyll bleaching according to time after UV-C irradiation. The values on the y-axis are log10-transformed + 1. The lines represent linear regressions for UV-C treatments (black line: C; continuous blue line: 1E4; dashed blue line: 2E4; continuous red line: 1E8; and dashed red line: 2E8). Triplicates have been used for each treatment. The table lists the slope and correlation coefficient R² for each linear regression.

Figure III.2-13 5 indicates that the photographs of the pigment extracts from the control samples show a gradual increase in green due to the concentration of total chlorophyll

during the experiment. The optical density measurements show cellular growth over the 21 days (graphs in **Figure III.2-13**). In addition, optical densities correlate positively and significantly to the total chlorophyll concentrations (adjusted $R^2 = 0.8514$, $p = 1.17 \times 10^{-5}$, data not shown). An increase in cell abundance produced an increase in chlorophyll concentration, as shown in the photographs in **Figure III.2-13**; a more pronounced greenish tint was observed for the control samples. However, when the samples were subjected to UV-C irradiation, a gradual disappearance of green was observed until day 21, when the chlorophylls were completely bleached. We also observed that the color intensity at the beginning of the experiment correlated to the UV-C dose. The fading green appearance was more distinct in treatment 1E8 than in treatment 1E4.

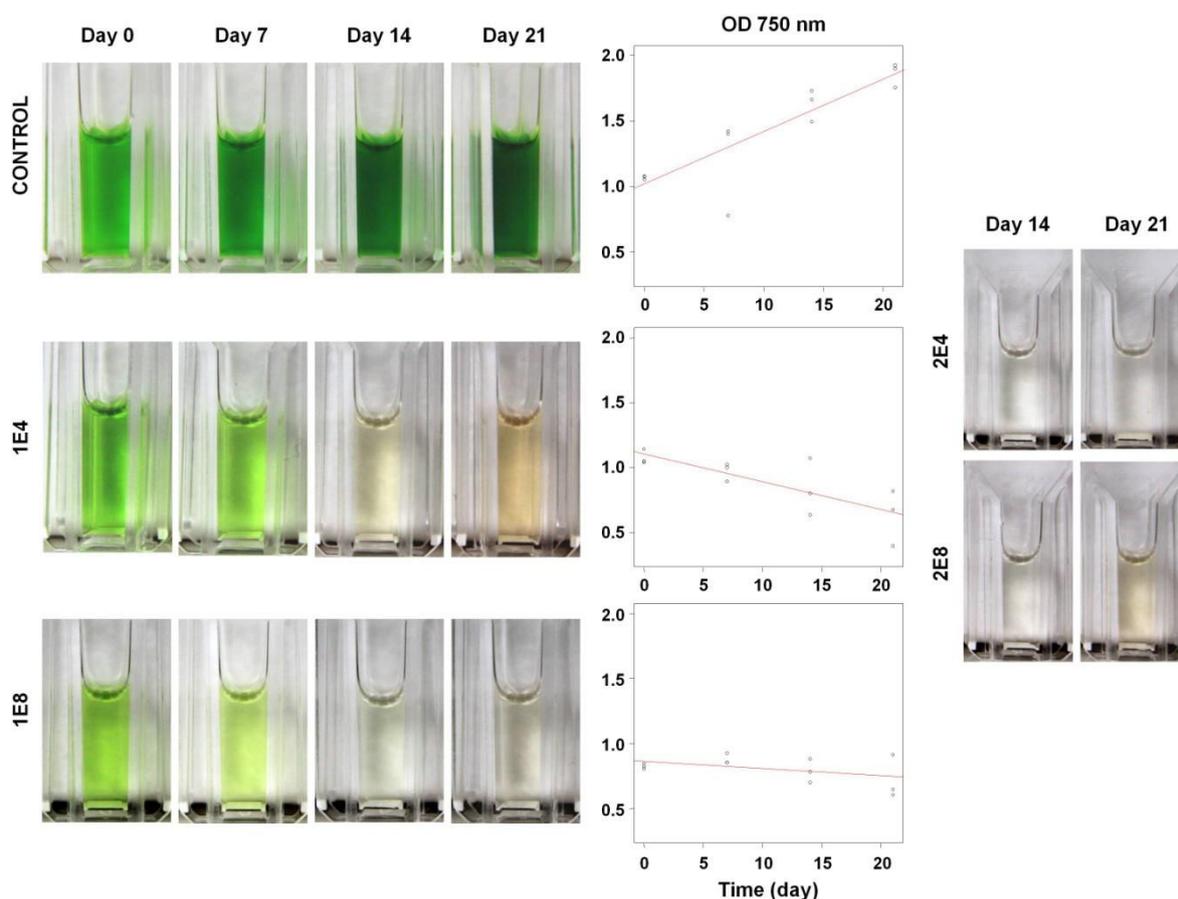


Figure III.2-13 : Photographs of pigment extracts in methanol with optical density measurements for control and UV-C treated samples according to time.

III.2.3.3.2. *Carotenoid concentration*

Carotenoid concentrations are summarized in **Table III.2-2**. No significant differences were detected in the treated samples over time, although a very weak accumulation ($0.45 \pm 0.23 \mu\text{g ml}^{-1}$) was observed in treatment 1E4 on day 21. This value was significantly different compared with 50 % of the detection limit ($p < 0.05$); however, it was not significantly different when compared with the measurements of the samples obtained on day 0. This weak accumulation of carotenoids in the 1E4-treated samples was illustrated by photographs of pigment extracts (**Figure III.2-13**). After 21 days of incubation, the samples subjected to one UV-C exposure of 4 hours (1E4) show an orange color due to the presence of carotenoids.

III.2.3.3.3. *Oxygen concentration monitoring*

Measurements of oxygen concentrations showed a significant reduction in the net photosynthesis of all UV-C treated samples compared with the control samples (**Figure III.2-14; Table III.2-2**). We observed that the control samples showed an increase in net photosynthetic activity with significant differences between day 0 ($54.91 \pm 4.71 \text{ nmol O}_2 10^6 \text{ cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and day 21 ($70.39 \pm 8.34 \text{ nmol O}_2 10^6 \text{ cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ($p < 0.05$). When the samples were exposed to one or two UV-C exposures, a significant reduction in the net photosynthesis was observed for all measuring periods compared with the control values. On day 0, negative values ($-9.59 \pm 2.11 \text{ nmol O}_2 10^6 \text{ cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for 1E4 and $-13.43 \pm 8.15 \text{ nmol O}_2 10^6 \text{ cells}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for 1E8) indicate O_2 consumption, which reflects the collapse of photosynthesis or increased respiration. Measurements performed on days 7, 14 and 21 show a trend to a nearly neutral O_2 concentration (values near zero). This result indicates a significant UV-C effect on the metabolic activity of exposed algal cells. No significant differences were observed among the different UV-C treatments for a given day.

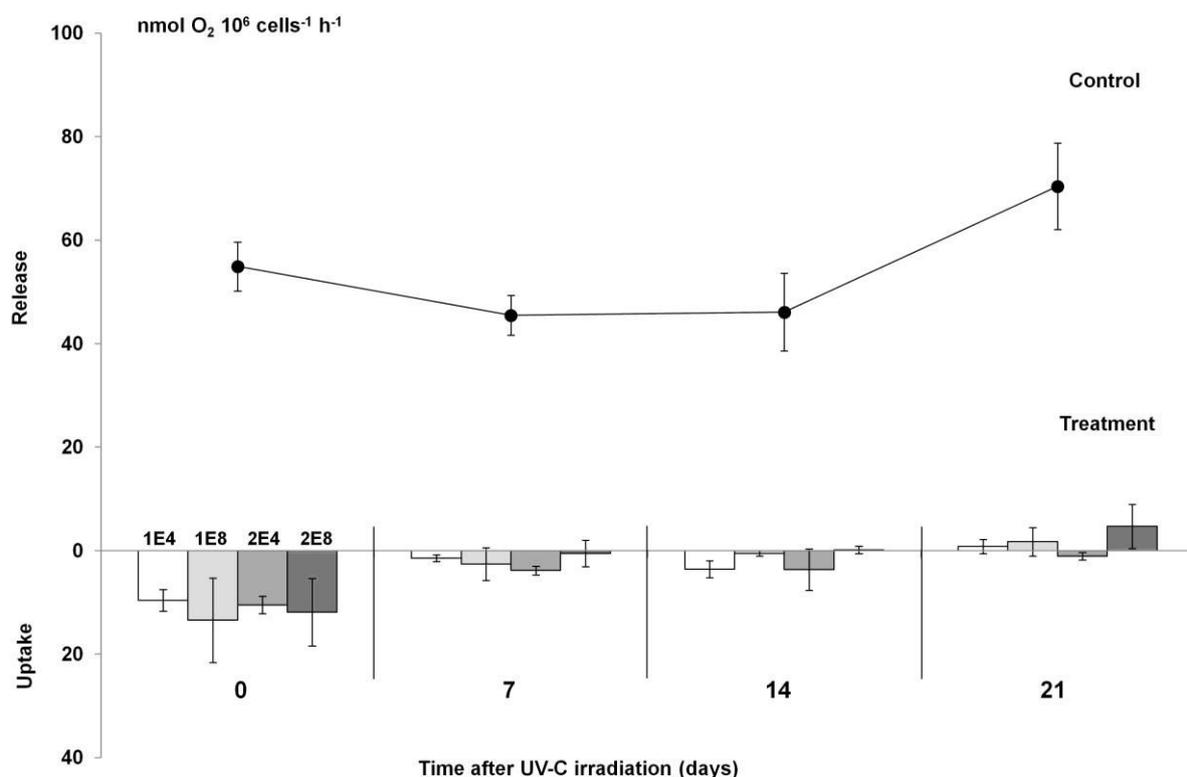


Figure III.2-14 : Oxygen exchanges according to time after UV-C irradiation (days). The black circles correspond to the control samples (mean \pm S.E., $n=3$). The bars represent UV-C treatments (mean \pm S.E., $n=3$, refer to legend for day 0). Values below zero correspond to respiration (O_2 uptake); values above zero correspond to photosynthesis (O_2 release).

III.2.3.3.4. *Hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) concentrations*

Table III.2-3 lists the results for hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) concentrations for treatments 1E4 and 1E8 (2E4 and 2E8 are not shown because the results are similar to the results for a single UV-C exposure). When the samples were not subjected to UV-C irradiation, the H_2O_2 concentrations were below the detection limit; however, the limit's halfway mark was used for statistical comparisons. After 4 hours of UV-C (1E4) treatment, we observed a significant accumulation ($p < 0.05$) of H_2O_2 on day 0 ($45.33 \pm 8.35 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FW}$) compared with the control samples ($0.05 \pm 0.0 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FW}$). Subsequent measurements did not show significant differences with the controls. Similar results were obtained when the samples were subjected to 8 hours of UV-C (1E8) with significant accumulations of H_2O_2 after 14 days of cultivation ($63.31 \pm 17.94 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FW}$).

Although the measurements obtained on day 21 showed no significant differences with measurements performed on day 0, the values significantly decreased for 1E8 treatment (106.06 ± 20.29 and 2.67 ± 1.00 nmol g⁻¹ FW for day 0 and day 21, respectively).

The assessment of MDA concentrations (**Table III.2-3**) indicates changes over time according to UV-C treatment. Weak concentrations of MDA were observed in the control samples (between 5.36 ± 0.51 and 1.44 ± 0.34 μmol g⁻¹ FW) and MDA accumulation ($p < 0.05$ compared to control) directly after UV-C irradiation in both 1E4 and 1E8 (29.38 ± 20.46 and 19.67 ± 0.99 μmol g⁻¹ FW, respectively). A gradual and significant decrease ($p < 0.05$ compared with day 0) was observed for 1E4 and 1E8 in measurements obtained on day 21.

III.2.3.3.1. *DNA integrity*

Figure III.2-15 shows the control and treated cells (1E4) observed using fluorescence microscopy (**Figure III.2-15 A**) and the flow cytometry results (**Figure III.2-15 B**) during different UV-C exposures. First, in the phase contrast **Figure III.2-15 A**) green viable cells were observed in the control samples, whereas cells subjected to one UV-C exposure of 4 hours were entirely bleached and devoid of the characteristic green color due to the presence of chlorophylls. When the same samples were subjected to a viability test (Trypan blue assay), all algal cells were dead and exhibited the characteristic blue color that reflects the degradation of biological membranes (data not shown).

Table III.2-3 : H₂O₂ and MDA concentrations for control and treated samples according to the UV-C treatments and the time after each irradiation.

UV-C treatments		Time after UV-C treatment (days)			
		0	7	14	21
H ₂ O ₂ (nmol g ⁻¹ FW)	C	<i>0.05 ± 0.0 (a)</i>	<i>0.05 ± 0.0 (a)</i>	<i>0.05 ± 0.0 (a)</i>	<i>0.05 ± 0.0 (a)</i>
	1E4	45.33 ± 8.35 (b)	84.19 ± 13.58 (b)	26.38 ± 24.05 (ab)	22.86 ± 10.52 (b)
	1E8	106.06 ± 20.29 (c)	96.29 ± 18.48 (b)	63.31 ± 17.94 (b)	2.67 ± 1.00 (a)
MDA (μmol g ⁻¹ FW)	C	3.39 ± 1.63 (a)	5.36 ± 0.51 (a)	2.99 ± 0.34 (a)	1.44 ± 0.34 (a)
	1E4	29.38 ± 20.46 (b)	6.28 ± 5.91 (a)	5.37 ± 0.99 (ab)	2.91 ± 1.9 (a)
	1E8	19.67 ± 0.99 (c)	5.74 ± 0.31 (a)	6.31 ± 1.12 (b)	1.42 ± 0.26 (a)

Data are mean ± S.D. (n=3). Italic values (0.05) are half the detection limit for H₂O₂ (0.1 nmol g⁻¹ FW). Bold types indicate significant differences ($p < 0.05$) compared to the measure performed at day 0 for a given treatment (Friedman multiple comparison test for paired samples). Letters in brackets indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments for a given day (Tukey HSD after ANOVA test).

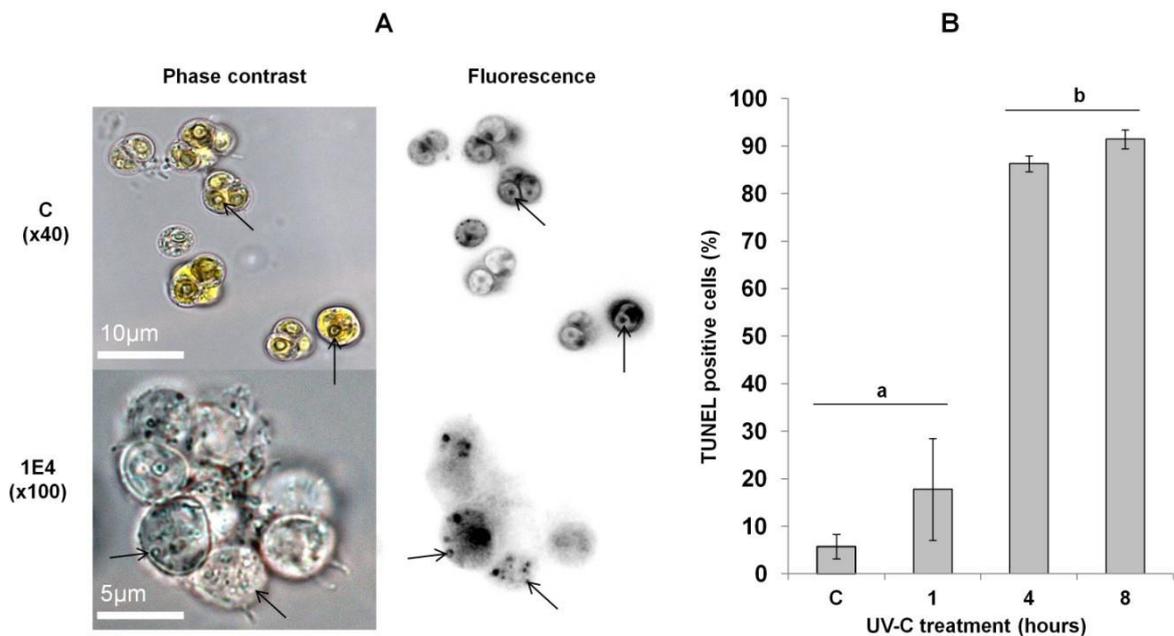


Figure III.2-15 : Fluorescence microscopy and flow cytometry analysis for both control and UV-C treated cells with different UV-C exposure times. Graph A: visualization of algal cells in phase contrast and DAPI filter after Hoechst staining. DAPI filter pictures are “black and white” and “invert” transformed with ImageJ software. The black arrows indicate normal nuclei in C and the presence of internucleosomal fragments in 1E4. Graph B: results after TUNEL staining and cytometry analysis. Different letters indicate significant differences at $p < 0.01$ with Tukey HSD after ANOVA test. Values are mean \pm S.E. (n=6).

After Hoechst staining, the samples were observed under UV excitation; in the control samples, *Chlorella* cells were intact with compact fluorescent nuclei (black arrows in control pictures). Conversely, when subjected to 4 (1E4 pictures) or 8 hours (data not shown) of UV-C exposure, *Chlorella* cells showed no visible nuclei. However, several fluorescent shapes that may be attributed to DNA fragments appeared; these shapes are known as internucleosomal fragments. TUNEL staining was performed on the same samples at the end of different UV-C exposure periods (1, 4 and 8 hours), as shown in **Figure III.2-15 B**. The control samples showed less than 10 % of TUNEL positive cells, and more than 80 % of TUNEL positive cells for samples that underwent 4 or 8 hours of UV-C treatment. No significant differences were observed between the control samples and the treated samples with 1 hour of UV-C. However, a significant increase in TUNEL positive cells was measured in the samples that were treated with 4 and 8 hours of UV-C.

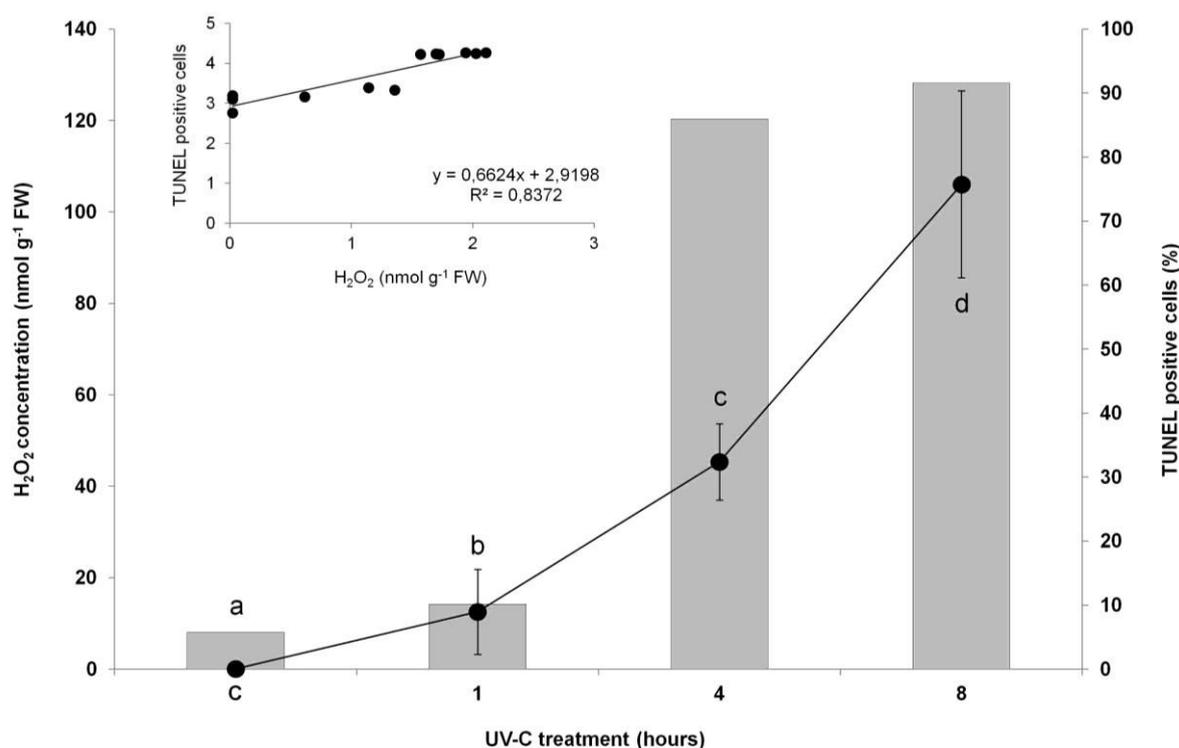


Figure III.2-16 : Relationships between oxidative stress and DNA breaks. The black circles represent the H₂O₂ concentration (left y-axis) and the grey bars represent TUNEL positive cells (right y-axis). Different letters indicate significant differences among treatments for H₂O₂ concentration (mean \pm S.E., n=3) ($p < 0.05$, Tukey HSD after ANOVA test). The inserted graph represents the linear relation between H₂O₂ concentrations and TUNEL positive cells (values are log₁₀+1 transformed).

Figure III.2-16 displays the combined results of H₂O₂ concentrations (nmol g⁻¹ FW) and TUNEL positive cells (%) for the control and treated samples with 1, 4 and 8 hours of UV-C. In **Figure III.2-15 B**, the TUNEL positive cells were significantly higher in the samples treated with 4 and 8 hours of UV-C compared with the control samples, and those treated with 1 hour of UV-C. The concentration of H₂O₂ was significantly higher in the treated samples (1, 4 and 8 hours) compared with the control. Although one hour of UV-C exposure induced a significant increase in H₂O₂, it did not result in a significant number of TUNEL positive cells compared with the control. Despite that, we observed a significant a positive correlation between the concentration of H₂O₂ and the TUNEL positive cells ($R^2 = 0.8372$) (**Figure III.2-16**).

III.2.3.3.2. *Bleaching effect on natural biofilm*

Figure 9 shows the bleaching effect on natural biofilm after UV-C irradiation through visual observations and colorimetric measurements. The treated area of the biofilm appeared bleached after exposure to one UV-C dose of 300 kJ m^{-2} (similar to treatment 1E8). One year after UV-C treatment, the bleaching effect remained, unlike to the bottom-right corner of the treated area where a re-colonization phenomenon was detected (white arrow in **Figure III.2-17 B**). These visual observations were confirmed by colorimetric measurements performed over time on the same biofilm. **Figure III.2-17 A** showed a^* values according to the period after UV-C treatment. Significant differences compared with the REF value, which suggest a significant bleaching effect, were detected 6 months after UV-C treatment.

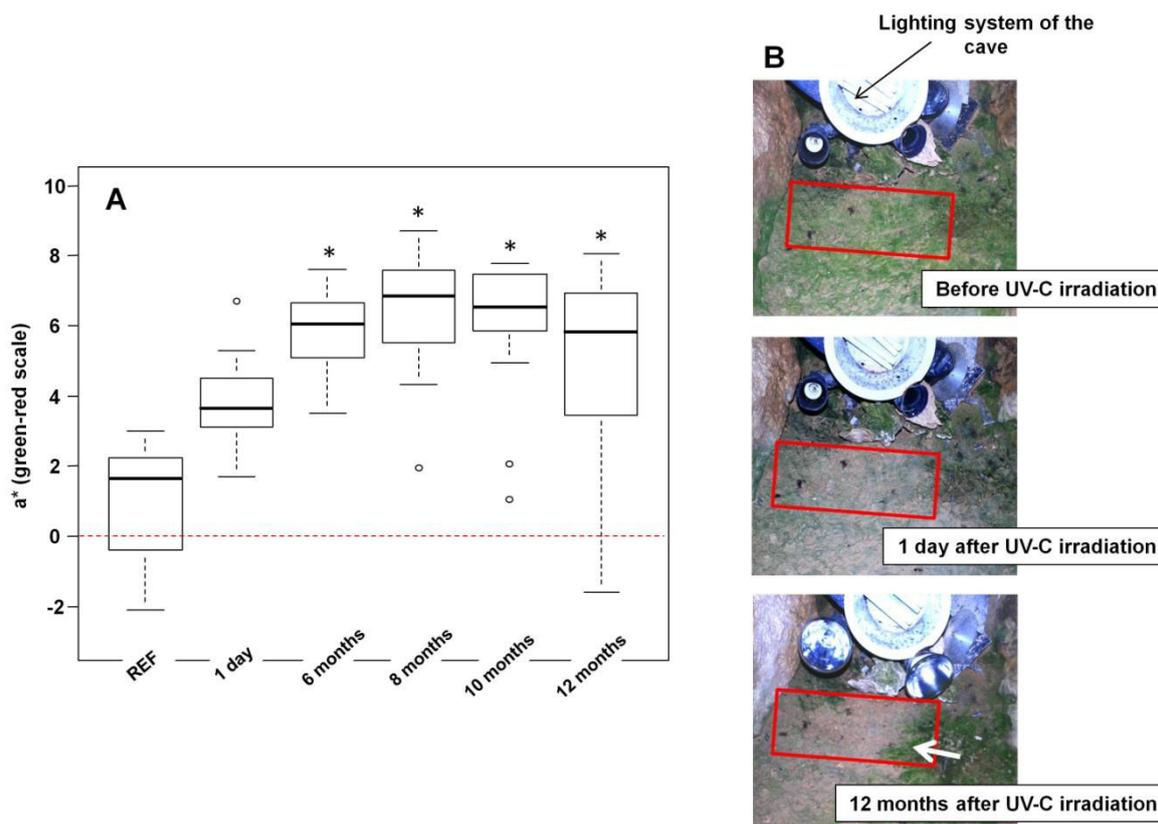


Figure III.2-17 : UV-C irradiation on a selected biofilm in the Moidons Cave. A: colorimetric measurement according to time after UV-C treatment. The dashed red line represents the limit between the red and green measurements (the positive a^* is red and the negative a^* is green). The stars indicate significant differences compared with the REF value (Friedmanmc test). B: photographic monitoring before and after treatment. The red squares represent treated and measured areas. The white arrow denotes the re-colonization phenomenon.

Subsequent measurements also differed compared with the REF value; however, some results indicated a re-greening phenomenon (negative values below the red line correspond to the measurement obtained on the bottom-right corner of the treated area) after 12 months, which confirmed the re-colonization observed during the photographic monitoring.

III.2.3.4. Discussion

III.2.3.4.1. ***General considerations concerning C. minutissima***

The objective of this study was to investigate the effects of high doses of UV-C irradiation on *C. minutissima*, which is proliferating in the Moidons Cave. The physico-chemical characteristics of the cave (**Table III.2-1**), i.e., i) sufficient CO₂ and ii) weakly mineralized water, enable *C. minutissima* to proliferate in this harsh habitat according to its picoplanktic size (Aleya *et al.*, 2011). In our laboratory culture conditions, proliferation monitoring of the control samples indicated that *C. minutissima* was also well adapted to weak available light and low temperatures.

In our culture chamber, we attempted to reproduce the natural growth conditions that prevail in the cave: low temperatures, high rates of humidity and the weak light intensities coincide with the visiting periods. For example, a temperature of 10 ± 1 °C was selected for the experiments, which approached the maximum temperature recorded in the Main Chamber (10.6 ± 0.2 °C). However, because the experiments were conducted in a liquid medium, the reaction of *Chlorella* to UV-C irradiation may differ from its reaction when it evolves within a natural biofilm that consists of a mixture of algae, cyanobacteria, fungus and bacteria. To reproduce the biofilm structure, we avoided agitation of the cells, which constituted several cellular layers. We also chose to work on the predominating algae *C. minutissima* because algal strains, particularly Chlorophyta, are typical pioneer species that colonize the biotope and subsequently cause biofilm formation (Gaylarde and Gaylarde, 2000; Mulec *et al.*, 2008). In addition, *C. minutissima*, with its chlorophylls and green color, is the principal contributor to the dirty appearance of the cave formations. An investigation of how to eliminate *Chlorella* from the caves may eliminate the inducing factor in biofilm formation.

III.2.3.4.2. UV-C effects on *C. minutissima* cells

The main objective of this investigation was to attain not only a high mortality of algal cells but also complete bleaching of the greenish appearance of the algal biofilm. We selected two UV-C exposure times (4 and 8 hours) that corresponded to high doses (150 and 300 kJ m⁻², respectively) because we had observed in preliminary results (unpublished data) that doses below 150 kJ m⁻² were insufficient for significantly reducing the chlorophyll pigments that are responsible for the green color.

When they were subjected to one or two UV-C exposures (4 hours or 8 hours), the *Chlorella* suspension showed different patterns of photosynthetic activity, total chlorophylls and carotenoids over time. Photosynthetic activity in all treated samples (**Figure III.2-14**) was totally inhibited immediately after irradiation (day 0). Concomitantly, a significant reduction in the absorption spectra of the pigment extracts (i.e., a hypochromic effect) and total chlorophyll concentration was observed (**Figure III.2-11** and **Figure III.2-12**, **Table III.2-2**).

The immediate damaging effects of UV-C irradiation on *C. minutissima* may be explained by two factors: 1) the high energetic photons of UV-C irradiation-impairing proteins such as D1, which is the core of photosystem II (PSII) and in which electron transfer and photolysis occur, and 2) enzymes such as RubisCO (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase), which is the key enzyme of carbon fixation during the Calvin cycle ([Ou et al., 2012](#)). Because UV-C irradiation can degrade thylakoid membranes ([Holzinger and Lütz, 2006](#)), chlorophylls *a* and *b* were deactivated. However, our treated *Chlorella* cells were able to maintain metabolic activity immediately after the end of UV-C irradiation (day 0), as shown by their O₂ uptake increase. This increased respiration in UV-stressed cells may be attributed to a higher demand for energy to maintain redox homeostasis between QA and QB of photosystem II, which was affected by UV-C irradiation, as shown by [Joshi et al. \(2011\)](#) on cluster bean chloroplasts that were subjected to UV-B irradiation. Regarding the proliferation pattern shown by optical density measurements, *Chlorella* suspensions were not capable of proliferation after UV-C treatment compared with the control suspension.

Carotenoids are known to serve a major role in the protection of photosynthetic organisms against photo-oxidative stress ([Stahl and Sies, 2003](#)). As previously mentioned, our results showed that the carotenoid concentration in treatment 1E4 on day 21 was significantly

different compared with 50 % of the detection limit but not significantly different compared with the measurements obtained for the same samples on day 0. These results suggest that the carotenoid concentration in 1E4 was the same at the beginning of the experiment but more visible and detectable (**Figure III.2-13** and **Table III.2-2**) than on day 21 due to chlorophyll degradation. With stronger treatments (1E8, 2E4 and 2E8), UV-C irradiation appears to bleach carotenoids and their associated orange tint. Our results for carotenoids and H₂O₂ concentrations do not suggest a direct relationship between these two compounds, and the reduction in H₂O₂ over time may be attributed to the photosensitive characteristic of this product.

The chlorophyll concentrations obtained immediately after UV-C irradiation (day 0) indicated that degradation was dose-dependent. However, after a cultivation period of 21 days and due to the severe bleaching of chlorophylls over time, no differences among treatments were observed, not even for the weakest treatment (1E4). The dose-dependent response may be attributed to the capacities of chlorophyll *a* and *b* to be absorbed in UV-exposed zones, which significantly impairs chlorophyll molecules (Zvezdanović *et al.*, 2009). Another explanation may be the excessive oxidative stress caused by UV-C irradiation, as shown in this study by the accumulation of reactive oxygen species (ROS) accumulation and hydrogen peroxide (H₂O₂). Several studies have demonstrated the negative effects of H₂O₂ on the primary reactions of photosynthesis, such as the electron transfer rate (Ma and Gao, 2010), chlorophyll and protein degradation (Upadhyaya *et al.*, 2007) and membrane lipid peroxidation (Gill and Tuteja, 2010).

UV-C treatments may cause cellular damage and open pathways that can lead to programmed cell death (PCD) (Danon and Gallois, 1998; Moharikar *et al.*, 2006). Moharikar *et al.* (2006) have shown that the PCD in the unicellular Chlorophyta *Chlamydomonas reinhardtii* was dependent on both the UV-C intensity (1-100 J m⁻²) and the post-UV-C exposure time with a high cell-death rate that occurs after 18 h post-UV-C dark incubation. In this study, we observed DNA fragmentation caused by high UV-C doses (150 and 300 kJ m⁻²) after UV-C irradiation (80-90 % of TUNEL positive cells and the presence of internucleosomal fragments, **Figure III.2-15**). Moharikar *et al.* (2006) indicate that DNA fragmentation was not a direct physical consequence of UV-C irradiation of the genetic material because the maximum effect was observed after 18 h post-UV-C dark incubation, whereas our study suggests that high UV-C doses directly induce DNA damage. Our

assumption may be supported by the study of [Ravanat et al. \(2001\)](#), in which they state that photochemical and photo-oxidation reactions within cellular DNA are efficient with UV-C irradiation because its wavelength is close to the absorption maximum of pyrimidine and purine nucleobases.

Conversely, our results showed a correlation between H₂O₂ concentration and TUNEL positive cells, which suggests an indirect pathway to induce DNA damage. The burst of hydrogen peroxide that serves an important role in PCD ([Gadjev et al., 2008](#)) is followed by the induction of metacaspases 8 (AtMC8), which are involved in ROS-induced PCD. Metacaspases are related to the caspases family, which is known to activate DNase enzymes ([Danon and Gallois, 1998](#)).

The ultimate question is as follows: are *Chlorella* cells capable of resisting UV-C irradiation? The synthesis of protective compounds such as carotenoids and mycosporine-like amino acids (MAAs) ([Adhikary and Sahu, 1998](#); [Karsten et al., 2007](#); [Lee and Shiu, 2009](#)) and DNA repair processes such as excision and photoreactivation ([Hollósy, 2002](#); [Karsten, 2008](#); [Baqué et al., 2013](#)) are well-known protective and repair mechanisms that induce UV resistance in microorganisms. For instance, [Adhikary and Sahu \(1998\)](#) showed that filaments of the terrestrial cyanobacteria *Tolypothrix byssoidea*, which are isolated from the rock surface of the Sun Temple (India), were resistant to 24 h of UV-C exposure (corresponds to a dose of 730 kJ m⁻²) due to their capability of synthesizing MAAs. Our preliminary results after the extraction and detection of MAAs by HPLC (high-performance liquid chromatography) in our samples of *C. minutissima* did not detect a peak of MAAs compared with other algal strains that we harvested on an external concrete surface (data not shown). [Baqué et al. \(2013\)](#) detected survivors in the endolithic desert cyanobacteria *Chroococcidiopsis* sp. after UV-C irradiation of 13 kJ m⁻². They suggested that this UV-C resistance may be attributed to carotenoid accumulation and DNA repair mechanisms in cells.

The results obtained in our study suggest that the cave-dwelling algae *C. minutissima* are not capable of protecting themselves under high UV-C doses by DNA repair mechanisms or synthesis of protective compounds. After irradiation, significant DNA damage was observed, and no samples were able to restart their activity, even after twenty days of re-inoculation in nutrient-replete cultivation conditions. Another concern is whether long-term UV-C treatments are capable of inducing mutations in the genome of algae and UV-C

resistance (Tyagi *et al.*, 1995). The analysis of genomes by random amplified polymorphic DNA (RAPD) can be performed on *C. minutissima* to detect genotoxic effects (Atienzar *et al.*, 2000).

III.2.3.4.3. *Performance of UV treatment*

Although several studies (Grobbelaar, 2000; Mulec and Kosi, 2009) have detailed the potential use of UV-C treatments to limit algae proliferation in show caves, we present valuable results of the effects of UV-C irradiation on a cave-dwelling biofilm. After UV-C irradiation of 300 kJ m⁻² (as for treatment 1E8), a treated biofilm appeared totally bleached, which suggests significant UV-C effects on the integrity of chlorophyll pigments (Figure III.2-17). Because the biofilm was thin, UV-C easily penetrated all cellular layers. The colonization dynamics in the cave, however, were not halted, as shown by the re-greening phenomenon, which suggests a re-colonization of the treated area 12 months after UV-C treatment.

These results are supported by our recently published study (Borderie *et al.*, 2014), in which we analyzed the environmental factors that influence algal colonization in the Moidons Cave. We showed that the Main Chamber of the cave is an active area in terms of algal colonization (high water circulation, high human presence and long illumination time). The treated biofilm is located in the more illuminated area of the cave (cumulative power of 740 W; refer to the lighting system in Fig. 9), which provides sufficient light for rapid and intensive colonization by phototrophic microorganisms. As discussed in section 4.1, Chlorophyta and *C. minutissima* in the Moidons Cave are considered pioneer species in the formation of phototrophic biofilm in caves. However, heterotrophic bacteria can take advantage of the release of cellular debris and nutrients after cell lysis caused by UV-C (Hannen and Gons, 1997) to promote algae incidence.

The application of UV-C treatments in real conditions requires specific precautions and considerations. To limit energy expenditures, a colonization diagnostic of the treated area must be performed to adopt the best UV-C exposure time. Colorimetric measurements are a suitable method to measure the intensity of the colonization by phototrophic microorganisms (Prieto *et al.*, 2005; Sanmartín *et al.*, 2010; Borderie *et al.*, 2014). During UV-C treatment in the Moidons Cave, we measured an increase of 5 °C compared with the initial value of 10 °C.

The humidity rate was stabilized at 80 %, which constitutes no adverse thermal effects (data not shown). Irradiation occurred at night during the closure of the site, and the UV-C box was hermetically sealed with black plastic to prevent UV-C dispersion around the treated area.

III.2.3.5. Conclusion

The use of UV-C irradiation to combat the proliferation of *Chlorella* is of significant interest because it may promote the development of cleaning processes for cave formations as an alternative to less environmentally friendly processes. The effect of UV-C irradiation can be direct (with all biomolecules and biological structures absorbing highly energetic photons of UV-C) or indirect (UV-C causing excessive oxidative stress with an overproduction of ROS-induced PCD and physiological impairment). Currently, it is difficult to determine whether direct or indirect effects are primarily responsible for the damage caused by UV-C. However, this study suggests that direct effects are primarily responsible due to the application of large doses of irradiation and their extremely energetic photons, which cause high photosensitization in cellular and molecular components.

UV-C treatment offers new environmentally friendly possibilities to combat algal proliferation, which threatens cave formations. This treatment method possesses numerous advantages: it is nondestructive because mineral matrices remain unaltered, and it is a nonresidual method because no toxic substances are generated.

Acknowledgements

We gratefully thank the owners of the Moidons Caves, Ms Isabelle and Mr François Gauthier, who kindly gave us permission to access the cave and to carry out all our field experiments. We also thank S. Colin (*Comité Départemental de Spéléologie du Jura*) for his CO₂ data recording, N. Crini, C. Amiot and C. Druart for their analysis of the water and D. Rieffel for his technical assistance during field sessions in the cave. Finally, financial support was kindly and thankfully provided by the *Ministère de la Culture et de la Communication* (50%), the *Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS* (25%) and the *Région de Franche-Comté* (25%). We are indebted to the Editor PhD. Clara Enza Urzi and two anonymous reviewers whose comments greatly improved the manuscript.

References

Adhikary, S.P., Sahu, J.K., 1998. UV protecting pigment of the terrestrial cyanobacterium *Tolypothrix byssoidea*. *Journal of Plant Physiology* 153, 770-773.

Aleya, L., Dauta, A., Reynolds, C.S., 2011. Endogenous regulation of the growth-rate responses of a spring-dwelling strain of the freshwater alga, *Chlorella minutissima*, to light and temperature. *European Journal of Protistology* 47, 239-244.

Aleya, L., Desmolles, F., Michard, M., Bonnet, M., Devaux, J., 1994. The deterministic factors of the *Microcystis aeruginosa* blooms over a biyearly survey in the hypereutrophic reservoir of Villerest (Roanne, France). *Archiv für Hydrobiologie* 4, 489-515.

Anderson, D.M., Alpermann, T.J., Cembella, A.D., Collos, Y., Masseret, E., Montresor, M., 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* 14, 10-35.

Atienzar, F.A., Cordi, B., Donkin, M.E., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2000. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquatic Toxicology* 50, 1-12.

Baqué, M., Viaggiu, E., Scalzi, G., Billi, D., 2013. Endurance of the endolithic desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* under UVC radiation. *Extremophiles* 17, 161-169.

Borderie, F., Alaoui-Sehmer, L., Raouf, N., Bousta, F., Oriol, G., Rieffel, D., Alaoui-Sossé, B., 2011. UV-C irradiation as a tool to eradicate algae in caves. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 579-584.

Borderie, F., Tête, N., Cailhol, D., Alaoui-Sehmer, L., Bousta, F., Rieffel, D., Aleya, L., Alaoui-Sossé, B., 2014. Factors driving epilithic algal colonization in show caves and new insights into combating biofilm development with UV-C treatments. *Science of The Total Environment* 484, 43-52.

Cheeseman, J.M., 2006. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany* 57, 2435-2444.

Danon, A., Gallois, P., 1998. UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 437, 131-136.

Devesa, R., Moldes, A., Díaz-Fierros, F., Barral, M.T., 2007. Extraction study of algal pigments in river bed sediments by applying factorial designs. *Talanta* 72, 1546-1551.

Gadjev, I., Stone, J.M., Gechev, T.S., 2008. Chapter 3: Programmed Cell Death in

Plants: New Insights into Redox Regulation and the Role of Hydrogen Peroxide, In International Review of Cell and Molecular Biology. ed. W.J. Kwang, pp. 87-144. Academic Press.

Gao, Y., Cui, Y., Xiong, W., Li, X., Wu, Q., 2009. Effect of UV-C on Algal Evolution and Differences in Growth Rate, Pigmentation and Photosynthesis Between Prokaryotic and Eukaryotic Algae. *Photochemistry and Photobiology* 85, 774-782.

Gay, C., Collins, J., Gebicki, J.M., 1999. Hydroperoxide Assay with the Ferric–Xylenol Orange Complex. *Analytical Biochemistry* 273, 149-155.

Gaylarde, P.M., Gaylarde, C.C., 2000. Algae and cyanobacteria on painted buildings in Latin America. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 93-97.

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930.

Grobbelaar, J.U., 2000. Lithophytic algae: A major threat to the karst formation of show caves. *Journal of Applied Phycology* 12, 309-315.

Groth, I., Vettermann, R., Schuetze, B., Schumann, P., Saiz-Jimenez, C., 1999. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *Journal of Microbiological Methods* 36, 115-122.

Halpern, B.S., Walbridge, S., Selkoe, K.A., Kappel, C.V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J.F., Casey, K.S., Ebert, C., Fox, H.E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H.S., Madin, E.M.P., Perry, M.T., Selig, E.R., Spalding, M., Steneck, R., Watson, R., 2008. A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *Science* 319, 948-952.

Hannen, E.J.v., Gons, H.J., 1997. UVC-induced lysis and detritus production of *Oscillatoria limnetica* in a two-stage continuous-flow system. *Journal of Plankton Research* 19, 723-733.

Hollósy, F., 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33, 179-197.

Holzinger, A., Lütz, C., 2006. Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* 37, 190-207.

Janknegt, P.J., Rijstenbil, J.W., van de Poll, W.H., Gechev, T.S., Buma, A.G.J., 2007. A comparison of quantitative and qualitative superoxide dismutase assays for application to low temperature microalgae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 87, 218-226.

John, D. M., Whitton, B. A., Brook, A. J., 2002. The Freshwater Algal Flora of the

British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae. Cambridge University Press, UK.

Joshi, P., Gartia, S., Pradhan, M.K., Biswal, B., 2011. Photosynthetic response of clusterbean chloroplasts to UV-B radiation: Energy imbalance and loss in redox homeostasis between QA and QB of photosystem II. *Plant Science* 181, 90-95.

Jurado, V., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C., 2008. Entomogenous fungi and the conservation of the cultural heritage: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 325-330.

Karsten, U., Lembcke, S., Schumann, R., 2007. The effects of ultraviolet radiation on photosynthetic performance, growth and sunscreen compounds in aeroterrestrial biofilm algae isolated from building facades. *Planta* 225, 991-1000.

Karsten, U., 2008. Defense Strategies of Algae and Cyanobacteria Against Solar Ultraviolet Radiation, In *Algal Chemical Ecology*. ed. C.D. Amsler, pp. 273-296. Springer Berlin Heidelberg.

Lee, T.-M., Shiu, C.-T., 2009. Implications of mycosporine-like amino acid and antioxidant defenses in UV-B radiation tolerance for the algae species *Pterocladia capillacea* and *Gelidium amansii*. *Marine Environmental Research* 67, 8-16.

Lefèvre, M., 1974. La maladie verte de Lascaux. *International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works* 19, 126-156.

Ma, Z., Gao, K., 2010. Spiral breakage and photoinhibition of *Arthrospira platensis* (Cyanophyta) caused by accumulation of reactive oxygen species under solar radiation. *Environmental and Experimental Botany* 68, 208-213.

Menetrez, M.Y., Foarde, K.K., Dean, T.R., Betancourt, D.A., 2010. The effectiveness of UV irradiation on vegetative bacteria and fungi surface contamination. *Chemical Engineering Journal* 157, 443-450.

Moharikar, S., D'Souza, J.S., Kulkarni, A.B., Rao, B.J., 2006. Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular chlorophyte *Chlamydomonas Reinhardtii* (Chlorophyceae) cells following UV irradiation: detection and functional analyses. *Journal of Phycology* 42, 423-433.

Moreau, C., Vergès-Belmin, V., Leroux, L., Oriol, G., Fronteau, G., Barbin, V., 2008. Water-repellent and biocide treatments: Assessment of the potential combinations. *Journal of Cultural Heritage* 9, 394-400.

Mulec, J., Kosi, G., 2009. Lampenflora algae and methods of growth control. *Journal of Cave and Karst Studies* 71, 109-115.

Mulec, J., Kosi, G., Vrhovsek, D., 2008. Characterization of cave aerophytic algal communities and effects of irradiance levels on production of pigments. *Journal of Cave and Karst Studies* 70, 3-12.

Najeeb, U., Xu, L., Ahmed, Z., Rasheed, M., Jilani, G., Naeem, M., Shen, W., Zhou, W., 2011. Ultraviolet-C mediated physiological and ultrastructural alterations in *Juncus effusus* L. shoots. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 481-488.

Negoescu, A., Lorimier, P., Labat-Moleur, F., Drouet, C., Robert, C., Guillermet, C., Brambilla, C., Brambilla, E., 1996. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 44, 959-968.

Ou, H., Gao, N., Deng, Y., Qiao, J., Wang, H., 2012. Immediate and long-term impacts of UV-C irradiation on photosynthetic capacity, survival and microcystin-LR release risk of *Microcystis aeruginosa*. *Water Research* 46, 1241-1250.

Prieto, B., Silva, B., Lantes, O., 2004. Biofilm quantification on stone surfaces: comparison of various methods. *Science of The Total Environment* 333, 1-7.

Prieto, B., Sanmartín, P., Aira, N., Silva, B., 2010. Color of cyanobacteria: some methodological aspects. *Appl. Opt.* 49, 2022-2029.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria: ISBN 3-900051-07-0; 2011. URL <http://www.R-project.org/>.

Ravanat, J.-L., Douki, T., Cadet, J., 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63, 88-102.

Sanmartín, P., Aira, N., Devesa-Rey, R., Silva, B., Prieto, B., 2010. Relationship between color and pigment production in two stone biofilm-forming cyanobacteria (*Nostoc* sp. PCC 9104 and *Nostoc* sp. PCC 9025). *Biofouling* 26, 499-509.

Sanmartín, P., Villa, F., Silva, B., Cappitelli, F., Prieto, B., 2011. Color measurements as a reliable method for estimating chlorophyll degradation to phaeopigments. *Biodegradation* 22, 763-771.

Scheerer S, Ortega Morales O, Gaylarde C., 2009. Chapter 5: Microbial Deterioration of

Stone Monuments – An Updated Overview. In: Laskin AI, Sariaslani S, Gadd G.M. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press. pp. 97–139.

Shirayama, H., Tohezo, Y., Taguchi, S., 2001. Photodegradation of chlorinated hydrocarbons in the presence and absence of dissolved oxygen in water. *Water Research* 35, 1941-1950.

Simon, K.S., 2012. Cave ecosystems, In *Encyclopedia of caves*. eds D.C. Culver, W.B. White. Academic Press in Elsevier, pp. 99-102

Stahl, W., Sies, H., 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* 24, 345-351.

Tao, Y., Zhang, X., Au, D.W.T., Mao, X., Yuan, K., 2010. The effects of sub-lethal UV-C irradiation on growth and cell integrity of cyanobacteria and green algae. *Chemosphere* 78, 541-547.

Tian, J., Yu, J., 2009. Changes in ultrastructure and responses of antioxidant systems of algae (*Dunaliella salina*) during acclimation to enhanced ultraviolet-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 97, 152-160.

Tyagi, R., Saxena, S., Kaushik, B.D., 1995. Induction and Characterization of UV Resistant *Calothrix braunii*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 4, 127-129.

Upadhyaya, H., Khan, M.H., Panda, S.K., 2007. Hydrogen peroxide induces oxidative stress in detached leaves of *Oriza sativa L.* *Gen. Appl. Plant Physiology* 33, 83-95.

Hannen, E.J.v., Gons, H.J., 1997. UVC-induced lysis and detritus production of *Oscillatoria limnetica* in a two-stage continuous-flow system. *Journal of Plankton Research* 19, 723-733.

Warscheid, T., Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 343-368.

Zvezdanović, J., Cvetić, T., Veljović-Jovanović, S., Marković, D., 2009. Chlorophyll bleaching by UV-irradiation in vitro and in situ: Absorption and fluorescence studies. *Radiation Physics and Chemistry* 78, 25-32.

III.2.4. Expériences et analyses complémentaires menées à l'échelle du biofilm

III.2.4.1. Résultats et discussion

III.2.4.1.1. Relation entre les variations de couleur, le nombre de cellules et les teneurs en chlorophylles des biofilms d'algues

La **Figure III.2-18** présente les variations des coordonnées colorimétriques L^* , a^* et b^* en fonction du nombre de cellules déposées sur le bloc ainsi qu'en fonction des teneurs en Chla et Chlb. Chaque point représente une mesure, correspondant à un biofilm (ou bloc) et les lignes en pointillées représentent les droites de régression linéaire dont les paramètres et la significativité sont présentées dans le **Tableau III.2-4**.

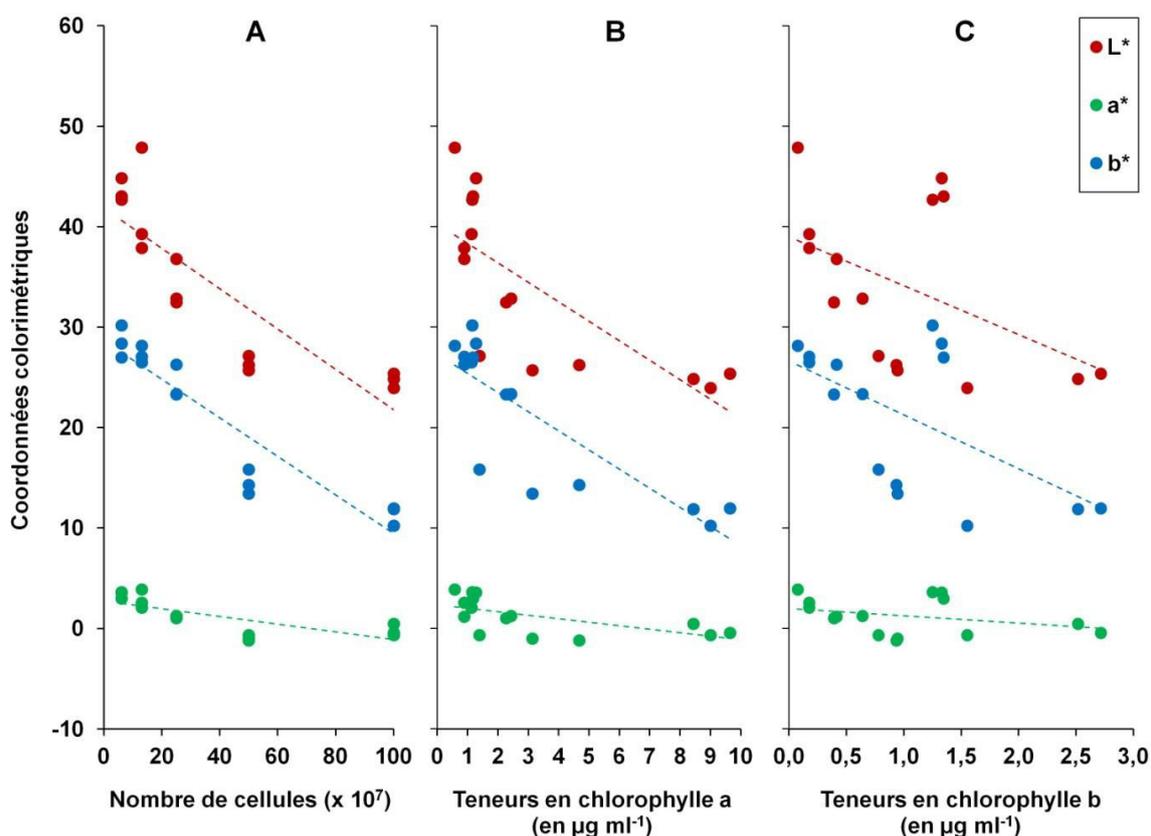


Figure III.2-18 : Relation entre les coordonnées colorimétriques L^* , a^* et b^* et (A) le nombre de cellules d'algues, (B) les teneurs en Chla et (C) les teneurs en Chlb. Les lignes en pointillées représentent les droites de régression linéaire (paramètres et significativité présentées dans le **Tableau III.2-4**).

Chacun des paramètres mesurés, que se soit le L*, le a* ou le b*, décroît avec l'intensité de la colonisation des algues sur le bloc, c'est-à-dire en fonction du nombre de cellules déposées sur le support (de 6 à 100×10^7 cellules, **Figure III.2-19**). Les paramètres des droites de régression linéaire (**Tableau III.2-4**) montrent qu'il y a des relations négatives (coefficient directeur < 0) et significatives ($p < 0,05$) entre le nombre de cellules et les 3 paramètres colorimétriques mesurés. Le paramètre L* (échelle de 0 à 100, du noir au blanc) représente la clarté de l'échantillon ; une accumulation de la biomasse algale entraîne donc une diminution du paramètre L* indiquant un assombrissement de l'échantillon. Les paramètres a* et b* représentent les indices de chromaticité de l'échantillon avec respectivement une échelle vert-rouge (négatif-positif) et bleu-jaune (négatif-positif). Lorsque la quantité de cellules algales déposée sur le bloc augmente, le paramètre a* diminue également indiquant un verdissement de l'échantillon (plus les valeurs sont négatives et plus l'intensité de la couleur verte est importante). Pour le paramètre b*, nous pouvons également traduire la diminution du b* par un assombrissement de l'échantillon car les valeurs tendent vers une couleur plus sombre, le bleu.

Tableau III.2-4 : Paramètres et significativité des droites de régression linéaire présentées dans la figure **Figure III.2-18**.

Relation	Coefficient directeur de la droite	R ² ajusté	p-value
L* ~ nombre cellules	-0,20	0,71	$4,7 \times 10^{-5}$
a* ~ nombre cellules	-0,04	0,54	0,001
b* ~ nombre cellules	-0,19	0,86	$4,3 \times 10^{-7}$
L* ~ Chla	-1,94	0,53	0,001
a* ~ Chla	-0,35	0,34	0,014
b* ~ Chla	-1,91	0,68	$8,8 \times 10^{-5}$
L* ~ Chlb	-4,87	0,16	ns
a* ~ Chlb	-0,72	-	ns
b* ~ Chlb	-5,36	0,30	0,020

Les p-values ont été obtenues après un test de Fisher. ns : non significatif. - : $R^2 < 0,1$.

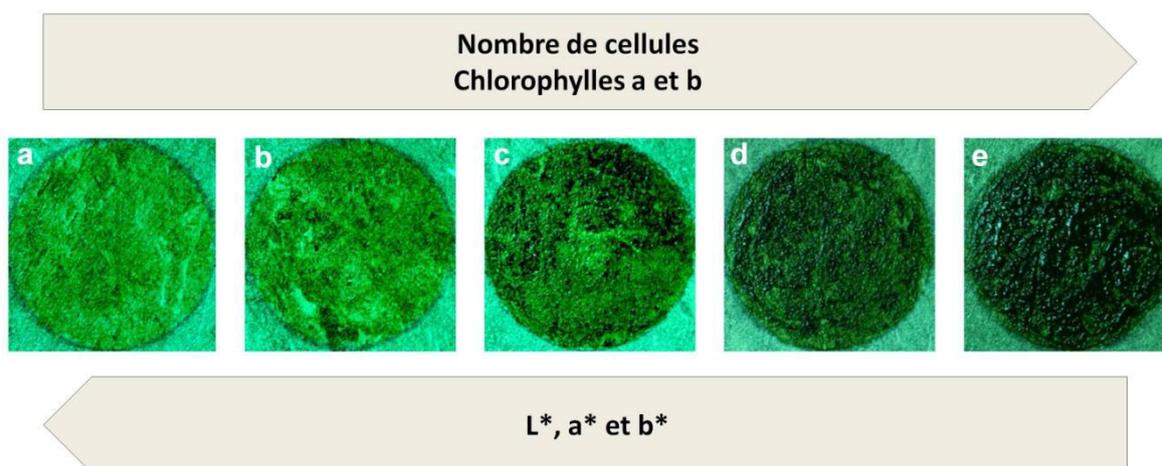


Figure III.2-19 : Schéma synthétique des relations entre la couleur, le nombre de cellules et les teneurs en Chla et Chlb. Légende des photographies : 6 (a), 13 (b), 25 (c), 50 (d) et 100×10^7 cellules (e).

En ce qui concerne les mesures des teneurs en Chla et Chlb, les relations avec les valeurs colorimétriques sont les mêmes : on remarque une diminution des paramètres L^* , a^* et b^* lorsque la quantité de chlorophylles mesurée augmente. Les pigments chlorophylliens sont en effet responsables de la coloration des algues. Il n'est donc pas surprenant de détecter en spectrocolorimétrie d'une part, un assombrissement de l'échantillon (diminution du L^*) et d'autre part, une diminution du paramètre a^* indiquant une intensité de la couleur verte plus importante. Cependant, lorsque l'on regarde en détail les paramètres et la significativité des droites de régression linéaire, certains coefficients de corrélation faibles ($R^2 < 0,5$) montrent certaines limites dans les méthodes expérimentales comme par exemple le fait que les algues aient été déposées manuellement sur le bloc. Ceci accentue le caractère hétérogène au sein même d'un biofilm mais également entre biofilms de même catégorie, avec la présence de zones plus ou moins colonisées qui induisent une variation importante dans les mesures colorimétriques.

Malgré certains biais observés dans le dispositif expérimental d'ensemencement des algues sur un support solide, les résultats que nous venons de décrire précédemment montrent que la mesure de la couleur est un outil adapté pour évaluer l'intensité de la colonisation d'un biofilm d'algues cultivé sur des blocs de calcaire. Cette approche méthodologique a déjà été utilisée dans plusieurs études (Prieto *et al.*, 2002, 2004, 2010 ; Sanmartín *et al.*, 2010 ; Vázquez-Nion *et al.*, 2013). Cependant, ces auteurs ont travaillé dans des conditions expérimentales et sur des modèles biologiques différents. Ils ont utilisé différentes espèces de

cyanobactéries (genre *Nostoc*) qu'ils ont ensuite concentrées et déposées sur des filtres en papier afin de former un biofilm. Ces auteurs ont montré que les paramètres L^* et a^* étaient corrélés négativement avec la concentration de cyanobactéries déposée sur des filtres. Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons décrits précédemment. Cependant, en ce qui concerne le paramètre b^* les auteurs de ces différentes études ont montré une corrélation positive (tendance à l'augmentation vers le jaune) avec la concentration en cyanobactéries alors que nos résultats montrent une corrélation négative (tendance à la diminution vers le bleu) avec la concentration en algues. Certains auteurs comme [Prieto *et al.* \(2002\)](#), attribuent la tendance à l'augmentation vers le jaune du paramètre b^* par la présence des caroténoïdes (pigments orange) chez les cyanobactéries. Nos résultats suggèrent au contraire que plus la concentration cellulaire est élevée et plus le paramètre b^* a tendance à diminuer vers des valeurs s'éloignant du jaune et se rapprochant du bleu (assombrissement de l'échantillon avec l'augmentation de la biomasse).

Pour la suite des expériences, qui consiste à étudier les variations colorimétriques des biofilms d'algues traités aux UV-C, nous avons choisis d'utiliser seulement les paramètres L^* et a^* qui se sont avérés être plus pertinent et plus simple à interpréter pour évaluer l'état de colonisation des biofilms d'algues. En effet, le paramètre L^* traduit directement la perte de matière biologique (éclaircissement de l'échantillon) et l'axe rouge-vert du paramètre a^* permet d'étudier les effets des UV-C sur la coloration verte des biofilms due à la présence des chlorophylles.

III.2.4.1.1. *Effets des UV-C sur la surface de colonisation et les paramètres colorimétriques*

Les résultats du suivi de la surface de colonisation ainsi que des paramètres L^* et a^* de plusieurs séries de biofilms exposés ou non aux UV-C sont présentés dans la **Figure III.2-20**. Pour faciliter la lecture de ces résultats, des droites de régression linéaire ont également été utilisées afin de mettre en évidence des tendances à l'augmentation ou à la diminution en fonction du paramètre étudié (les paramètres et la significativité de ces droites sont présentés dans le **Tableau III.2-5**). Enfin, les données brutes de ces résultats (exprimées en moyennes \pm écart-types) sont présentées dans le **Tableau III.2-6**, dans lequel apparaissent également les différences statistiques pour chaque paramètre en fonction du jour de mesure.

En premier lieu, on remarque que la surface d'occupation du biofilm décroît

significativement après traitement aux UV-C alors qu'elle reste inchangée chez les échantillons témoins (**Figure III.2-20 A**). Après une exposition de 4 h d'UV-C, le coefficient directeur de la droite de régression indique qu'il y a une diminution de $0,218 \text{ cm}^2$ par jour. Sur l'ensemble du suivi (29 jours), on remarque que la surface d'occupation est passée de $8,54 \pm 0,17$ (jour 0) à $2,34 \pm 0,73 \text{ cm}^2$ (jour 29) (diminution de 73 % ; $p < 0,05$). Pour une exposition de 8 h la diminution de la surface d'occupation est de $0,325 \text{ cm}^2$ par jour ; la valeur au jour 0 est de $9,40 \pm 0,17 \text{ cm}^2$ et de $2,05 \pm 0,70 \text{ cm}^2$ au jour 29 (diminution de 78 % ; $p < 0,05$).

Le suivi du paramètre L^* (**Figure III.2-20 B**) en fonction des différents traitements indique tout d'abord une diminution significative au cours du temps chez les échantillons témoins (de $38,21 \pm 0,93$ au jour 0 à $26,77 \pm 0,71$ au jour 29 ; $p < 0,05$). En effet, la croissance cellulaire entraîne une accumulation de biomasse algale sur le bloc et donc un assombrissement de l'échantillon (photos témoins dans la **Figure III.2-21**), d'où une diminution du paramètre L^* . Cette tendance à la diminution du paramètre L^* est inversée lorsque les échantillons sont exposés au rayonnement UV-C. Après 4 h d'UV-C, les valeurs de L^* passent de $38,95 \pm 2,40$ (jour 0) à $48,72 \pm 0,90$ (jour 20) et de $35,58 \pm 1,34$ (jour 0) à $53,01 \pm 3,28$ (jour 29) pour les biofilms exposés à 8 h d'UV-C (différences significatives à $p < 0,05$). Cette augmentation du paramètre L^* , contrairement aux échantillons témoins, montre qu'il y a un éclaircissement de l'échantillon dû principalement à la dégradation des chlorophylles (effet « bleaching ») causée par l'effet des UV-C (photos échantillons exposés aux UV-C dans la **Figure III.2-21**).

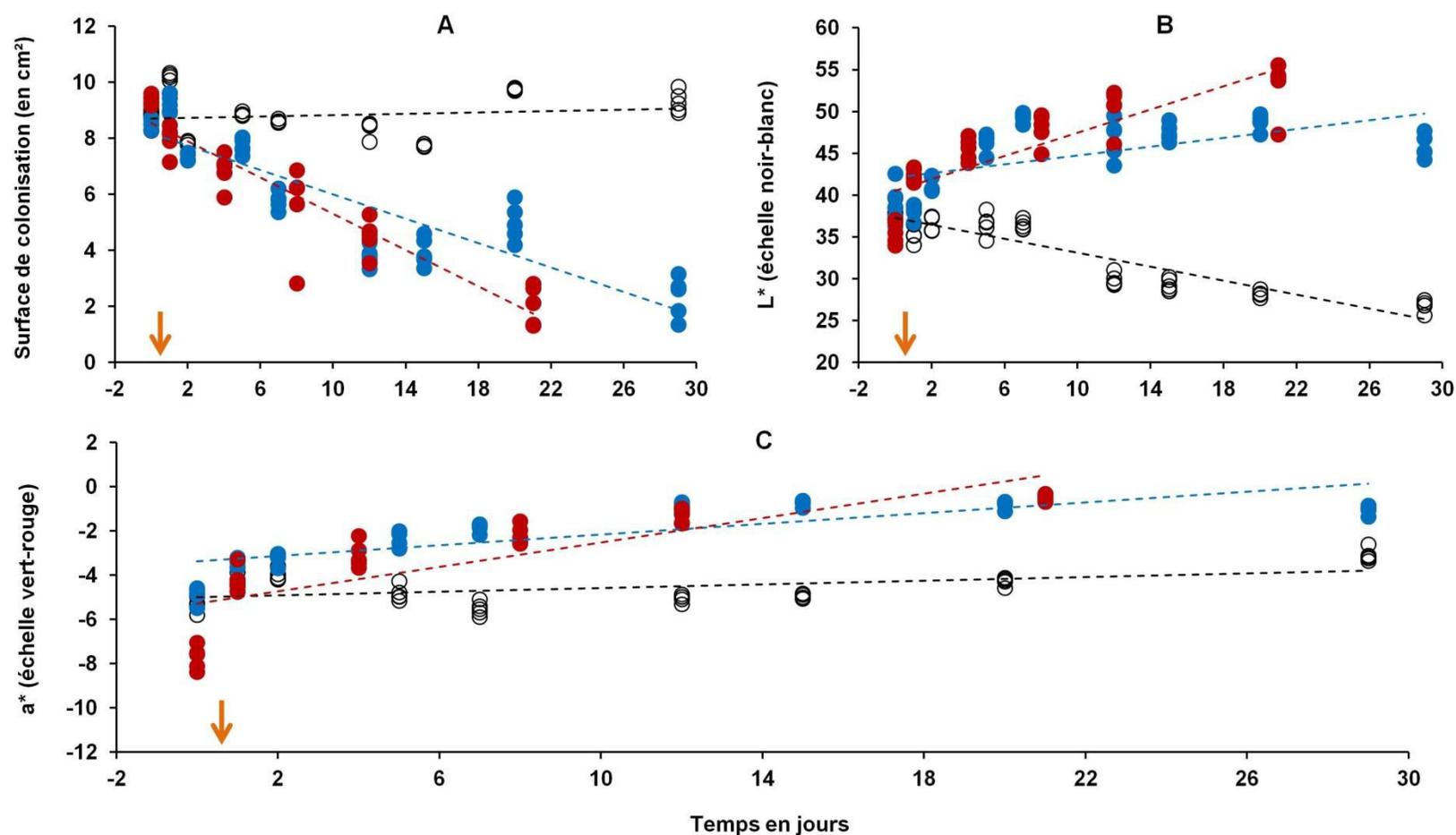


Figure III.2-20 : Suivi dans le temps de la surface de colonisation et des paramètres colorimétriques des biofilms d'algues. A : surface de colonisation en cm² ; B : paramètre L* ; C : paramètre a*. Axe des abscisses : temps en jours. Cercles blancs : échantillons témoins ; ronds bleus : échantillons exposés à 4 h d'UV-C ; ronds rouges : échantillons exposés à 8 h d'UV-C. Flèches orange : traitements UV-C (entre le jour 0 et le jour 1). Les lignes pointillées représentent les droites de régression linéaire (les paramètres et significativité de ces droites sont présentés dans le **Tableau III.2-5**).

Tableau III.2-5 : Paramètres et significativité des droites de régression linéaire présentées dans la **Figure III.2-20**.

Echantillons	Relation paramètre mesuré ~ temps	Coefficient directeur de la droite	R ² ajusté	p-value
Témoins	Surface	0,012	-	ns
	L*	-0,418	0,84	$2,2 \times 10^{-16}$
	a*	0,041	0,23	3×10^{-4}
4 h d'UV-C	Surface	-0,218	0,78	6×10^{-16}
	L*	0,263	0,33	$2,5 \times 10^{-5}$
	a*	0,121	0,62	1×10^{-10}
8 h d'UV-C	Surface	-0,325	0,88	$1,8 \times 10^{-14}$
	L*	0,696	0,70	$4,3 \times 10^{-9}$
	a*	0,276	0,68	$1,6 \times 10^{-8}$

Les p-values ont été obtenues après un test de Fisher. ns : non significatif. - : $R^2 < 0,1$.

Le suivi du paramètre a* (**Figure III.2-20 C**) permet également de mettre en évidence l'effet du rayonnement UV-C sur les biofilms d'algues. Quelle que soit la durée de l'exposition aux UV-C, on observe une augmentation significative du paramètre a* (coefficient directeur de 0,121 pour 4 h et de 0,276 pour 8 h d'exposition aux UV-C). Notons que cette augmentation est accentuée lors d'une exposition à 8 h d'UV-C (coefficient directeur plus élevé), alors même que la durée du suivi est plus courte (suivi sur 21 jours contre 29 jours pour les échantillons exposés à 4 h d'UV-C). Par exemple, les valeurs du paramètre a* lorsque les échantillons sont exposés à 8 h d'UV-C passent de $-7,71 \pm 0,52$ (jour 0) à $-0,47 \pm 0,16$ (jour 21) ($p < 0,05$). Cette augmentation du paramètre a* après traitement aux UV-C s'explique également par l'effet « bleaching » sur les chlorophylles (voir photos échantillons exposés dans la **Figure III.2-21**).

Tableau III.2-6 : Données brutes et résultats statistiques du suivi dans le temps de la surface de colonisation et des paramètres colorimétriques des biofilms d’algues exposés ou non aux UV-C.

Echantillons	Paramètres mesurés	Jour de mesure								
		0	1	2	5	7	12	15	20	29
Témoins	Surface	8,77 ± 0,29	10,10 ± 0,28	7,87 ± 0,06	8,71 ± 0,06	8,61 ± 0,05	8,37 ± 0,27	7,74 ± 0,04	9,76 ± 0,05	9,31 ± 0,38
	L*	38,21 ± 0,93	35,50 ± 1,05	36,44 ± 0,89	36,54 ± 1,34	36,44 ± 0,57	29,88 ± 0,71	29,28 ± 0,73	28,21 ± 0,39	26,77 ± 0,71
	a*	-5,23 ± 0,37	-4,27 ± 0,25	-4,00 ± 0,26	-4,82 ± 0,35	-5,51 ± 0,30	-5,04 ± 0,17	-4,95 ± 0,09	-4,26 ± 0,18	-3,09 ± 0,29
4 h d’UV-C	Surface	8,54 ± 0,17	9,23 ± 0,29	7,37 ± 0,13	7,72 ± 0,26	5,78 ± 0,31	3,80 ± 0,34	3,96 ± 0,50	5,00 ± 0,66	2,34 ± 0,73
	L*	38,95 ± 2,40	38,14 ± 0,89	41,28 ± 0,89	46,31 ± 1,08	49,31 ± 0,53	46,80 ± 2,34	47,50 ± 1,03	48,72 ± 0,90	45,84 ± 1,38
	a*	-4,89 ± 0,35	-3,61 ± 0,36	-3,22 ± 0,27	-2,30 ± 0,35	-1,23 ± 0,20	-0,88 ± 1,18	-0,74 ± 0,13	-0,80 ± 0,17	-1,04 ± 0,19
8 h d’UV-C										
	Surface	9,40 ± 0,17	7,99 ± 0,51	6,87 ± 0,60	5,56 ± 1,60	4,50 ± 0,63	2,05 ± 0,70			
	L*	35,58 ± 1,34	42,51 ± 0,76	45,50 ± 1,31	47,98 ± 1,88	50,37 ± 2,4	53,01 ± 3,28			
a*	-7,71 ± 0,52	-4,27 ± 0,60	-3,09 ± 0,57	-2,17 ± 0,42	-1,30 ± 0,32	-0,47 ± 0,16				

Valeurs exprimées en moyennes ± écart-types (n = 5). Les cases orangées représentent une différence significative à $p < 0,05$ par rapport au jour 0 (test de Friedman pour échantillons appariés).

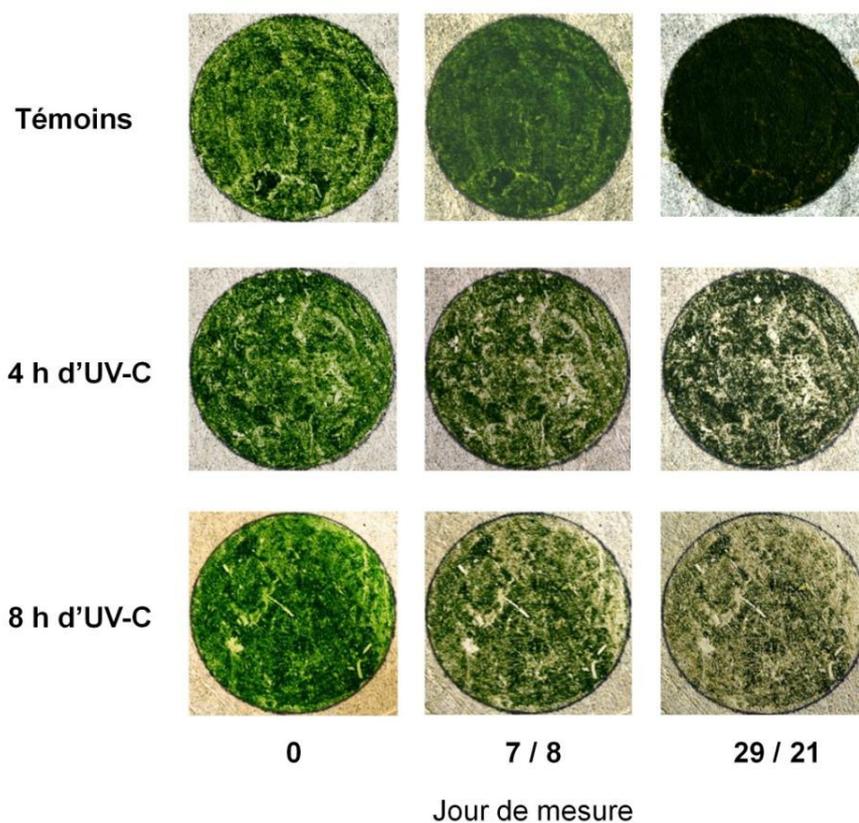


Figure III.2-21 : Photographies des biofilms d’algues à différents jour de mesure et en fonction du traitement. Les jours 7 et 29 correspondent aux photographies des échantillons témoins et exposés à 4 h d’UV-C ; les jours 8 et 21 correspondent aux échantillons exposés à 8 h d’UV-C.

III.2.4.2. Conclusion et remarques

Le suivi et la mesure de la couleur d’un biofilm d’algues cultivées sur support solide semble donc être un bon outil pour évaluer l’intensité de la colonisation biologique ainsi que pour analyser l’efficacité des traitements UV-C.

Grâce à la mesure de chacun des paramètres sélectionnés (surface de colonisation et paramètres colorimétriques L^* et a^*), nous avons pu mettre en évidence l’effet des UV-C sur des biofilms d’algues. Des effets modulés ont été observés en fonction des durées choisies d’exposition aux UV-C. En effet, avec un traitement de 8 h la réduction de la surface de colonisation et les variations des paramètres L^* et a^* sont accentuées par rapport à un traitement de 4 h. De plus, comme nous l’avons observé dans le cas de suspensions d’algues soumises à des traitements UV-C, les effets observés au niveau d’un biofilm d’algues se manifestent progressivement dans le temps après la fin du traitement. Ainsi, la diminution de la surface de colonisation et les variations des paramètres colorimétriques s’accroissent au

cours du temps. Lors du suivi photographique des échantillons exposés (**Figure III.2-21**) nous n'avons pas observé de disparition totale du biofilm d'algues. Cependant, sur ces mêmes photographies, nous observons que les zones les moins intensément colonisées sont totalement décolorées tandis que les zones à forte accumulation de matière restent encore vertes, traduisant un effet du facteur « épaisseur du biofilm » dans l'efficacité du traitement. Il est difficile de dire si des cellules d'algues sont encore vivantes ; nous n'avons pas mis au point de méthode permettant de mesurer la viabilité des cellules cultivées sur support solide. Cependant, la persistance de la couleur verte suggère que tous les pigments chlorophylliens n'ont pas été dégradés sous l'action des UV-C, ce qui laisse supposer que les couches sous-jacentes n'ont pas été – ou ont été beaucoup moins – affectées par les traitements.

III.2.5. Synthèse du chapitre 2

Les expériences et analyses menées sur des suspensions de *C. minutissima* ont permis de mettre en avant plusieurs points importants listés ci-dessous que ce soit au niveau de l'acclimatation des algues aux conditions de culture ou sur l'effet des UV-C étudié à différents niveaux d'organisation biologique.

En résumé :

- Mise en évidence de certaines **adaptations physiologiques** de *C. minutissima* en conditions de culture « grottes » au laboratoire : **changement du contenu pigmentaire** = adaptation aux faibles conditions lumineuses.
- L'**activité photosynthétique** est fortement **diminuée** après de **faibles doses** d'UV-C ; une **activité respiratoire** est détectée pour des **fortes doses**.
- **Dégradation partielle** des **chlorophylles** même après de **fortes doses** mais **dégradation totale** détectée au cours du **temps**.
- Mises en évidence de la **fragmentation** de l'**ADN** : effets **directs** (photo-oxydation) et **indirects** (stress oxydatif) = voies de la **mort cellulaire programmée (MCP)**.

Dans ce chapitre nous avons également analysé l'effet des UV-C à l'échelle du biofilm d'algues. L'évaluation de la couleur s'est révélée être un bon outil pour diagnostiquer l'intensité de colonisation d'un biofilm sur un support solide. En effet, les paramètres colorimétriques L* et a* sont d'une manière générale corrélés avec la concentration cellulaire et les teneurs en pigments chlorophylliens. Nous avons ensuite utilisé ces paramètres colorimétriques afin de comparer l'évolution au cours du temps de biofilms traités et non

traités aux UV-C.

L'efficacité d'un traitement UV-C sur un biofilm d'algues est conditionnée par deux paramètres :

- ❖ l'épaisseur du biofilm ou l'intensité de la colonisation,
- ❖ la durée ou dose d'UV-C utilisée.

Il est par ailleurs nécessaire de laisser un temps de repos après l'exposition pour que le traitement manifeste pleinement son efficacité.

La dose et la durée d'exposition à utiliser doivent être définies en tenant compte de l'épaisseur ou de l'intensité de colonisation du biofilm. Nous verrons plus en détail dans les **paragraphes III.3.1** et **III.3.2** comment l'intensité de colonisation de différents biofilms proliférant dans le site d'étude de la grotte des Moidons, conditionne l'efficacité des traitements UV-C. Les résultats présentés dans le **Chapitre 2** ont été mis à profit pour déterminer le type de traitement à appliquer dans ces conditions.

Les résultats et interprétations des expérimentations *in-situ* présentés dans l'**Article 2**, seront repris et compilés avec l'ensemble des résultats de terrain dans le **Chapitre 3**.

III.3. Chapitre 3 : Etudes et analyses menées *in-situ* dans la grotte des Moidons

Ce chapitre est consacré aux données et résultats obtenus au cours des diverses sessions de terrain menées dans la grotte des Moidons entre Avril 2012 et Décembre 2013.

La majorité des résultats est présentée sous la forme d'un article scientifique (**paragraphe III.3.1, Article 3**) et concerne l'étude de la colonisation algale ainsi que l'application des UV-C sur des biofilms. Une partie plus succincte a pour objectif de présenter certains résultats complémentaires concernant l'analyse des communautés microbiennes de la grotte des Moidons par cytométrie en flux et microscopie électronique à balayage (**paragraphe III.3.2**).

Comme nous l'avons vu précédemment dans le **Chapitre 2**, une partie des résultats des travaux de terrain est présentée dans l'**Article 2** à savoir les données des paramètres abiotiques régnant dans la grotte (températures, taux d'humidité, concentrations en CO₂ et éléments minéraux) ainsi que le suivi d'un biofilm traité aux UV-C pendant plusieurs mois.

III.3.1. Etude des facteurs influençant la colonisation algale dans la grotte des Moidons et applications de traitements UV-C sur plusieurs biofilms verts (Article 3)

Le titre de l'article est « **Factors driving epilithic algal colonization in show caves and new insights into combating biofilm development with UV-C treatments** » et les auteurs sont Fabien BORDERIE, Nicolas TÊTE, Didier CAILHOL, Laurence ALAOUI-SEHMER, Faisl BOUSTA, Dominique RIEFFEL, Lotfi ALEYA et Badr ALAOUI-SOSSÉ.

Science of the Total Environment 484 (2014) 43–52



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Factors driving epilithic algal colonization in show caves and new insights into combating biofilm development with UV-C treatments



Fabien Borderie ^a, Nicolas Tête ^a, Didier Cailhol ^c, Laurence Alaoui-Sehmer ^a, Faisl Boustab ^b, Dominique Rieffel ^a, Lotfi Aleya ^{a,*}, Badr Alaoui-Sossé ^a

^a Laboratoire Chrono-Environnement (LCE), UMR CNRS 6249, Université de Franche-Comté, Place Leclerc, F-25030 Besançon, France

^b Laboratoire de Recherche des Monuments Historiques (LRMH), USR 3224, 29 rue de Paris, F-77420 Champs-sur-Marne, France

^c Laboratoire Environnement, Dynamique et Territoires de Montagne (EDYTEM), UMR CNRS 5204, Université de Savoie, F-73376 Le Bourget du Lac, France

HIGHLIGHTS

- Growth-influencing factors of epilithic algae in a show cave were studied.
- Not one but a combination of factors explained the presence of algae.
- Colorimetric measurements are a good diagnosis of colonization state.
- Effects of UV-C treatments were investigated on several green biofilms.
- Treated biofilms are bleached but re-colonization occurs after 16 months.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2014
Received in revised form 7 March 2014
Accepted 11 March 2014
Available online xxx

Editor: C.E.W. Steinberg

Keywords:

Epilithic algae
Biofilms
Cave
Growth-influencing factors
Colorimetric measurements
UV-C treatment

ABSTRACT

The proliferation of epilithic algae that form biofilms in subterranean environments, such as show caves, is a major problem for conservators. In an effort to reduce the use of chemical deansers when addressing this problem, we proposed investigating the effects of UV-C on combating algal biofilm expansion in a cave located in northeastern France (Moidons Cave). First, the biofilms and cavity were studied in terms of their algal growth-influencing factors to understand the dynamics of colonization in these very harsh environments. Next, colorimetric measurements were used both to diagnose the initial colonization state and monitor the UV-C-treated biofilms for several months after irradiation. The results indicated that passive dispersal vectors of the viable spores and cells were the primary factors involved in the cave's algae repartition. The illumination time during visits appeared to be responsible for greater colonization in some parts of the cave. We also showed that colorimetric measurements could be used for the detection of both thin and thick biofilms, regardless of the type of colonized surface. Finally, our results showed that UV-C treatment led to bleaching of the treated biofilm due to chlorophyll degradation even one year after UV-C treatment. However, a re-colonization phenomenon was colorimetrically and visually detected 16 months later, suggesting that the colonization dynamics had not been fully halted.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Highlights

- Growth-influencing factors of epilithic algae in a show cave were studied.
- Not one but a combination of factors explained the presence of algae.
- Colorimetric measurements are a good diagnosis of colonization state.
- Effects of UV-C treatments were investigated on several green biofilms.
- Treated biofilms are bleached but re-colonization occurs after 16 months.

Abstract

The proliferation of epilithic algae that form biofilms in subterranean environments, such as show caves, is a major problem for conservators. In an effort to reduce the use of chemical cleansers when addressing this problem, we proposed investigating the effects of UV-C on combating algal biofilm expansion in a cave located in northeastern France (Moidons Cave). First, the biofilms and cavity were studied in terms of their algal growth-influencing factors to understand the dynamics of colonization in these very harsh environments. Next, colorimetric measurements were used both to diagnose the initial colonization state and monitor the UV-C-treated biofilms for several months after irradiation. The results indicated that passive dispersal vectors of the viable spores and cells were the primary factors involved in the cave's algae repartition. The illumination time during visits appeared to be responsible for greater colonization in some parts of the cave. We also showed that colorimetric measurements could be used for the detection of both thin and thick biofilms, regardless of the type of colonized surface. Finally, our results showed that UV-C treatment led to bleaching of the treated biofilm due to chlorophyll degradation even one year after UV-C treatment. However, a re-colonization phenomenon was colorimetrically and visually detected 16 months later, suggesting that the colonization dynamics had not been fully halted.

Keywords: epilithic algae; biofilms; cave; growth-influencing factors; colorimetric measurements; UV-C treatment.

III.3.1.1. Introduction

Caves are probably the most particular ecosystem, as they harbor life despite their lack

of sunlight and reminding us of how life on earth may have first begun. While light-driven photosynthetic production by plants is the key source of energy in outdoor ecosystems, chemical-driven microbial production can support food webs in caves (Simon, 2012). However, the discovery of a given cave and its opening to the public give irremediable rise to a combination of structural changes that greatly affect its relatively stable microclimate (Groth *et al.*, 1999). The installation of a lighting system to make cave formations visible to visiting tourists may, over time, lead to the appearance of greenish biofilms due to the growth of prototrophs such as algae and cyanobacteria, which are considered a major source of biodeterioration on rock surfaces (Albertano, 2012; Cutler *et al.*, 2013). These colonists, or “r-selected species,” possess invasive, fast-growing and prolific propagule production and are later joined by more varied, larger and more slowly growing species, and eventually by species that, through the exclusion of their competitors, achieve complete dominance over an ecological climax (Aleya, 1991).

The Moidons Cave (Jura, France), discovered in 1966 and open to tourists for 6 months a year since 1989, may constitute a plausible example of this phenomenon. Each year, approximately 25,000 people visit the Moidons Cave to observe a wide variety of cave formations, including stalagmites, stalactites, fistulous shapes, draperies, columns, flowstones, rimstone dams, rimstone pools and nodular shapes such as “cave popcorn”. A successive incidence of epilithic algae has occurred as a result of this tourism, conforming to a common pattern of increasing biomass and composed mainly of the algae r-strategist *Chlorella minutissima* (Reynolds, 1997; Aleya *et al.*, 2011), which has colonized parts of the cave’s soils, walls and speleothems. Another example of a cave disturbance has been identified by Lefèvre (1974) in the world famous Lascaux Cave (Dordogne, France), where an increased biomass of the r-colonist algae *Bracteacoccus* sp. has been recorded and threatened the integrity of that cave’s unique and renowned 17,000-year-old prehistoric paintings. Nugari *et al.* (2009) have also reported algal colonization (*Apatococcus lobatus*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum* sp., *Muriella terrestris*) on mural paintings in the Crypt of Original Sin (Matera, Italy).

Serious efforts must therefore be undertaken to identify the best tools for the protection and conservation of natural and cultural heritage objects with minimal environmental impact. Two methods are used to combat algal proliferation on cave formations in show caves. Physical and mechanical methods, such as brushing or high pressure vapor, have been shown

to destroy the fragile crystal structure of speleothems and cannot kill biological materials that can easily spread throughout a cave (Mulec and Kosi, 2009). Chemical methods, such as algaecides, fungicides and a wide range of biocides, are commonly used, but have been heavily criticized because they can lead to the corrosion of carbonate formations by dissolving calcite (e.g., chlorine compounds, Faimon *et al.*, 2003) and may seep into the surrounding treated area, contaminating groundwater by infiltration through karst network. Therefore, in an attempt to preserve speleothems, numerous authors have proposed improving illumination management by minimizing lighting time, using weaker-intensity lamps or light-emitting diodes (LEDs) (Grobbelaar, 2000; Mulec and Kosi, 2009), or at least by establishing drastic illumination management when opening new tourist sites to the public. However, such management is usually insufficient for removing algal proliferation in caves. Furthermore, environmentally friendly processes must be developed to clean areas contaminated by green biofilms at sites that have been open for several decades and have a high level of biological contamination.

In this study, we investigated the use of UV-C irradiation as a possible alternative to chemicals in caves because such irradiation does not generate pollution phenomena and the mineral matrices of physical supports (calcite, limestone, etc.) remain unaltered. UV-C irradiation is harmful to living organisms due to its short wavelength, which confers highly energetic photons and germicidal properties upon these organisms. Many studies have reported multiple negative effects of UV-C irradiation on plants (Costa *et al.*, 2006; Büchert *et al.*, 2011; Najeeb *et al.*, 2011; Chairat *et al.*, 2013), microalgae and cyanobacteria (Moharikar *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2010; Ou *et al.*, 2012) in terms of both viability and metabolic activity. A strong bleaching effect has also been observed on chlorophyll during UV-C irradiation (Zvezdanović *et al.*, 2009), making it useful in eliminating the greenish, dirty appearance taken on by cave formations. UV-C irradiation is widely used to disinfect surgical tools (Menetrez *et al.*, 2010) and eliminate hydrocarbons prior to the conventional treatment of wastewater (Shirayama *et al.*, 2001). However, as far as we know, no similar attempt has been made to investigate the effects of UV-C on cave-dwelling epilithic algae that form biofilms. To the best of our knowledge, the only available data on the topic is our previously published work (Borderie *et al.*, 2011), in which we investigated the effects of different short UV-C doses, in laboratory conditions, on both the photosynthetic activity and viability of a mixture of algae strains isolated from three caves

located in southwestern France.

In this paper, we first describe our in situ investigation in Moidons Cave that sought to identify and understand the factors driving epilithic algal colonization. Next, we examine the use of colorimetric measurements to assess the intensity of colonization on two selected green biofilms. Finally, we describe the procedure in which colorimetric monitoring combined with UV-C treatment was applied to four different biofilms to assess the efficiency of UV-C irradiation as a substitute for chemicals.

III.3.1.2. Materials and methods

III.3.1.2.1. *Description and characterization of the cave*

Located in the Moidons National Forest (department of Jura, municipality of Molain, **Figure III.3-1**) on the Lons-le-Saunier plateau, 10 km from the town of Arbois, Moidons Cave was discovered in 1966 by two speleologists named Pierre Murat and Fred Meyer. The geographic coordinates of the original entrance are 05° 48' 21.5'' E and 46° 50' 20.7'' N (at an altitude of 475 m). Moidons National Forest is comprised of a large circular field of karren found on a bed of Jurassic limestone (Bajocian and Bathonian stages). The plateau has a tabular relief with many dolines and karren surfaces in a calcicole beech and oak forest.

The descent into Moidons Cave occurs via a 15-m-deep shaft that intersects a fracture at the roof of a large epiphreatic gallery. With a maximal depth and length of 30 m and 250 m respectively, the cave is comprised of three sections, the Main Chamber in the center and the North and South Galleries (**Figure III.3-1**). The Main Chamber contains a multitude of cave formations and some areas of ceiling collapse. This chamber's soil consists of a glacio-fluvial deposit covered by calcite crust and stalagmites. A large deposit of ceiling material resulting from collapse is located in the central area of the Main Chamber. The South Gallery, in the upstream part of the cave system, is a phreatic conduit with fluvial deposits of pebbles and gravels, and rimstone dams and pools in its lower area. The walls and various ceiling formations—columns, stalactites and stalagmites—are covered by calcite crust. The northern extension, constituting the downstream section of the cave system, begins with a major N-S normal fault and appears to be filling with glacial sediment.

In terms of its hydrogeological aspects, the Moidons Cave system is located in the catchment basin of the Cuisance River, which emerges at Planches Cave, a karstic spring in the Fer à Cheval cirque located in a pocket valley near Arbois. The cave system is

characterized by different vertical seepage rates. Diaclases in the epikarst above the Main Chamber and the South Gallery produce abundant vertical seepage in these areas, with the cavity's north-south slope (1.5-2%) accentuating this phenomenon. Heavy epikarstic seepages in the South Gallery have formed rimstone dams and pools (**Figure III.3-1**) and move in a south-north direction. No water reaches the North Gallery because it seeps in the opposite direction, reaching the Cuisance spring via an efficient drainage system formed by the collapse in the Main Chamber's center.

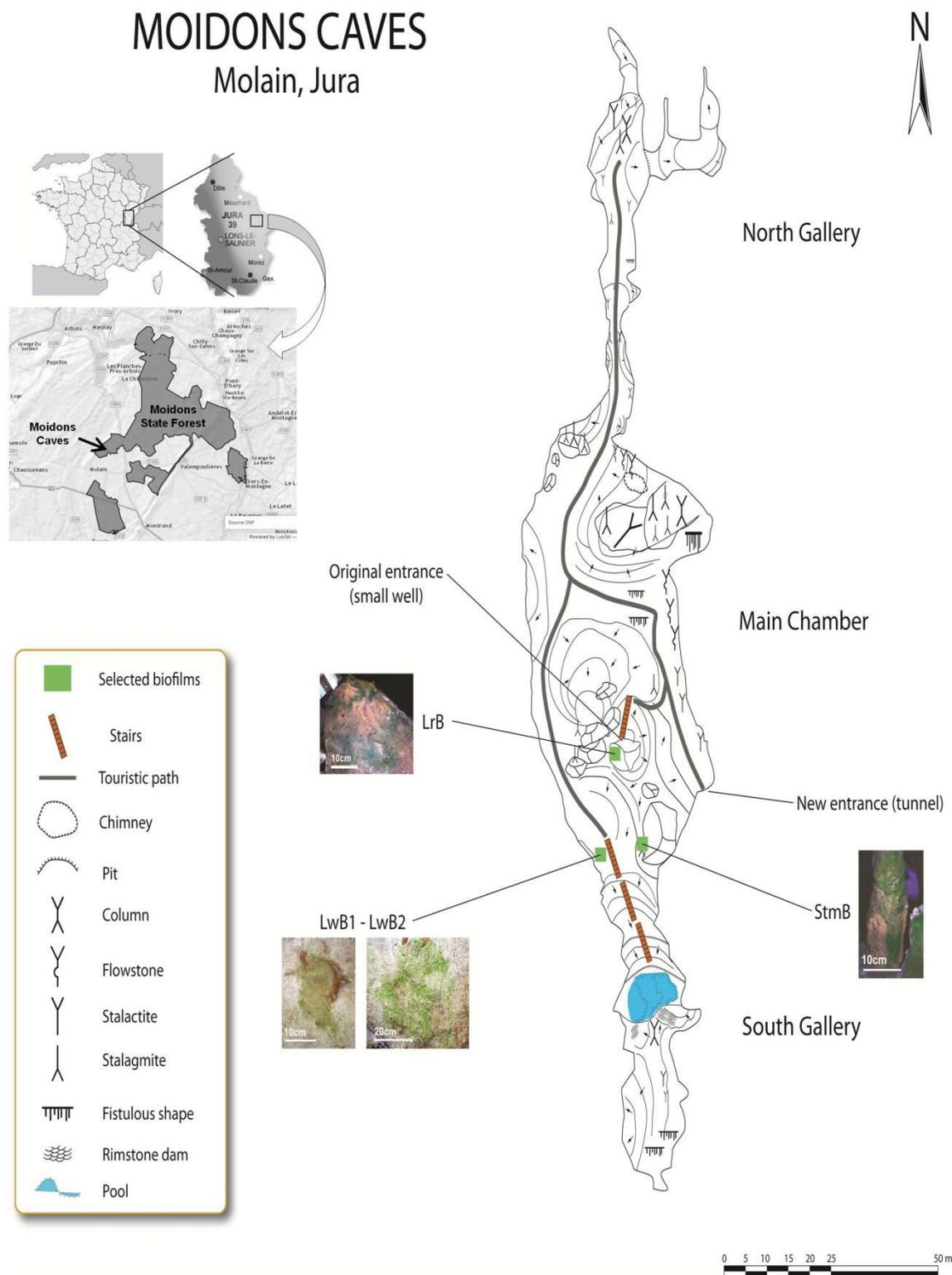


Figure III.3-1: Localization and plan of the Moidons Cave with selected biofilms for experiments. LrB: biofilm on limestone rock (Main Chamber); LwB1&2: biofilms on limestone wall (South Gallery); StmB: biofilm on stalagmite (South Gallery). See Table 1 for details about the selected biofilms.

III.3.1.2.2. *Topography, cartography and physico-chemical parameter measurements*

The cave's topography and cartography (**Figure III.3-1**) were obtained using a DistoX electronic device (Ing. Beat Heeb, Switzerland) comprised of a laser rangefinder combined with a 3-axis compass and clinometer. A Bluetooth connection with a personal digital assistant (PDA)-based program was used to store and manage the measured data and draw sketches directly on the screen. PocketTopo software was used to manage the survey data, reference points and trip information and export the data file to vector graphics software. The system accuracy was ± 1 mm for length and $\pm 0.2^\circ$ for direction and inclination.

Temperature was monitored for one month, in September 2012, using 3 HOBO data loggers (U12-012 Onset Computer Corporation) placed in each main section of the cave (the Main Chamber and North and South Galleries). The cave's CO₂ rates were monitored from July 2009 to July 2012 (with 19 measurements taken during this period) by a local speleology committee (the Comité Départemental de Spéléologie du Jura or CDSJ). Analysis of the mineral elements in cave water samples was performed using a inductively coupled plasma optical emission spectrophotometry (ICP OES, radial method, iCAP 6000 series, Thermo Scientific) and compared to a Certified Material Reference (ERM® CA011A, LGC Promochem). These samples were all collected in October 2012; those taken from the Main Chamber (n = 3) and North Gallery (n = 3) corresponded to vertical seepage, while the samples collected in the South Gallery (n = 3) were taken from the rimstone pool at the end of the gallery. Air current measurements were taken using an anemometer (TESTO 405) at the ends of the North and South Galleries and in the middle of the Main Chamber.

III.3.1.2.3. *Observation and identification of algal species*

Five different biofilms were sampled with a sterile swab for the performance of algal taxonomic identification (3 in the Main Chamber and 2 in the South Gallery). All these biofilms were located on carbonate formations such as stalagmites, limestone walls or massive columns. The algal identification was based on the observation of each alga's morphological characteristics under a microscope, aided by "The Freshwater Algal Flora of the British Isles; an identification guide to freshwater and terrestrial algae" identification key (John *et al.*, 2002). The key factors used for identification were the size and the shape of the cells and chloroplasts.

III.3.1.2.4. *Biofilm measurements*

Several field studies were conducted during October and November 2012 to understand the repartition of the areas colonized by green epilithic biofilms in the cave. The goal of these studies was to correlate the surfaces colonized by biofilm with several environmental factors: photosynthetically active radiation (PAR), distance to light source, localization in the cave and characteristics of the physical support on which the biofilm grows. First, the surface colonized by green epilithic biofilms (surface variable) was estimated using image analysis software (ImageJ 1.47). Each biofilm was photographed and the pictures uploaded to ImageJ. After setting the scale, the colonized surface in cm² was automatically calculated by drawing the outline of the biofilm. Next, the following factors were obtained for each measured biofilm.

- The PAR (parlight variable) was measured with a PAR-meter (expressed in $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
- The distance to the light source (distlight variable) was measured using a lasermeter (expressed in m).
- The localization of the biofilm in the cave (loca variable) was noted and divided into three categories: Main Chamber, North Gallery and South Gallery.
- The characteristics of the physical support (physup variable) were described and divided into low, medium and high categories.

The description of the physical support was based on visual observations of its characteristics, including roughness and presence or absence of sedimentary deposits (low: smooth surface and absence of sediments; medium: low roughness and presence or absence of sediments; high: high roughness and presence or absence of sediments). Roughness and exogenous deposits were chosen as criteria in the construction of the physical support categories because they are among the most important factors influencing microorganism anchorage (Prieto and Silva, 2005; Miller *et al.*, 2012).

III.3.1.2.5. *Biofilm selection and experimental design*

Four different homogenous and sufficiently large biofilms were selected for colorimetric measurements (see section 2.6 for details) and UV-C treatment (see section 2.7 for details). **Table III.3-1** summarizes the characteristics of the four selected biofilms.

Table III.3-1: Characteristics of the four selected biofilms with associated experiments.

Biofilm	Localization	Surface type	Experiment	Colonization area (cm ²)	PAR (μmol photons m ⁻² s ⁻¹) Mean ± SD
LrB	Main Chamber	Limestone rock + clay sediments	2	485.15	2.66 ± 1.39
LwB1	South Gallery	Limestone wall + thin calcite film	1-2	282.44	1.05 ± 0.10
LwB2	South Gallery	Limestone wall + thin calcite film	2	448.85	1.34 ± 0.02
StmB	South Gallery	Stalagmite + clay sediments	1-2	100.91	14.46 ± 0.40

PAR: photosynthetically active radiation (SD: standard deviation)

Colonization state diagnosis (experiment 1)

Two different biofilms were chosen for experiment 1. The first biofilm was located on a limestone wall (LwB1) and the second on a stalagmite (StmB) (see **Figure III.3-1** for localization). Colorimetric measurements were taken of both uncolonized and colonized surfaces of the same support for LwB1 and StmB. Twenty and 12 randomly selected points were measured for each biofilm on LwB1 and StmB, respectively, whether colonized or not. The mean L* and a* values obtained from these measurements were statistically analyzed to assess potential differences between them. The deviation values (dL* and da*) were calculated using the following equation:

$$dL^* = L1^* - L0^*; da^* = a1^* - a0^*$$

where L1* and a1* are average values obtained from the colonized surfaces and L0* and a0* are those obtained from the uncolonized surfaces (reference values). Negative dL* and da* values indicated that the biofilms were greener and darker than the reference.

UV-C treatment and colorimetric monitoring (experiment 2)

Three UV-C-treated biofilms (LrB, LwB2 and StmB) and one control biofilm (LwB1) were chosen for experiment 2. LrB was located on a limestone rock, LwB1 and LwB2 on a limestone wall and StmB on a stalagmite (LwB1 and StmB were taken the same location as

those in experiment 1) (see **Figure III.3-1** for localization). Randomly selected points were numbered on a sheet of transparent paper according to the size of the biofilm, meaning a different number of measurements was performed for each biofilm (n = 30 for LrB, n = 25 for LwB2, n = 12 for StmB and n = 20 for LwB1; see Table 1 for details on the sizes of the selected biofilms). These points were used for colorimetric measurements performed over time at the same locations. The first colorimetric measurement (named “REF”) was taken before UV-C treatment and the second (named “1day”) took place immediately after irradiation. The following measurements were performed at different time intervals depending on the treated biofilm. UV-C treatment was administered at the beginning of June 2012 for LrB and monitoring was concluded in September 2013 (“16 months”). LwB1, LwB2 and StmB were irradiated at the end of May 2013, with the last measurement taken in September 2013 (“4 months”).

III.3.1.2.6. *Colorimetric measurements*

Colorimetry was performed with a spectrophotometer (CM-600d KONICA MINOLTA, illuminant D65, SCI mode and 8-mm-diameter target mask) equipped with SpectraMagic NX Pro Software and using the CIELAB color system, which is comprised of three axes in a spherical form, L*, a* and b*. The dark-light scale (L*) is associated with the lightness of the color and moves from bottom (value: 0, black) to top (value: 100, white). The a* and b* scales are associated with changes in redness-greenness (positive a* is red and negative a* is green) and in yellowness-blueness (positive b* is yellow and negative b* is blue). Both the L* and a* values were chosen for this study because they reflect the presence of a green biofilm better than the b* values (L* indicates darkening and a* greening).

III.3.1.2.7. *UV-C treatment*

Irradiation was performed with a UV-C box containing two lamps (PURITEC HNS, 11 W each = 22 W, λ max = 254 nm, treated glass to avoid ozone creation). Each treatment took place with the lamps having alternating periods of being on (30 min) and off (15 min) for 12 h (corresponding to 8 h of exposure). The irradiation took place at night, while the cave was closed to visitors (between 8pm and 8am), and the UV-C box was hermetically sealed with black plastic to avoid UV-C dispersion around the treated area. A photoradiometer (Delta OHM HD 2102.2 with a UV-C probe) was placed in the box to measure the effective

irradiation in kJ m^{-2} . Each treated biofilm received a dose of 180 kJ m^{-2} , which was pre-selected after preliminary tests indicating total chlorophyll bleaching had been performed in laboratory conditions.

III.3.1.2.8. *Statistical analyses*

The variables area, parlight and distlight were not normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test) and were therefore log-transformed for further analysis. Distlight, shown by preliminary monovariate analysis to co-vary with parlight, was not included in the model.

To determine whether the measured environmental parameters could explain the areas colonized by green epilithic biofilms (area), the explanatory variables parlight, loca and physup were included in a linear model. Parlight was placed first because it was considered a limiting factor and could explain the size of the area colonized by algae. Loca was placed second because each part of the cave presented different environmental and tourism-dependent factors that may have played a key role in the distribution of algae. The variable physup was placed last and a Fisher test was then performed. Finally, to highlight potential differences from one colonized area to another with respect to biofilm localization, a Tukey HSD test was used to perform pairwise comparisons on the variable loca.

Potential differences in the colorimetric measurements (using parameters L^* and a^*) were analyzed by comparing uncolonized to colonized surfaces on LwB1 and StmB using a Fisher test after checking for normality (one-sample Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variance (F-test of equality of variance, comparison between 2 groups).

To highlight potential differences between the days of measurement for the treated biofilms on LwB2, LrB and StmB, Friedman tests and multiple comparisons between groups (Friedmanmc in library pgirmess) were used as paired samples.

All statistical analyses were performed using R.2.14 software ([R Development Core Team, 2011](#)) at a significance level of 0.05.

III.3.1.3. Results

III.3.1.3.1. *Physico-chemical parameters*

According to our measurements and those obtained from the CDSJ, the temperatures in Moidons Cave were highly stable over the course of a year (mean: $9.7 \pm 1^\circ\text{C}$). The air

humidity rate was close to 90 % in all parts of the cave. Weak air currents flowing in a south-north direction were measured from the original entrance (near LrB in the Main Chamber) to the North Gallery (0.1 m s^{-1}). No air current was detected in the South Gallery (0 m s^{-1}). The CO₂ rates recorded by the CDSJ from July 2009 to July 2012 showed seasonal variations, with a CO₂ peak at the end of summer (August-September, mean: $1.18 \pm 0.22 \%$) that declined at the end of winter (March-April, mean: $0.30 \pm 0.25 \%$). The mineral analysis showed that the water in the three parts of the cave was weakly mineralized. The potassium and phosphorus levels were $< 0.01 \text{ mM}$ in all three areas. The sodium levels were 0.030 ± 0.003 , 0.022 ± 0.001 and $0.025 \pm 0.001 \text{ mM}$ and the magnesium levels were 0.034 ± 0.001 , 0.030 ± 0.000 and $0.036 \pm 0.001 \text{ mM}$ in the North Gallery, Main Chamber and South Gallery, respectively (values are expressed in mean \pm SD).

III.3.1.3.2. *Epilithic biofilm composition and growth-influencing factors*

Three algal species were identified at the genus or species level according to microscopic observations and their morphological characteristics. *C. minutissima* (Fott and Nováková) appeared to be the most widespread alga in all the sampled biofilms, and its identification was based on its small size (<2 to $\sim 3 \mu\text{m}$) and saucer-shaped chloroplasts. We also observed two other algal genera, *Bracteacoccus* sp. ($5\text{-}9 \mu\text{m}$) and *Scenedesmus* sp. (4- or 8-celled and joined laterally, with the presence of spines).

One hundred and fifteen areas colonized by green epilithic biofilms were measured and included in our database. Among these, 24, 42 and 49 were observed in the North Gallery, Main Chamber and South Gallery, respectively, and 63, 40 and 12 were observed on speleothems, limestone walls with calcite and limestone rock without calcite, respectively. In addition, 35, 42 and 38 biofilms were measured in the low, medium and high physical support categories, respectively. Fifty-one percent of the colonized areas were observed in the Main Chamber and 45 % were observed in the South Gallery, with areas of 11,855.8 and 10,443.1 cm^2 , respectively. No colonized areas were observed in the final section of the South Gallery (dashed square in **Figure III.3-2**). The colonized areas in the North Gallery represented 4 % of the total surface area observed (953.1 cm^2). The cave's biofilm sizes ranged from 1.07 to 5672.05 cm^2 , with the largest ($> 0.5 \text{ m}^2$) found on a massive column in the Main Chamber. The distance from a light source varied from 0.21 to 6.48 m, but a biofilm was observed on the ceiling of the Main Chamber more than 17 m from the closest light source (not included in

our database). The average PAR received on the biofilms was $4.04 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and ranged from 0.02 to $46.18 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Half of the measured biofilms received less than $1.32 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on average.

The results obtained from the linear model indicated that *loca* was the only significant variable ($p = 0.0001$), explaining approximately 14 % of the variability of the size of biofilms (partial $R^2 = 0.139$). The variables *parlight* ($p = 0.1708$) and *physup* ($p = 0.0647$) were not significant. Thus, when performing pairwise differences (Tukey HSD test), the colonized area in the North Gallery appeared to be significantly smaller than those in the Main Chamber ($p = 0.0002$) and South Gallery ($p = 0.0002$) (**Figure III.3-2 A**). However, no significant difference was observed between the Main Chamber and South Gallery.

Figure III.3-2 B shows the functional dynamics for the water circulation (i.e., the drainage system and vertical seepage) and air currents, in addition to tourism-dependent factors such as human presence and illumination time according to their localization in the cave. Four distinct cave sections were established. The first was situated at the end of the South Gallery (dashed square) and corresponds to the uncolonized and unvisited portion of the cave. This section showed a high degree of water circulation (in terms of drainage system and vertical seepages) and a very low illumination time (2 min per visit, corresponding to the duration of the sounds and lights at the end of each visit). The second section of the South Gallery exhibited a high level of water circulation, moderate human presence (10 min per visit) and moderate illumination time (25 min per visit). No air currents were detected in any part of the South Gallery. The Main Chamber (the largest part of the cave) was characterized by high water circulation, heavy human presence (25 min per visit) and high illumination time (approx. 45 min over an entire visit). The Main Chamber also had weak air currents (0.1 m s^{-1}). Finally, Figure 2B shows that the North Gallery was an isolated part of the cave in terms of water circulation (low vertical seepages) and illumination time (low, at 10-15 min per visit).

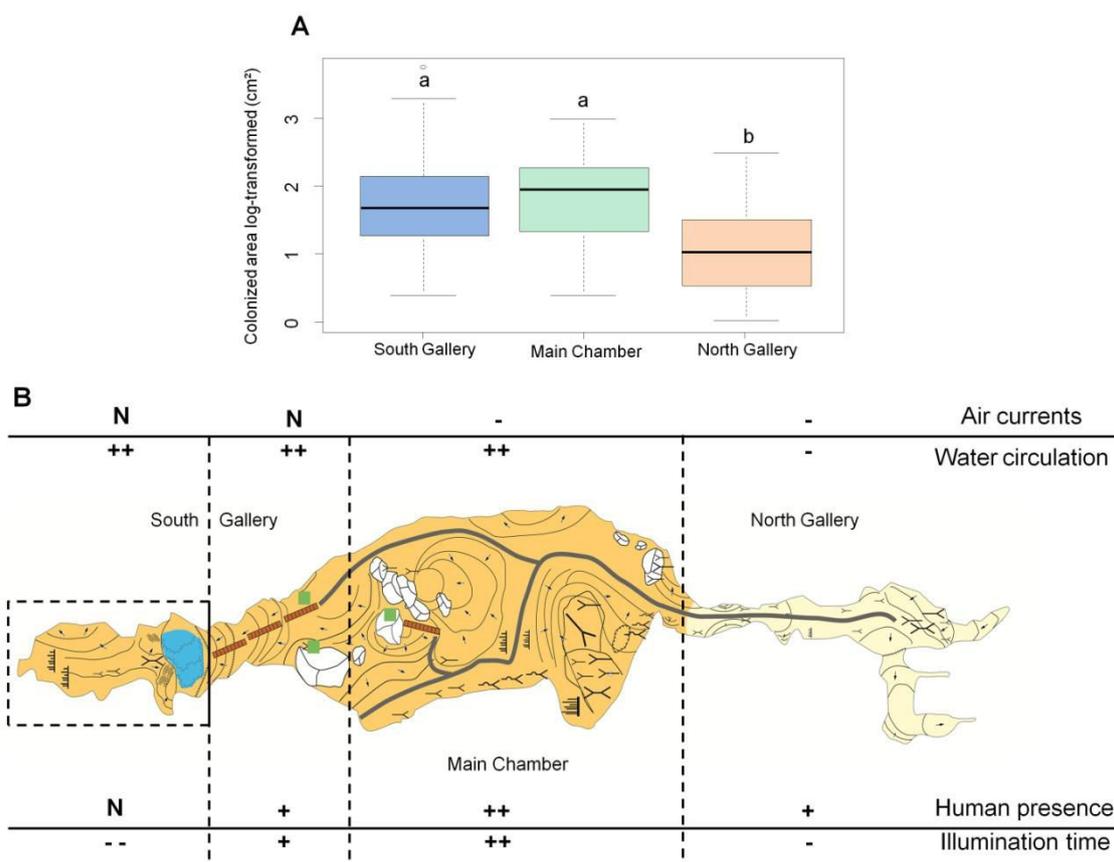


Figure III.3-2: Relationships between algae colonization and environmental factors. (A) Colonized areas in cm² (log-transformed) according to localization in the cave. Different letters indicate significant differences (pairwise comparisons, Tukey HSD test). (B) Functional dynamics (air currents and water circulation) and tourism-dependent factors (human presence and illumination time) according to cave localization. Water circulation includes horizontal circulation (drainage system) and vertical seepage. Parameters are classified as none (N), very low (- -), low (-), moderate (+) or high (++). The dashed square represents an uncolonized and unvisited portion of the cave.

III.3.1.3.3. *Colorimetric measurements and UV-C treatment of selected biofilms*

The colorimetric measurements' graphical and statistical results obtained from comparisons of the uncolonized and colonized surfaces (L^* and a^* scales, experiment 1) are summarized in **Figure III.3-3** and **Table III.3-2**. For LwB1, both the mean L^* and a^* values measured on the uncolonized surface (73.78 ± 4.22 and 1.21 ± 0.73 , respectively) differed significantly ($p < 0.001$) from those on the colonized surface (62.80 ± 4.67 and -0.62 ± 1.29 , respectively). Furthermore, the mean L^* and a^* values measured on the uncolonized surface for StmB (49.16 ± 5.18 and 7.40 ± 1.30 , respectively) also differed significantly ($p < 0.001$) from those on the colonized surface (29.65 ± 7.64 and -1.93 ± 2.22 , respectively). The deviation values (dL^* and da^*) also indicated that the surfaces colonized by algae were darker

and greener. The deviation values measured for LwB1 were -10.98 and -1.83 for dL* and da*, respectively, while the deviation values for StmB were greater (-19.51 for dL* and -9.33 for da*) and suggested a more pronounced colonization state (increased thickness) than that on LwB1. The results obtained for LwB2 and LrB indicated similar deviation values between their uncolonized and colonized surfaces compared to LwB1 (data not shown), suggesting similar colonization states and biofilm thicknesses.

Table III.3-2: Statistical results of colorimetric measurements between uncolonized and colonized surfaces both for LwB1 and StmB.

Biofilms	Colorimetric parameters	Uncolonized surface Mean ± SD	Colonized surface Mean ± SD	p-value
LwB1	L*	73.78 ± 4.22	62.80 ± 4.67	2.1 × 10 ⁻⁹
	a*	1.21 ± 0.73	-0.62 ± 1.29	1.5 × 10 ⁻⁵
StmB	L*	49.16 ± 5.18	29.65 ± 7.64	2.5 × 10 ⁻⁷
	a*	7.40 ± 1.30	-1.93 ± 2.22	1.6 × 10 ⁻¹¹

LwB1: biofilm on limestone wall; StmB: biofilm on stalagmite. L*: dark-light scale; a*: green-red scale. SD: standard deviations. P-value was obtained with a Fisher test.

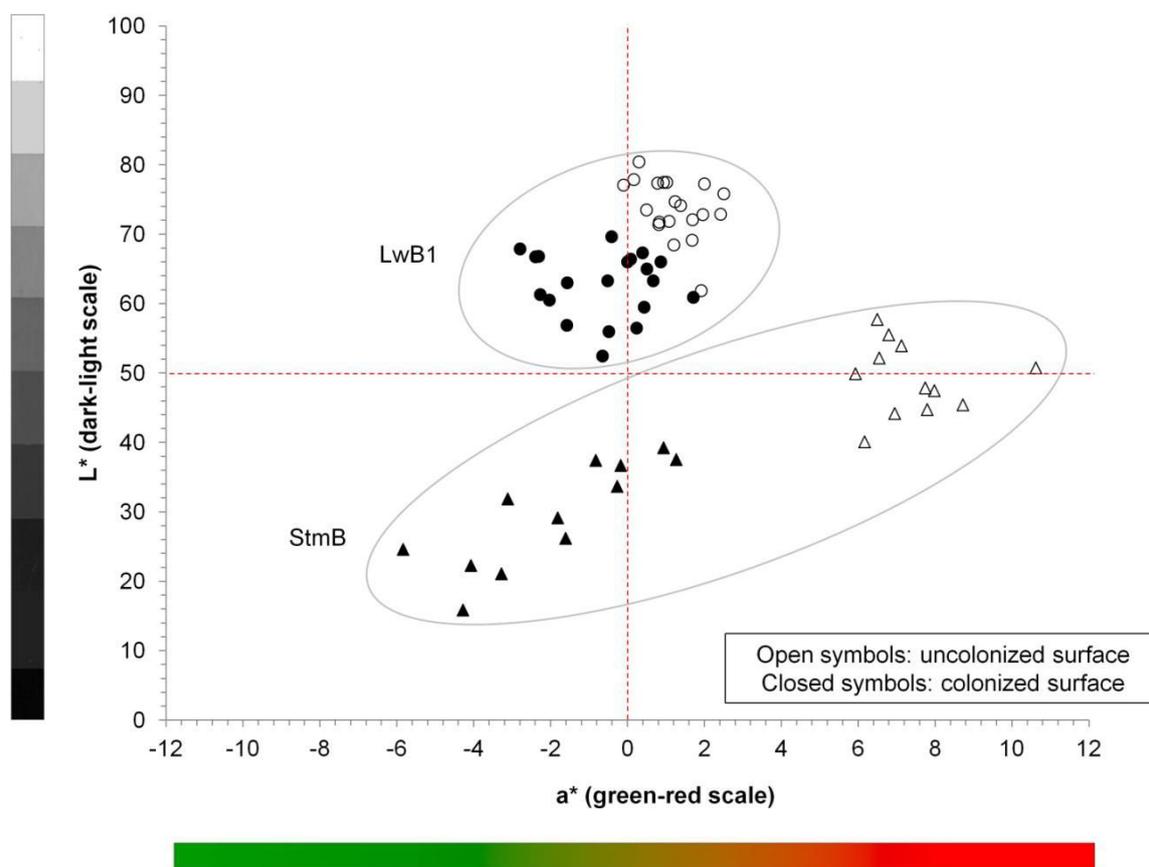


Figure III.3-3: Scatter plots of spectrocolorimetric data for both the uncolonized and colonized surfaces. x-axis: green-red scale; y-axis: dark-light scale. Circles: biofilm on limestone wall (LwB1, n=20); triangles: biofilm on stalagmite (StmB, n=12). The dashed red lines represent the limits between dark and light measurements (horizontal line) and between green and red measurements (vertical line). The statistical results for these data are presented in Table 2.

In terms of the colorimetric status measured during experiment 2, **Figure III.3-4** shows no significant changes in the L* or a* scales of the control biofilm over the 4 months of monitoring. In contrast, changes in the colorimetric measurements were observed when biofilms were subjected to one UV-C treatment of 180 kJ m^{-2} . Indeed, significant differences were observed ($p < 0.05$) between the REF values and post-treatment measurements (at “1 month”, “2 months” and “4 months”), for both the L* and a* parameters in LwB2. The L* values measured at “1day”, “1 month”, “2 months” and “4 months” for StmB differed significantly from the REF values ($p < 0.05$), and the a* values measured at “1week”, “1 month”, “2 months” and “4 months” differed significantly ($p < 0.05$) from the measurements taken before UV-C treatment (REF value) for StmB.

The results obtained for LrB, monitored over 16 months, were slightly different from

those obtained for the other samples. Indeed, significant changes ($p < 0.05$) in the colorimetric measurements were always observed one year after UV-C treatment for both the L^* and a^* values (**Figure III.3-5**). However, the last measurement (“16 months”) did not differ significantly from those taken prior to UV-C treatment in terms of its L^* and a^* values, indicating re-darkening and re-greening phenomena in the treated biofilm. This result was confirmed by photographic monitoring (pictures in **Figure III.3-5**) of LrB, in which a re-colonization phenomenon was observed near the light source (white arrow).

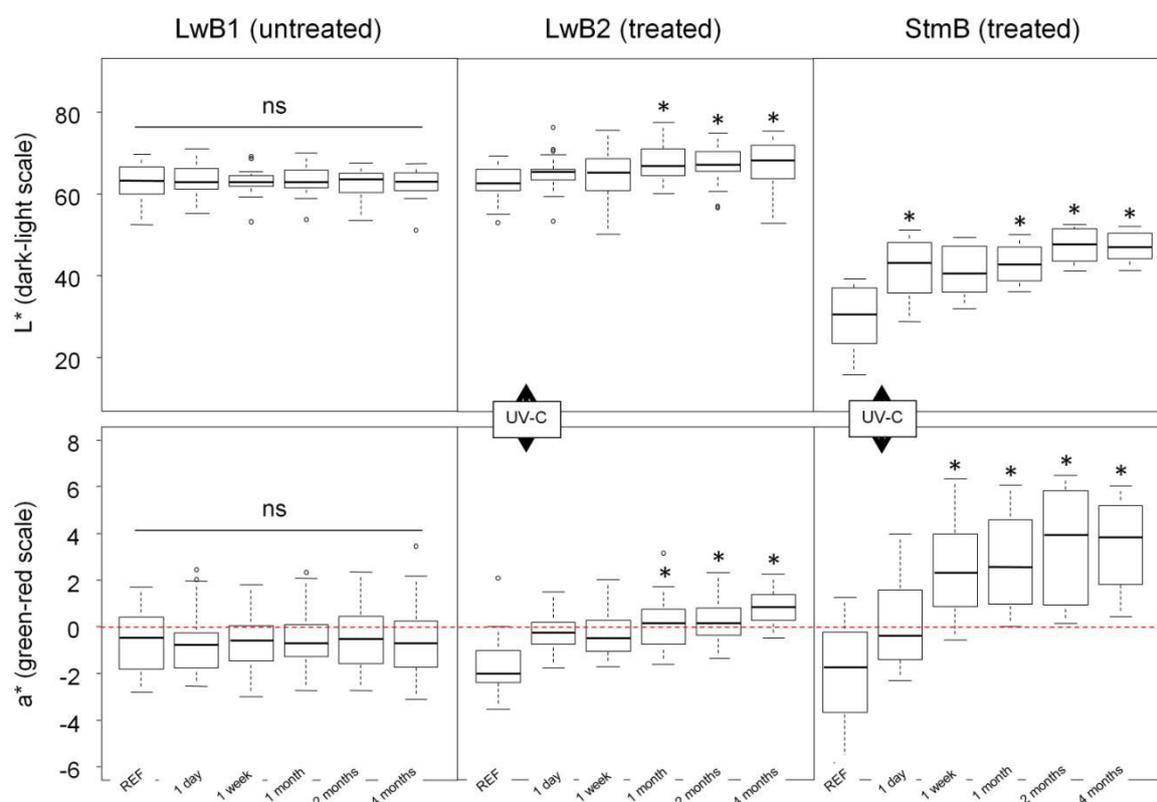


Figure III.3-4: Colorimetric measurements according to post-UV-C irradiation period for the control and treated biofilms on the limestone wall and stalagmite. LwB1: untreated biofilm on limestone wall, $n=20$; LwB2: treated biofilm on limestone wall, $n=25$; StmB: treated biofilm on stalagmite, $n=12$. REF corresponds to the measurement performed before UV-C treatment and the dashed red line represents the limit between the green and red measurements. The stars represent significant differences compared to the REF value (Friedman multiple-comparison test for paired samples, $p < 0.05$) and ns means non-significant.

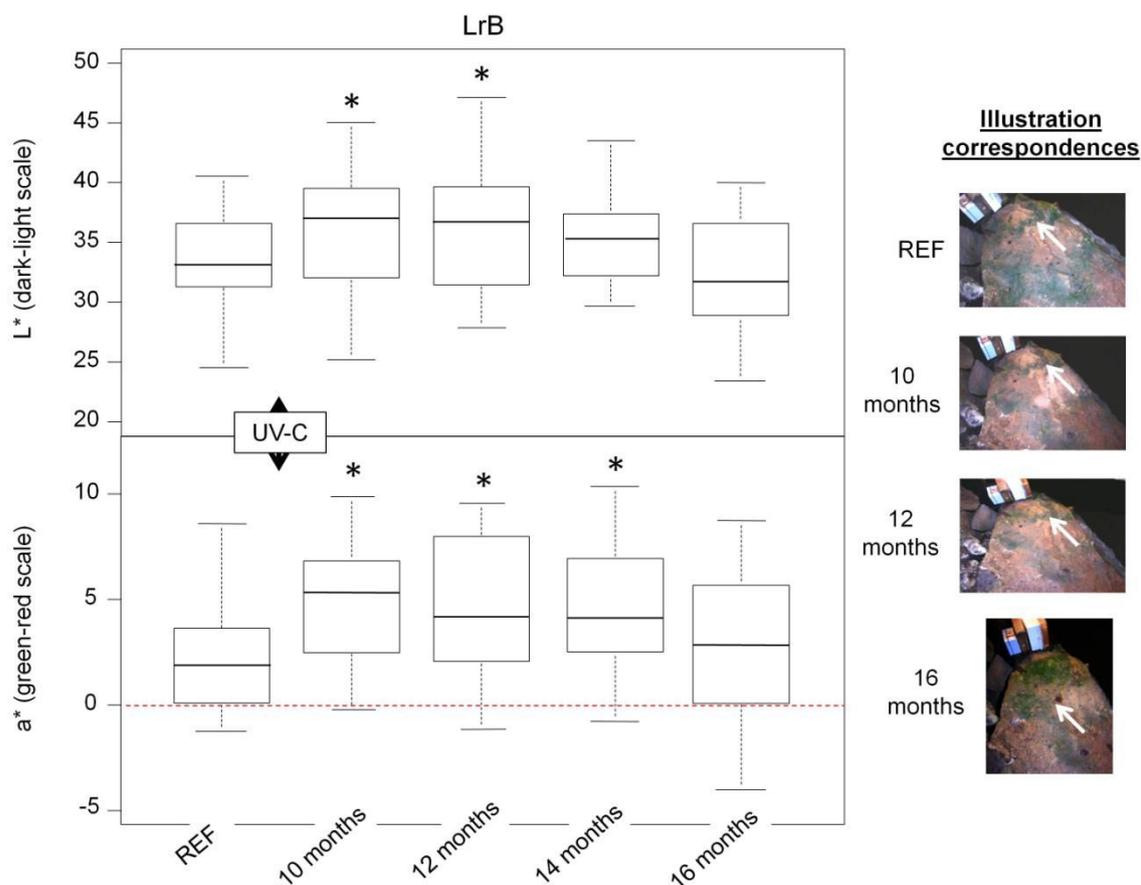


Figure III.3-5: Colorimetric measurements according to post-UV-C irradiation period for LrB. LrB: treated biofilm on limestone rock, $n=30$. REF corresponds to the measurement performed before UV-C treatment, and the dashed red line represents the limit between the green and red measurements. The stars represent significant differences compared to the REF value (Friedman multiple-comparison test for paired samples, $p < 0.05$), and the pictures represent LrB at different times. The white arrows indicate the re-colonized area during the post-UV-C irradiation period.

III.3.1.4. Discussion

To date, no other research has been reported on colorimetric measurements in conjunction with the colonization of epilithic algae biofilms in cave environments. Our study is also the first published report on the effects of UV-C on multiple biofilms found inside a cave.

III.3.1.4.1. Epilithic biofilm composition

The lampenflora communities in Moidons Cave were composed mainly of *C. minutissima*, while *Scenedesmus* sp. and *Bracteacoccus* sp. made only a minor contribution to the total algal content. In other cases of epilithic algae proliferation, *Chlorella* and

filamentous cyanobacteria have been reported mainly in subterranean environments such as the Cango Caves of South Africa (Grobbeelaar, 2000), Katerinska Cave in the Czech Republic (Faimon *et al.*, 2003) and the karst caves of Slovenia (Mulec *et al.*, 2008). In addition, Mulec *et al.* (2008) and Gaylarde and Gaylarde (2000) have indicated that eukaryotic algae, mainly Chlorophyta, are initial colonizers, and that Cyanobacteria become predominant only later in an environment's algal succession. However, successional assembly has not occurred in Moidons Cave because the site's owners frequently remove biofilms by manual or chemical means. Thus, no cyanobacteria were observed during this study's microscopic analyses. Among the first colonizers, *C. minutissima* was predominant because, owing to its physiological capabilities (i.e., its picoplanktic size), it can adapt to low temperatures and very weakly mineralized water (Aleya *et al.*, 2011). Its presence among a low number of other taxa therefore suggested that the community failed to build complexity due to the constraints imposed by the cave itself. This failure prevented the successional assembly from adhering to a common pattern of increasing biomass, species diversity and complexity of interactions among the species present.

III.3.1.4.2. *Relationship between environmental factors and algal colonization*

To identify factors that may have triggered the installation and proliferation of epilithic algae in Moidons Cave, a set of parameters was identified and measured within the cave system and on colonized surfaces. We first attempted to explain the size of these areas through PAR, localization within the cave and characteristics of the physical support. Of these factors, only cave localization furnished a partial explanation, whereas PAR and characteristics of the physical support were unrelated. Functional dynamics and tourism-dependent factors may also have helped to explain this cave's colonization state, so we took into account a description of the cave's geomorphology, water circulation and air currents as well as human presence and illumination time. For example, looking at the end of the South Gallery (dashed square in **Figure III.3-2**), where no biofilm presence was observed, it could be argued that viable spores or cells could not reach this area due to an absence of both air currents and visitors (Grobbeelaar, 2000; Jurado *et al.*, 2008; Mulec *et al.*, 2008; Albertano, 2012).

An alga's growth-supporting conditions must be considered even if the vectors involved in their transport are essential for algal presence. The present results showed that the North

Gallery was less colonized than either the Main Chamber or the beginning of the South Gallery. Despite the presence of algal transport vectors (weak air currents and low human presence time) in the North Gallery, which may have sufficed to transport algae spores and cells into these sections, the low vertical seepage and illumination time may have been responsible for the limited proliferation in this part of the cave. We thus hypothesized that illumination time may have been of even greater importance than vertical seepage as a limiting factor in the spread of epilithic algal biofilms into the North Gallery. A previous study (Mulec *et al.*, 2008) has shown that there is no correlation between the vertical seepage of charged mineral water and algal growth. Nutrients may be directly absorbed by algae from rocky surfaces through biochemical processes (Warscheid and Braams, 2000; Scheerer *et al.*, 2009; Albertano, 2012), while analyses of mineral contents in Moidons Cave suggested that the waters were only weakly mineralized. Moreover, according to Martinez and Asencio (2010), who have studied the distribution of cyanobacteria in Gelada Cave (Spain), the availability of light is the primary limiting factor for microorganism proliferation, followed by humidity, lack of nutrients and temperature. Our results confirmed this statement because the total colonized surface in the Main Chamber, where high illumination times (45 min per visit) were present, reached 11,855.8 cm², whereas the total colonized surface in the North Gallery did not exceed 960 cm².

This study suggested that epilithic algae implantation was governed by complex interacting factors, with vectors such as air currents and visitors playing a key role in algal development. In addition, the illumination time during visits, or the quantity of available light throughout the year, appeared to be the main driver of green biofilm development and proliferation. Instantaneous measurements of PAR on the biofilms did not explain the colonization state because the algae were capable of growing under a wide range of PAR values, from 0.02 to 46.18 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

III.3.1.4.3. *Usefulness of colorimetric measurements for colonization state diagnosis*

Many authors have shown that colorimetric measurements are an efficient and non-destructive method of quantifying or analyzing the physiological state of phototrophic organisms (Prieto *et al.*, 2004; Vazquez-Nion *et al.*, 2013; Cutler *et al.*, 2013). For example, Sanmartin *et al.* (2010) have shown that CIELAB color parameters (L*, a* and b*) are

correlated with the chlorophyll a, carotenoid and phycocyanin contents, respectively, in two stone biofilm-forming cyanobacteria. Similarly, Prieto *et al.* (2004) have observed a good linear relationship between colorimetric measurements and the amount of cyanobacterial cells deposited on filters. In the present study, the colorimetric measurements of uncolonized and colonized surfaces differed depending on the presence of algae. Indeed, darkening and greening phenomena were observed when surfaces were colonized by green biofilms (corresponding to decreases in the mean L* and a* values and negative dL* and da* values). According to the results obtained for two different biofilms (LwB1 and StmB), these darkening and greening phenomena were detectable regardless of the surface type. LwB1 had a rough white surface (limestone wall with irregularities), while StmB had a smoother brown surface (stalagmite with some sedimentary deposits). In addition to the information furnished by the L* and a* values, the deviation values (dL* and da*) could be used to determine colonization intensity (indicating biofilm thickness), as shown by Cutler *et al.* (2013) in stone heritage structures. For instance, the more accentuated deviation in StmB indicated more pronounced colonization and a thicker biofilm compared to that in LwB1. These findings may have been linked to surface characteristics and light availability. The presence of clay sediments (nutrient uptake) and high PAR (approx. 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on StmB provided growth-supporting conditions sufficient for the formation and development of a thicker, greener biofilm.

Our study indicated that colorimetric measurements were a suitable tool with which to evaluate the colonization states in show caves and monitor algal proliferation over time.

III.3.1.4.4. *Algal proliferation control using UV-C treatment*

Despite strong criticism, physical and chemical methods have been widely used in cave habitats to clean carbonate formations threatened by algal greening. In this study, germicide UV-C treatment was used as a non-toxic physical method that induced no surface damage. A single UV-C exposure period was chosen to compare the efficiency of UV-C treatment for biofilms according to the intensity of the initial surface colonization. Changes in the L* and a* values of both LwB2 and StmB were observed 1 month after UV-C treatment, suggesting the UV-C's strongly delayed impact on the colorimetric status of the treated biofilms. Furthermore, photographic monitoring of these two biofilms (data not shown) indicated full bleaching of LwB2 after UV-C treatment (i.e., disappearance of the greening aspect), whereas

a weak green color persisted after the UV-C treatment of StmB. As previously discussed, the biofilm on StmB was thicker than the other selected biofilms (LwB1, LwB2 and LrB). These findings were in agreement with our previously published results (Borderie *et al.*, 2011), indicating that the efficiency of UV-C treatment was primarily influenced by the thickness of the treated biofilm. In fact, the underlying cells benefited from the protective shield of overlying cells that absorbed the UV-C irradiation. As observed for StmB, two 8-hour UV-C treatments would have been necessary to induce complete bleaching in a thick green algal biofilm.

The LrB biofilm was monitored for 16 months, and the results suggested that the changes in the colorimetric measurements were observed for a year after UV-C treatment. However, re-greening and re-darkening phenomena were noted 16 months after UV-C treatment, confirmed by the visual observation of new green algal biofilm colonization (**Figure III.3-5**). These results showed that, as a cleaning method, UV-C treatment was effective for at least one year, but that biological colonization dynamics were not halted. Indeed, LrB was located in an area favoring rapid algal colonization: it was i) in the Main Chamber, thus receiving sufficient illumination time and vertical seepage; ii) near the original entrance, thus receiving air currents from outside; and iii) near the walkway on which hundreds of visitors pass daily. As mentioned above, these parameters were growth-supporting conditions for both the implantation and proliferation of epilithic algal biofilms. The environmental pressures present in the cave (temperature near 10° C, low available light) were greater and more sustained than any of the other variables, allowing tolerant *C. minutissima* more time free of competition from other less tolerant algal species to occupy the niche.

UV-C treatments appear to be a suitable method to eliminate and control algal proliferation since they are efficient to kill and bleach algae. Moreover, it seems to be more appropriate than pulverized solutions like hydrogen peroxide or chlorine compounds widely used in show caves. Indeed, these products are also efficient for cleaning carbonate formations but they can easily reach other places on the walls or the ceilings by dispersion and aerosols' production, and may affect cave animal populations like insects and bats (European Protected Species under the Conservation of Natural Habitats and of Wild Fauna and Flora, 1992). UV-C treatment is a well-designed and well-controlled system because only the target area is treated and impacts on cave animals are thus limited. In our study, we

performed UV-C treatments with a hermetic process and systematic and careful observations have been done before UV-C exposures to ensure that no troglaphiles or troglobies were present on the treated area. Finally, a systematic fauna inventory and ecosystemic evaluation must be done in the cave before UV-C treatment to understand the biodiversity and the dynamic of the algae development and adapt the best treatment strategy. Moreover, cave fauna can be collected before treatment and released on an untreated area to limit cave animals' exposure.

III.3.1.5. Conclusion

New avenues for understanding the processes of epilithic algal biofilm colonization in cave environments were obtained in this study by combining UV-C irradiation with colorimetric assessment. Our research provided interesting and encouraging results concerning the efficiency of UV-C treatment at combating algal proliferation. The analysis of hypothetical factors influencing algal growth, such as physico-chemical variables, functional cave dynamics and tourist activity, constituted a suitable approach to understanding how algae can colonize rocky or carbonate surfaces in caves. To increase our knowledge of the effects of UV-C irradiation on epilithic biofilms, the monitoring of the LwB2 and StmB areas must continue with the use of LrB to determine whether colonization dynamics are similar in these parts of the cave. Furthermore, analysis of microbial communities by DNA sequencing and flow cytometry, before and after irradiation, may help improve our understanding of the diversity and ecology of microbial communities subjected to UV-C treatment.

Tests that apply our findings to the cleaning of colonized stone surfaces, such as historical monuments and building facades threatened by microbial epilithic biofilms, will further our understanding of how such surfaces are affected by UV-C treatment.

Finally, as stated in the introduction, caves with historical paintings are also subjected to algal colonization. We chose UV-C irradiation as an alternative method with which to treat algal colonization on rock surfaces because it does not alter mineral matrices. However, there has been concern about the effects of UV-C on prehistoric paintings. Can UV-C bleach or damage this valuable prehistoric heritage? Preliminary results obtained in laboratory conditions suggested that no changes occurred to the mineral matrices (observed by analysis of X-ray diffraction) or the color of several mineral pigments after long UV-C exposure (data not shown). However, further experiments need to be performed to support these findings.

Acknowledgments

We would like to thank the owners of Moidons Cave, Ms Isabelle and Mr François Gauthier, who kindly gave us permission to access the cave and conduct all our field experiments. We also thank S. Colin (Comité Départemental de Spéléologie du Jura) for his CO₂ data recordings in Moidons Cave and N. Crini, C. Amiot and C. Druart for their water analysis. Finally, financial support was kindly and thankfully provided by the Ministère de la Culture et de la Communication (50 %), the Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS (25 %) and the Région de Franche-Comté (25 %). We are indebted to the Editor Professor C.E.W. Steinberg and two anonymous reviewers whose comments greatly improved the manuscript.

References

- Albertano, P., 2012. Cyanobacterial biofilms in monuments and caves. In: Whitton BA, editor. Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time. Netherlands: Springer; 2012. p. 317–43.
- Aleya, L., 1991. The concept of ecological succession applied to an eutrophic lake through the seasonal coupling of diversity index and several parameters. *Archiv für Hydrobiologie*, 120, 327-343.
- Aleya, L., Dauta, A., Reynolds, C.S., 2011. Endogenous regulation of the growth-rate responses of a spring-dwelling strain of the freshwater alga, *Chlorella minutissima*, to light and temperature. *European Journal of Protistology* 47, 239-244.
- Borderie, F., Alaoui-Sehmer, L., Raouf, N., Bousta, F., Oriol, G., Rieffel, D., Alaoui-Sossé, B., 2011. UV-C irradiation as a tool to eradicate algae in caves. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 579-584.
- Büchert, A.M., Civello, P.M., Martínez, G.A., 2011. Effect of hot air, UV-C, white light and modified atmosphere treatments on expression of chlorophyll degrading genes in postharvest broccoli (*Brassica oleracea* L.) florets. *Scientia Horticulturae* 127, 214-219.
- Chairat, B., Nutthachai, P. and Varit, S., 2013. Effect of UV-C treatment on chlorophyll degradation, antioxidant enzyme activities and senescence in Chinese kale (*Brassica oleracea* var. alboglabra). *International Food Research Journal* 20, 623-628.
- Costa, L., Vicente, A.R., Civello, P.M., Chaves, A.R., Martínez, G.A., 2006. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biology and*

Technology 39, 204-210.

Cutler, N.A., Viles, H.A., Ahmad, S., McCabe, S., Smith, B.J., 2013. Algal ‘greening’ and the conservation of stone heritage structures. *Science of The Total Environment* 442, 152-164.

Faimon, J., Stelcl, J., Kubesová, S., Zimák, J., 2003. Environmentally acceptable effect of hydrogen peroxide on cave "lamp-flora", calcite speleothems and limestones. *Environmental Pollution* 122, 417-422.

Gao, Y., Cui, Y., Xiong, W., Li, X., Wu, Q., 2009. Effect of UV-C on Algal Evolution and Differences in Growth Rate, Pigmentation and Photosynthesis Between Prokaryotic and Eukaryotic Algae. *Photochemistry and Photobiology* 85, 774-782.

Gaylarde, P.M., Gaylarde, C.C., 2000. Algae and cyanobacteria on painted buildings in Latin America. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 93-97.

Grobbelaar, J.U., 2000. Lithophytic algae: A major threat to the karst formation of show caves. *Journal of Applied Phycology* 12, 309-315.

Groth, I., Vettermann, R., Schuetze, B., Schumann, P., Saiz-Jimenez, C., 1999. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *Journal of Microbiological Methods* 36, 115-122.

John, D. M., Whitton, B. A., Brook, A. J., 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Cambridge University Press, UK.

Jurado, V., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C., 2008. Entomogenous fungi and the conservation of the cultural heritage: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 325-330.

Lefèvre, M., 1974. La maladie verte de Lascaux. *International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works* 19, 126-156.

Martinez, A., Asencio, A.D., 2010. Distribution of Cyanobacteria at the Gelada Cave (Spain) by physical parameters. *Journal of Cave and Karst Studies* 72, 11-20.

Menetrez, M.Y., Foarde, K.K., Dean, T.R., Betancourt, D.A., 2010. The effectiveness of UV irradiation on vegetative bacteria and fungi surface contamination. *Chemical Engineering Journal* 157, 443-450.

Miller, A.Z., Sanmartín, P., Pereira-Pardo, L., Dionísio, A., Saiz-Jimenez, C., Macedo, M.F., Prieto, B., 2012. Bioreceptivity of building stones: A review. *Science of The Total*

Environment 426, 1-12.

Moharikar, S., D'Souza, J.S., Kulkarni, A.B., Rao, B.J., 2006. Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular chlorophyte *Chlamydomonas Reinhardtii* (Chlorophyceae) cells following UV irradiation: detection and functional analyses. *Journal of Phycology* 42, 423-433.

Mulec, J., Kosi, G., Vrhovsek, D., 2008. Characterization of cave aerophytic algal communities and effects of irradiance levels on production of pigments. *Journal of Cave and Karst Studies* 70, 3-12.

Mulec, J., Kosi, G., 2009. Lampenflora algae and methods of growth control. *Journal of Cave and Karst Studies* 71, 109-115.

Najeeb, U., Xu, L., Ahmed, Z., Rasheed, M., Jilani, G., Naeem, M., Shen, W., Zhou, W., 2011. Ultraviolet-C mediated physiological and ultrastructural alterations in *Juncus effusus* L. shoots. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 481-488.

Nugari, M.P., Pietrini, A.M., Caneva, G., Imperi, F., Visca, P., 2009. Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: The Crypt of the Original Sin (Matera, Italy). *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 705-711.

Ou, H., Gao, N., Deng, Y., Qiao, J., Wang, H., 2012. Immediate and long-term impacts of UV-C irradiation on photosynthetic capacity, survival and microcystin-LR release risk of *Microcystis aeruginosa*. *Water Research* 46, 1241-1250.

Prieto, B., Silva, B., Lantes, O., 2004. Biofilm quantification on stone surfaces: comparison of various methods. *Science of The Total Environment* 333, 1-7.

Prieto, B., Silva, B., 2005. Estimation of the potential bioreceptivity of granitic rocks from their intrinsic properties. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56, 206-215.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria: ISBN 3-900051-07-0; 2011. URL <http://www.R-project.org/>.

Reynolds, C.S., 1997. *Vegetation Processes in the Pelagic: a model for ecosystem theory*. (Excellence in Ecology 9). Ecology Institute, Oldendorf. 371pp.

Sanmartín, P., Aira, N., Devesa-Rey, R., Silva, B., Prieto, B., 2010. Relationship between color and pigment production in two stone biofilm-forming cyanobacteria (*Nostoc* sp. PCC 9104 and *Nostoc* sp. PCC 9025). *Biofouling* 26, 499-509.

Scheerer S, Ortega Morales O, Gaylarde C. Chapter 5: Microbial Deterioration of Stone

Monuments - An Updated Overview. In: Laskin AI, Sariaslani S, Gadd GM, editors. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press.; 2009. p. 97-139.

Shirayama, H., Tohezo, Y., Taguchi, S., 2001. Photodegradation of chlorinated hydrocarbons in the presence and absence of dissolved oxygen in water. *Water Research* 35, 1941-1950.

Simon, K.S., 2012. Cave ecosystems, In *Encyclopedia of caves*. Eds D.C. Culver, W.B. White, pp. 99-102. Academic Press in Elsevier.

Tao, Y., Zhang, X., Au, D.W.T., Mao, X., Yuan, K., 2010. The effects of sub-lethal UV-C irradiation on growth and cell integrity of cyanobacteria and green algae. *Chemosphere* 78, 541-547.

Vázquez-Nion, D., Sanmartín, P., Silva, B., Prieto, B., 2013. Reliability of color measurements for monitoring pigment content in a biofilm-forming cyanobacterium. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, 220-226.

Warscheid, T., Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 343-368.

Zvezdanović, J., Cvetić, T., Veljović-Jovanović, S., Marković, D., 2009. Chlorophyll bleaching by UV-irradiation in vitro and in situ: Absorption and fluorescence studies. *Radiation Physics and Chemistry* 78, 25-32.

III.3.2. Suivis photographiques des biofilms traités aux UV-C dans la grotte des Moidons

Cette partie constitue un complément d'information aux données présentées dans l'Article 3 avec la présentation des suivis photographiques des différents biofilms sélectionnés. Les séries de photographies présentées concernent les zones LwB1, LwB2 et StmB (LrB étant déjà présentée dans l'Article 3 et la 1^{ère} zone traitée aux UV-C dans la grotte est présentée dans l'Article 2). La localisation des biofilms dans la grotte est donnée dans la Figure III.3-1 de l'Article 3.

La Figure III.3-6 présente le suivi photographique pour le biofilm témoin LwB1 et le biofilm traité aux UV-C LwB2 (galerie Sud). Le suivi a été réalisé pendant 4 mois avec une mesure nommée « REF » correspondant à la première mesure (avant le traitement aux UV-C pour le biofilm traité) et 3 mesures à différents intervalles de temps (1 jour, 1 mois et 4 mois après la fin du traitement). Les photographies ont été prises exactement au même moment pour les deux biofilms.

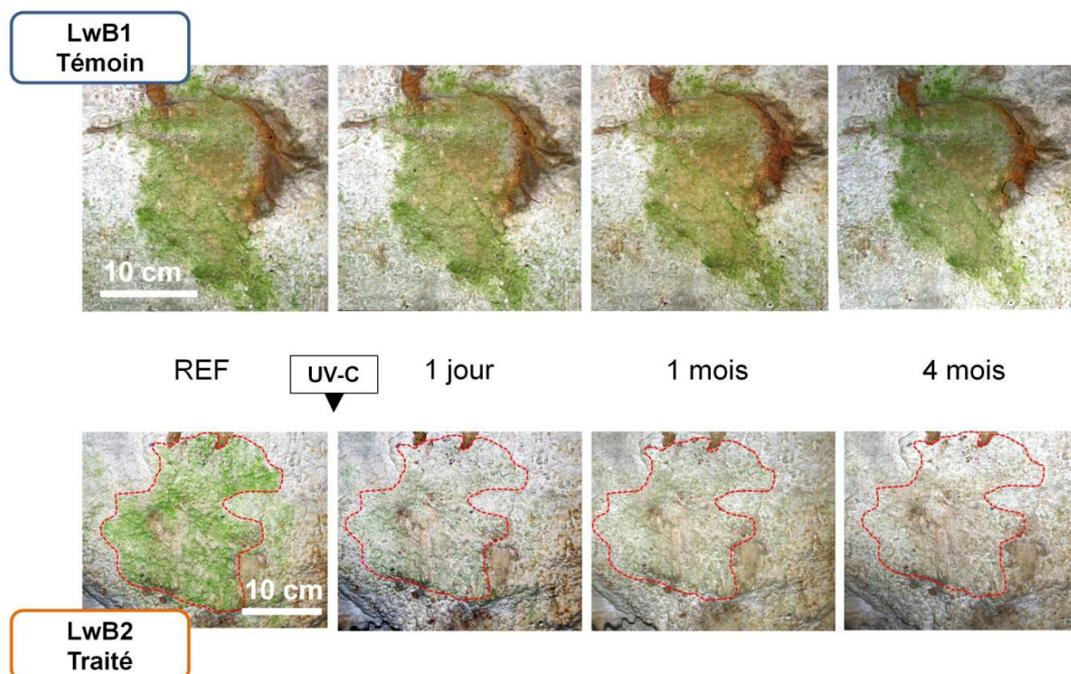


Figure III.3-6 : Suivi photographique des zones LwB1 et LwB2. LwB1 : biofilm d'algues témoin sur une paroi calcaire. LwB2 : biofilms d'algues traité aux UV-C sur la même paroi calcaire (8 h, 180 kJ m⁻²).

Par rapport au biofilm témoin (LwB1), le biofilm ayant été exposé à 8 h d'UV-C

(LwB2) montre une dégradation des chlorophylles et une disparition graduelle du biofilm en fonction du temps. Directement après la fin de l'exposition, le biofilm a quasi totalement disparu (une couleur verte persiste cependant sur le support). La couleur verte est encore à peine visible après 1 mois et disparaît totalement après 4 mois. L'effet « bleaching » des UV-C sur les chlorophylles est également bien visible *in-situ* et est conditionné par le facteur temps d'attente après traitement.

Enfin, la **Figure III.3-7** présente le suivi photographique du biofilm StmB situé sur une stalagmite de la galerie Sud. Le suivi a été réalisé sur une période de 6 mois avec la mesure REF (avant traitement) et des mesures après le traitement à différents intervalles (1 semaine, 1, 4 et 6 mois).

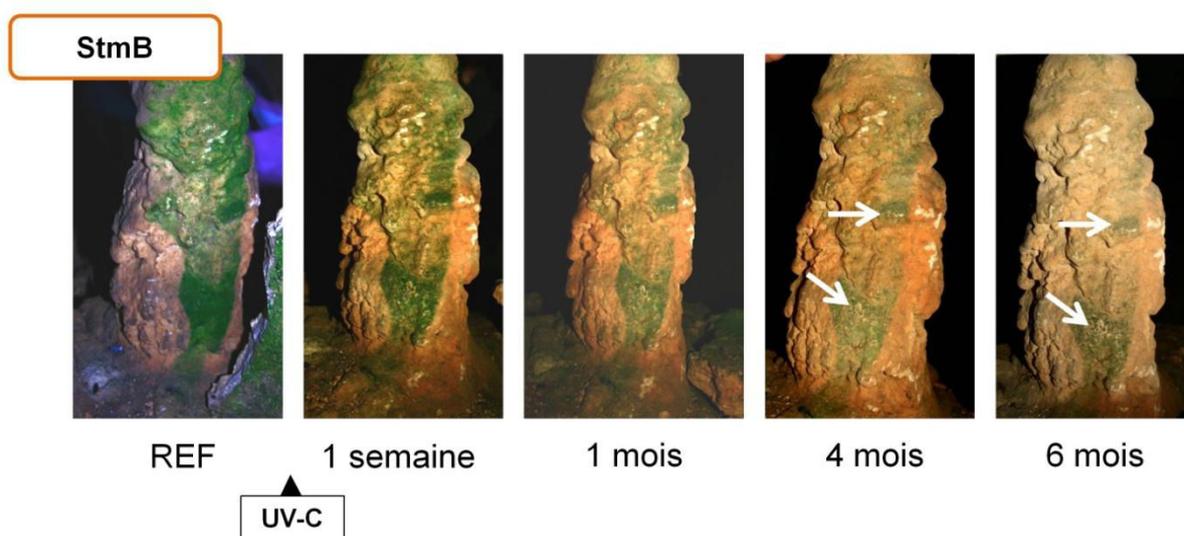


Figure III.3-7 : Suivi photographique du biofilm StmB se développant sur une stalagmite. Traitement UV-C : 8 h, 180 kJ m^{-2} . Les flèches blanches indiquent des zones où la couleur verte persiste après traitement.

On remarque pour ce biofilm que l'effet des UV-C est beaucoup moins prononcé que pour le biofilm LwB2. Une semaine après la fin du traitement, la majeure partie du biofilm persiste sur le support alors que pour le biofilm LwB2, la quasi-totalité du biofilm avait disparu directement après la fin de l'exposition. On remarque cependant une disparition et une décoloration graduelle en fonction du temps avec un effet « bleaching » presque total après 6 mois. Cependant, certaines zones (flèches blanches) n'ont pas été totalement décolorées.

Comme nous l'avons vu dans l'**Article 3**, ce biofilm était caractérisé par une intensité de colonisation beaucoup plus importante que le biofilm LwB2 et les zones les plus intensément colonisées correspondent aux zones pointées d'une flèche blanche sur la **Figure III.3-7**. De ce fait, l'importance du paramètre épaisseur d'un biofilm est également mise en évidence, cette fois visuellement grâce aux suivis photographiques. Nous remarquons aussi que le paramètre temps est important. En effet, les suivis photographiques nous ont permis de détecter un effet « bleaching » maximal après plusieurs mois de suivi.

III.3.3. Analyses préliminaires des communautés microbiennes de la grotte des Moidons par cytométrie en flux

Au cours des diverses sessions de terrain qui ont permis l'acquisition des données présentées dans l'**Article 3** et le **paragraphe III.3.2**, nous avons également procédé à l'échantillonnage de plusieurs biofilms phototrophiques afin d'analyser les communautés microbiennes présentes. Les analyses ont principalement porté sur la distinction entre l'ultra-phytoplancton (micro-organismes photosynthétiques < 10 µm) et les bactéries (divisées en 2 groupes : HNA pour high nucleic acid et LNA pour low nucleic acid).

Premièrement, l'analyse des bactéries indique qu'il y a une dominance des bactéries à faible teneur en acide nucléique (LNA) sur toutes les zones échantillonnées sauf pour la zone 4. Cette zone est caractérisée par une dominance (62 %) des bactéries avec de forte teneur en acide nucléique. Les zones 1, 2, 10 et 12 contiennent entre 10 et 20 % de HNA ; les autres zones en contiennent toutes moins de 7 %. Dans la littérature, les bactéries avec des teneurs importantes en acides nucléiques (HNA) sont considérées comme la part active et dynamique d'une population bactérienne (implication dans les cycles biogéochimiques et le cycle de la matière organique) alors que celles ayant des teneurs plus faibles en acides nucléiques sont considérées comme moins actives voire comme des cellules mortes (Grégori *et al.*, 2001 ; Lebaron *et al.*, 2001 ; Longnecker *et al.*, 2005 ; Šantić *et al.*, 2012). En milieu aquatique il a souvent été démontré que l'abondance des bactéries LNA était plus importante lorsque les conditions étaient oligotrophiques, c'est-à-dire avec de faibles teneurs en nutriments (Longnecker *et al.*, 2005 ; Šantić *et al.*, 2012). Les résultats obtenus lors de l'analyse par cytométrie en flux des communautés bactériennes sont en accord avec la bibliographie puisque l'abondance des bactéries LNA observée sur l'ensemble du site suggère des conditions oligotrophiques dans la grotte. Le dosage des éléments minéraux dans les eaux du site indiquent effectivement de faibles teneurs en éléments minéraux majeurs (**Table III.2-1, Article 2**).

En ce qui concerne les communautés des micro-organismes photosynthétiques, 2 groupes ont pu être identifiés. Le premier groupe est présent dans les zones 9, 10, 14 et 18 avec des abondances relatives de 80, 10, 60 et 40 %, respectivement. Ce groupe pourrait correspondre à des cellules de Chlorophycées étant donné leur petite taille (< 3 µm), leur fluorescence rouge moyenne (présence de chlorophylles) et leur fluorescence orange faible (pas de phycoérythrine). Les cytogrammes du phytoplancton des zones 9, 14 et 18 sont

présentés dans la **Figure III.3-8** ; les groupes de Chlorophycées sont ciblés avec une flèche rouge. Ces cellules ont été attribuées à l'espèce *C. minutissima* grâce à des observations au microscope électronique à balayage (MEB) effectués sur les prélèvements de la zone 14 (**Figure III.3-9**). Les cellules sont de petite taille ($< 3 \mu\text{m}$) et on note la présence d'une matrice extracellulaire (composé de substances extrapolymeriques, EPS) par lequel les cellules se lient entre elles (**Figure III.3-9 B**).

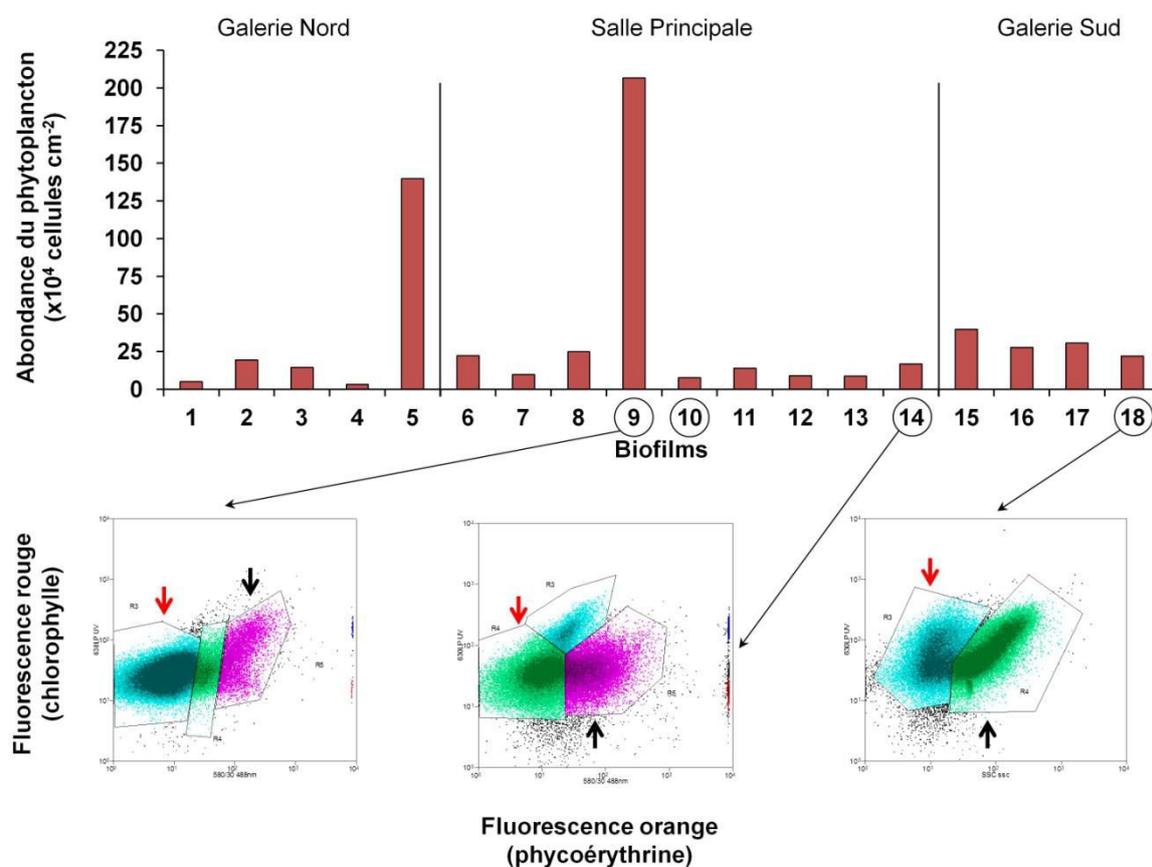


Figure III.3-8 : Abondances du phytoplancton en fonction des biofilms échantillonnés. Les nombres entourés correspondent aux zones pour lesquelles nous avons observé la présence de Chlorophycées de petite taille. Les cytogrammes du phytoplancton des zones 9, 14 et 18 ont été sélectionnés (les flèches rouges montrent la détection des Chlorophycées et les flèches noires celle des Cyanobactéries).

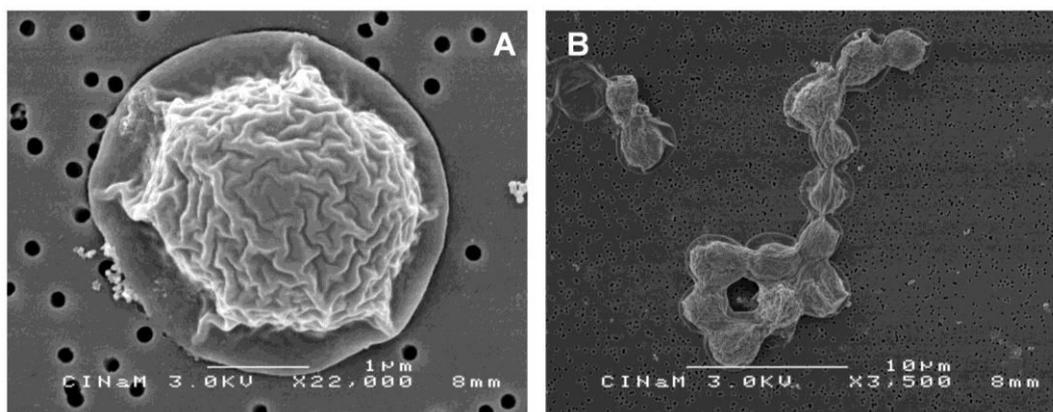


Figure III.3-9 : Photographies en microscopie électronique à balayage de cellules de Chlorophycées (potentiellement *C. minutissima*) prélevées sur la zone 14. A : cellule seule. B : cellules groupées.

Le deuxième groupe que nous avons identifié est présent dans les zones 15, 16 et 17 (**Figure III.3-10**). Etant donné la petite taille des cellules ($< 2 \mu\text{m}$, picophytoplancton), leur faible fluorescence rouge et l'absence de fluorescence orange, ce groupe pourrait être composé soit d'organismes appartenant à la classe des Prochlorophycées (division des Prochlorophytes, cellules procaryotes) soit de micro-organismes eucaryotes photosynthétiques de taille picoplanctonique (picoeucaryotes) pouvant appartenir aux classes des Chlorophycées ou des Prasinophycées, chacune d'elles contenant des genres d'algues de petite taille comme *Nannochloris* pour les Chlorophycées et *Ostreococcus*, *Micromonas* ou encore *Pycnococcus* pour les Prasinophycées.

Les Prochlorophycées sont une classe de cyanobactéries dont la composition pigmentaire est un peu particulière puisque, dans la majeure partie des souches, les chlorophylles *a* et *b* sont remplacées par des formes divinylées de ces chlorophylles, notées respectivement Chl*a*2 et Chl*b*2 (Barsanti *et al.*, 2008). Une autre caractéristique de ces micro-organismes est l'absence de phycobilisome. Cependant, dans une étude récente, Wiethaus *et al.* (2010) montrent que *Prochlorococcus marinus* synthétise néanmoins des phycobiline, en particulier de la phycoérythrine mais en quantité assez faible. La faible quantité de ces pigments se traduit par une fluorescence orange faible, comme nous avons pu le constater sur les cytogrammes. Néanmoins, les Prochlorophycées sont des micro-organismes majoritairement présents dans les océans où ils constituent la majeure partie du phytoplancton des zones oligotrophiques (Lewin, 2002 ; Wiethaus *et al.*, 2010 ; Mitbavkar *et al.*, 2012) et à l'heure actuelle ce genre de cyanobactéries n'a encore jamais été observé en milieu terrestre (Barsanti *et al.*, 2008). Les micro-organismes des zones 15, 16 et 17 appartiendraient donc

plus certainement à des micro-organismes photosynthétiques eucaryotes de très petite taille.

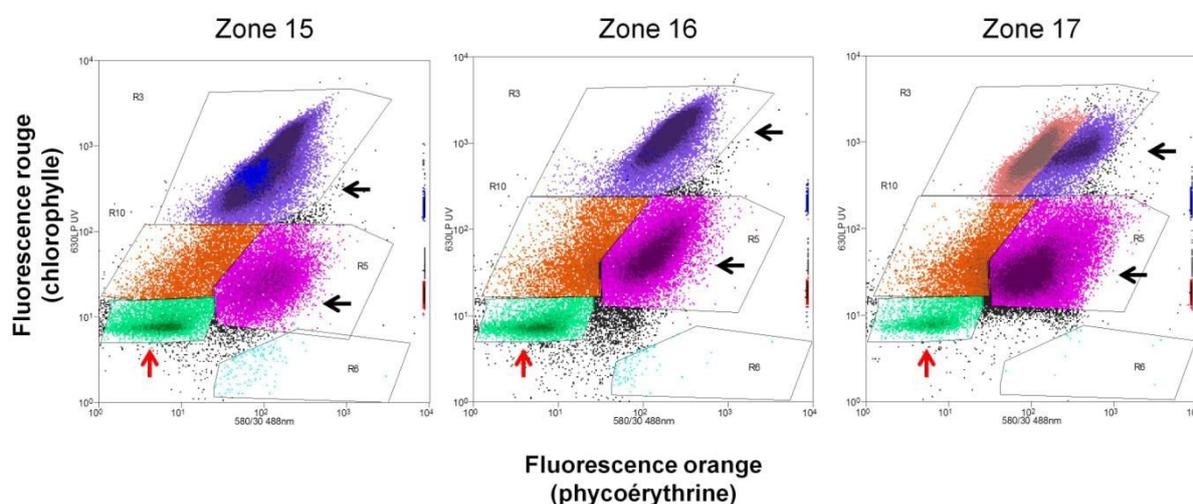


Figure III.3-10 : Cytogrammes du phytoplancton des zones 15, 16 et 17. Les flèches rouges indiquent les groupes de picophytoplancton (Prochlorophycées ou picoeucaryotes). Les flèches noires indiquent les groupes de cyanobactéries.

Des groupes de cyanobactéries ont également été détectés sur les zones 2, 3, 9, 11, 15, 16 et 17 mais n'ont pu être précisément identifiés. Cette détection est basée sur la présence de fluorescence orange (exemples dans les **Figure III.3-8** et **Figure III.3-10**, flèches noires). Les observations au MEB des échantillons des zones 14 et 16 n'ont pas non plus permis l'identification des espèces de cyanobactéries présentes.

Enfin, les zones 9 et 14 présentent un intérêt particulier du point de vue des successions écologiques qui se mettent en place dans la formation des biofilms phototrophes proliférant autour des lampes dans les grottes. En effet, comme nous l'avons mentionné dans l'**Article 3**, les algues vertes et particulièrement la division des Chlorophytes sont considérées comme des espèces pionnières dans la colonisation des zones éclairées dans les grottes touristiques (Mulec *et al.*, 2008). Selon la même étude, les cyanobactéries deviennent ensuite prédominantes lors des étapes de formation des biofilms phototrophes. Les zones 9 et 14 sont caractérisées par une dominance des Chlorophycées avec des abondances relatives de 80 et 60 %, respectivement. Ces zones font partie des biofilms verts les plus importants recensés dans la grotte et sont de ce fait très souvent nettoyés par les gestionnaires du site à l'aide d'algicide ou de nettoyeur de type Karcher. Ces nettoyages ont pour effet de stopper l'évolution des biofilms et d'éradiquer l'ensemble des communautés microbiennes, laissant place ensuite à

une nouvelle colonisation par les algues vertes de type Chlorophytes et plus particulièrement à l'espèce *Chlorella minutissima* qui présente toutes les caractéristiques d'acclimatation à ce genre de milieu (voir **Article 3**).

L'ensemble des données obtenues par l'analyse en cytométrie, c'est-à-dire les abondances de phytoplancton et de bactéries, le rapport entre le phytoplancton et les bactéries et les abondances de bactéries HNA et LNA, ont été mises en relation avec les paramètres mesurés à l'échelle du biofilm (quantité de lumière et localisation) ainsi qu'avec ceux mesurés à l'échelle de la cavité (temps de présence humaine, temps d'allumage des lampes, distance à la source extérieure). Aucune relation significative n'a été mise en évidence entre la nature des micro-organismes constituant les biofilms déterminée par cytométrie et les variables mesurées à l'échelle de ceux-ci ou de la cavité. Nous avons en particulier analysé le rapport entre les abondances des communautés de phototrophes (algues et cyanobactéries) et les abondances des communautés d'hétérotrophes (bactéries) en fonction des paramètres tels que la quantité de lumière reçue. Aucune relation significative n'a été mise en évidence entre la variation de ce rapport et la quantité de lumière reçue. [Roldán et Hernández-Mariné \(2009\)](#) indiquent que la balance entre autotrophie et hétérotrophie dans les biofilms se développant dans les grottes n'est pas exclusivement contrôlée par la quantité de lumière. Selon eux, le rapport entre algues et bactéries peut être influencé par la disponibilité en nutriments et matière organique. De plus, certains auteurs comme [Mulec et al. \(2008\)](#) ont montré que les communautés de phototrophes dans les grottes étaient capables de s'adapter à de faibles conditions de luminosité, notamment en modifiant leur contenu pigmentaire, comme nous avons pu l'observer chez *C. minutissima* cultivée en conditions « grottes » au laboratoire.

III.3.4. Synthèse du Chapitre 3

Dans ce chapitre sont présentés les résultats obtenus au cours des diverses sessions de terrain menées sur le site d'étude de la grotte des Moidons. Les différentes sessions de terrain ont permis de caractériser l'ensemble du site en termes de cartographie/topographie, de paramètres abiotiques (température, taux d'humidité, concentrations en CO₂, concentrations en éléments minéraux, courants d'air, paramètres liés à la présence des visiteurs ...) mais également en termes biotiques avec la caractérisation de l'état de la colonisation par des micro-organismes photosynthétiques (algues et cyanobactéries) et non photosynthétiques (bactéries).

Nous avons pu mettre en évidence la présence de *Chlorella minutissima* sur plusieurs biofilms phototrophes échantillonnés dans la grotte grâce à des méthodologies différentes (observations microscopiques et cytométrie en flux). Etant donné ses caractéristiques physiologiques (petite taille, adaptation à de faibles quantités de lumière et d'éléments minéraux...), cette algue semble s'être particulièrement bien adaptée aux conditions de la grotte des Moidons. Cependant, ce n'est pas la seule souche algale présente sur le site ; d'autres genres ou espèces de micro-organismes photosynthétiques ont pu être partiellement identifiés en microscopie optique (*Bracteacoccus* sp., *Scenedesmus* sp.) ou par cytométrie (picoeucaryotes). Les analyses en cytométrie ont également montré des groupes cellulaires avec une importante fluorescence orange qui traduit la présence de cyanobactéries. Celles-ci n'ont cependant pas été observées directement que ce soit en microscopie optique ou au MEB.

Nous avons également montré dans l'**Article 3** qu'un ensemble de facteurs mesuré à l'échelle de la cavité, tels que la circulation des eaux et les paramètres liés à la présence des visiteurs, permettait d'expliquer les différences de colonisation en fonction de la localisation dans la grotte. Les facteurs mesurés à l'échelle du biofilm (quantité de lumière reçue, type de support...), n'ont quant à eux pas permis d'expliquer la variabilité de la surface de colonisation.

Après avoir effectué un état des lieux de la colonisation par des biofilms phototrophes dans la grotte, nous en avons sélectionné plusieurs afin de s'en servir comme placettes expérimentales pour tester l'efficacité des traitements UV-C en conditions réelles. Nous avons montré que l'efficacité des traitements dépendait tout d'abord de la nature du biofilm et plus particulièrement de l'intensité de colonisation ainsi que de son emplacement dans la grotte. En effet, le temps de recolonisation après traitement va dépendre des facteurs influençant

l'installation et la prolifération des algues qui sont variables d'une zone à une autre. Au cours de ce travail de terrain, l'emploi des mesures colorimétriques s'est avéré très efficace à la fois pour diagnostiquer l'état de colonisation d'un biofilm et pour suivre l'évolution des biofilms traités aux UV-C.

Enfin, les **Articles 2** et **3** amènent également certaines réflexions quant aux préconisations d'utilisation de la technologie UV en milieux souterrains.

III.4. Chapitre 4 : Approche complémentaire de l'effet des UV-C sur deux souches de champignons filamenteux et plusieurs matières picturales

Au cours de ce travail de thèse qui est principalement axé sur l'étude de l'effet des UV-C sur les micro-organismes photosynthétiques eucaryotes, d'autres modèles biologiques et non biologiques ont fait l'objet d'analyses complémentaires. Bien qu'à un stade plus préliminaire, les paragraphes suivants traitent de l'effet des UV-C sur deux souches de champignons filamenteux (**paragraphe III.4.1**) et sur plusieurs types de matière picturale (**paragraphe III.4.2**). Ces échantillons ont été traités avec différentes doses / durées d'exposition aux UV-C afin d'en vérifier les effets sur différents paramètres biologiques pour les champignons et structurels pour les matières picturales. Comme nous l'avons vu succinctement dans l'introduction générale, les champignons filamenteux sont également largement impliqués dans les phénomènes de colonisation et de biodétérioration des matériaux du patrimoine. Nous avons donc voulu analyser l'efficacité des UV-C sur des organismes de ce type. En ce qui concerne les matières picturales, l'objectif est de mettre en avant l'innocuité du rayonnement UV-C sur leur structure et apparence afin de proposer une éventuelle application des traitements UV-C dans des sites ornés de peintures rupestres.

III.4.1. Effet des UV-C sur les champignons

III.4.1.1. Dénombrement des Unités Formant Colonie (UFC)

Pour cette expérience deux souches de champignons ont été étudiées : *Verticilium* sp. et *Ulocladium* sp. Le dénombrement des UFC a été effectué selon la méthode décrite dans le **paragraphe II.1.2.3.1**. Pour chaque souche, deux séries d'échantillons ($n = 3$) ont été étudiées : une série témoin (sans exposition aux UV-C) et une série exposée à 15 h d'UV-C (puissance de 60W, correspondant à environ 450 kJ m^{-2}). Après l'application du traitement et un temps d'attente standardisé pour chaque souche, les UFC ont été comptées.

La **Figure III.4-1** présente les résultats obtenus après dénombrement des Unités Formant Colonie des deux souches de champignons, *Verticilium* sp. et *Ulocladium* sp.

Pour la souche *Verticilium* sp., on remarque une différence significative du nombre d'UFC ml^{-1} après une exposition de 15 h d'UV-C par rapport aux échantillons témoins ($p = 0,007$). Le nombre d'UFC est passé de $2 \times 10^6 \pm 6,7 \times 10^5$ à $4,7 \times 10^3 \pm 2,9 \times 10^3$ UFC ml^{-1} .

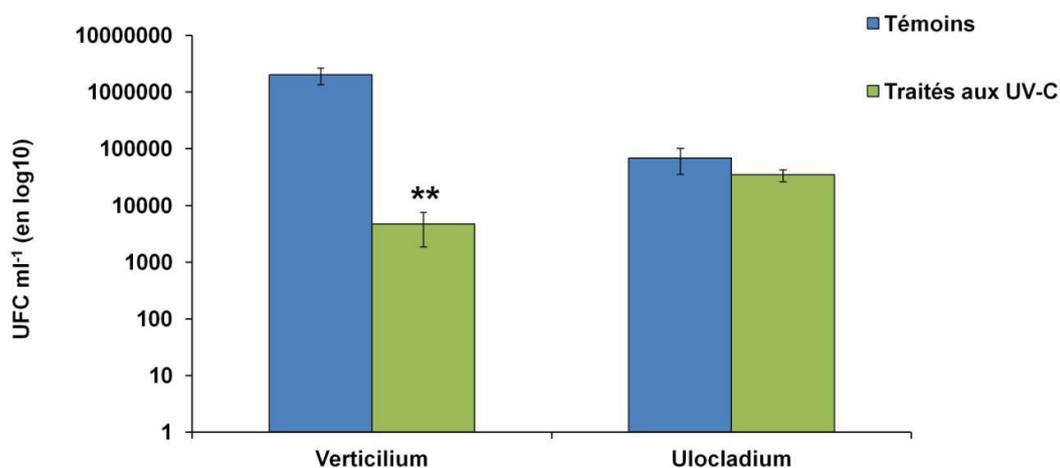


Figure III.4-1 : Dénombrement des Unités Formant Colonie (UFC) pour *Verticilium* sp. et *Ulocladium* sp. en conditions témoins et exposées à 15 h d'UV-C. Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types (log10 transformées, $n = 3$). Les étoiles représentent une différence significative à 0,01 (Test de Tukey HSD).

Contrairement à la souche *Verticilium* sp., aucune différence significative n'a été observée chez *Ulocladium* sp. Le nombre d'UFC chez les échantillons non exposés aux UV-C

était de $6,9 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^5$ UFC ml⁻¹, alors que celui des échantillons traités était de $3,5 \times 10^5 \pm 8 \times 10^4$ UFC ml⁻¹.

Ces résultats suggèrent une certaine résistance au rayonnement UV-C chez la souche *Ulocladium* sp. par rapport à *Verticilium* sp. même après un fort traitement correspondant à une dose d'UV-C reçue d'environ 450 kJ m⁻². En confrontant ces résultats avec ceux présents dans la littérature, il est fort probable que la couleur marron foncé et noire due à la présence de mélanine, confère à *Ulocladium* sp. cette résistance.

Singaravelan *et al.* (2008) ont étudié la résistance au rayonnement UV d'un champignon filamenteux contenant de la mélanine, *Aspergillus niger*, proliférant dans le sol du « Evolution Canyon » en Israël. Ils ont montré que les souches d'*Aspergillus* retrouvées dans la partie ensoleillée du canyon étaient plus résistantes à des traitements expérimentaux aux UV que les souches prélevées en zones ombragées. Cette résistance était fonction de la concentration en mélanine mesurée dans les différentes souches (supérieures dans celles des zones ensoleillées).

Les mélanines sont des pigments noirs de haut poids moléculaire capables d'absorber une large gamme du spectre lumineux et notamment dans la région des UV où se situe leur pic d'absorption (Cockell et Knowland, 1999 ; Suryanarayanan *et al.*, 2004). Plusieurs auteurs évoquent ainsi de la capacité des mélanines à absorber les UV et à dissiper leur énergie pour limiter les dommages cellulaires et notamment la protection de la molécule d'ADN (Cockell et Knowland, 1999 ; Elleder et Borovanský, 2001 ; Suryanarayanan *et al.*, 2004 ; Dadachova *et al.*, 2007 ; Selvakumar *et al.*, 2008).

III.4.1.2. Suivi de la prolifération

Pour le suivi de la prolifération seule la souche *Verticilium* sp. a été étudiée car l'autre souche, *Ulocladium* sp., présentait des difficultés de croissance sur milieu gélosé. Le protocole expérimental est décrit dans le **paragraphe II.1.2.3.2**. Trois séries d'échantillons ont été utilisées pour analyser l'effet du rayonnement UV-C sur la capacité de prolifération de *Verticilium* sp. : une série témoin (sans exposition aux UV-C) et 2 séries exposées aux UV-C (puissance de 60W ; 3 h 30 min : 105 kJ m⁻² et 7 h : 210 kJ m⁻²).

La **Figure III.4-2** présente les résultats du suivi de la prolifération de *Verticilium* sp. sur milieu gélosé avant et après traitement au UV-C.

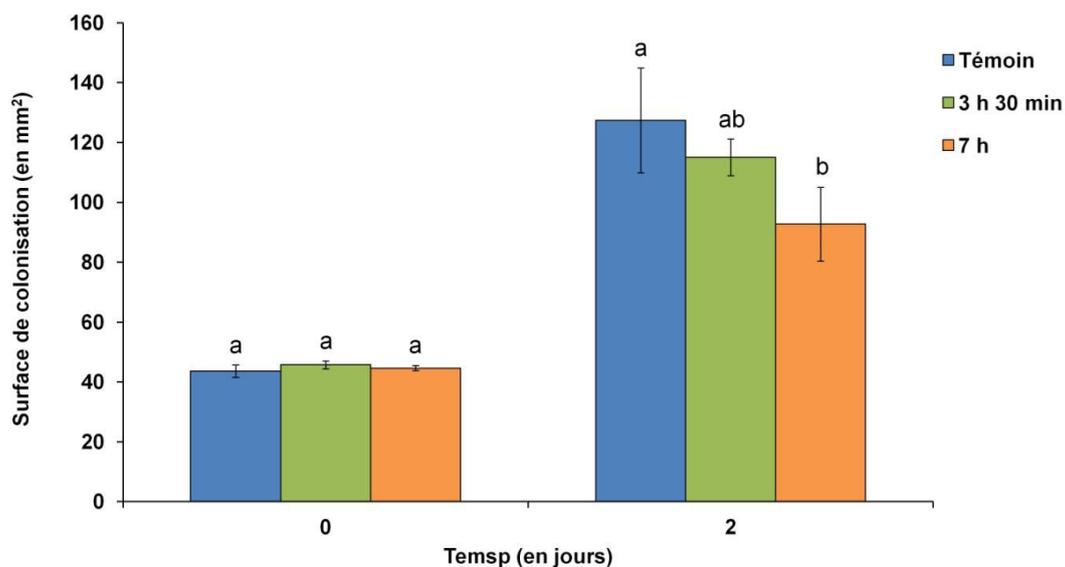


Figure III.4-2 : Suivi de la surface de colonisation de *Verticilium* sp. exposé ou non au rayonnement UV-C. Les traitements UV-C ont été effectués directement après la mesure au jour 0. Des lettres différentes indiquent une différence significative à $p < 0,05$ entre les différents traitements pour un jour donné

Ces résultats indiquent qu'entre le jour 0 et le jour 2 il y a une nette prolifération des échantillons de *Verticilium* sp. La surface d'occupation des échantillons témoins augmente de $43,64 \pm 2,08$ à $127,43 \pm 17,50$ mm². Les échantillons exposés aux UV-C montrent une augmentation de la surface de colonisation de $45,76 \pm 1,28$ à $115,12 \pm 6,10$ mm² (3 h 30 min) et de $44,64 \pm 0,85$ à $92 \pm 73 \pm 12,31$ mm² (7 h). Une différence significative ($p = 0,037$) est observée au jour 2 entre les échantillons témoins et ceux exposés à 7 h d'UV-C. Il y a donc une inhibition de la prolifération du mycélium chez les échantillons exposés. Ces résultats sont illustrés dans la **Figure III.4-3**.

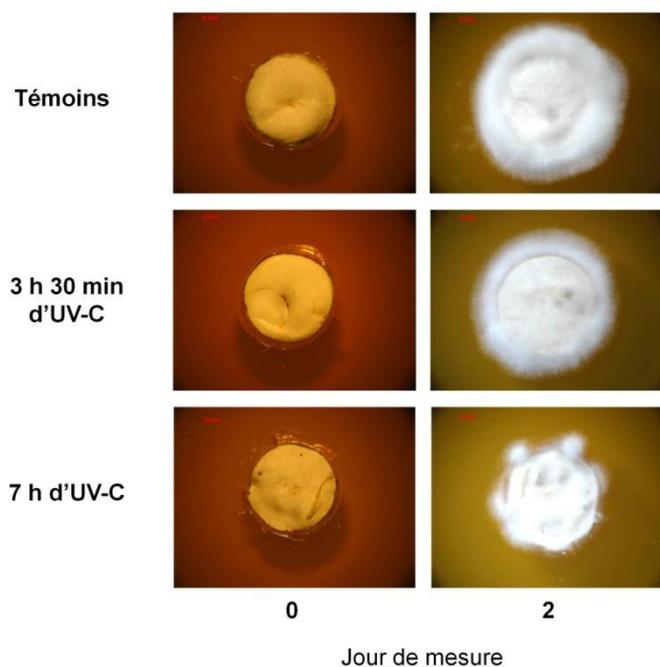


Figure III.4-3 : Photographies de l'évolution de la surface d'occupation des pastilles de champignons sur milieu gélosé au jour 0 (avant le traitement UV-C) et au jour 2 (après le traitement UV-C) en fonction du traitement. Correspondances des durées d'exposition en kJ m^{-2} : 3 h 30 min = 105 kJ m^{-2} ; 7 h = 210 kJ m^{-2} .

Dans la littérature plusieurs auteurs ont montré l'effet du rayonnement ultraviolet (B et C) sur la capacité d'extension ou de prolifération du mycélium ainsi que sur la mortalité ou la capacité de germination de spores chez plusieurs espèces de champignons filamenteux. [Menetrez et al. \(2010\)](#) ont étudié les effets des UV-C sur le pourcentage de mortalité de spores de 4 espèces de champignons (*Aspergillus versicolor*, *A. fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* et *Cladosporium cladosporioides*). [Valero et al. \(2007\)](#) ont fait de même sur 5 espèces (*Aspergillus carbonarius*, *A. niger*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium janthinellum* et *Alternaria alternata*) en étudiant leur capacité de germination à l'état de spores. Enfin, [Begum et al. \(2009\)](#) ont également étudié l'effet des UV-C sur le pourcentage de survie de spores de 4 espèces (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Eurotium rubrum* et *Penicillium corylophilum*).

Ces trois études montrent que des durées d'exposition de quelques secondes à quelques minutes (allant de 5 s à 15 min) correspondant à de faibles doses d'UV-C (allant de $7,3 \text{ J m}^{-2}$ à 9 kJ m^{-2}), entraînent des diminutions significatives de la germination et de la viabilité des spores. A l'état de spores, les champignons sont donc très sensibles aux UV-C. Dans notre étude nous n'avons pas isolé les spores du reste du champignon et nous avons travaillé

directement sur les mycéliums (structure composée de filaments et de spores). Il semblerait que sous cette forme le paramètre épaisseur jouerait comme pour les algues un rôle important dans l'efficacité du traitement. En effet, d'autres essais préliminaires ont consisté à réensemencer des échantillons de champignons exposés aux UV-C en effectuant des prélèvements en surface et en profondeur (données non présentées). Les prélèvements effectués en surface n'ont pas entamé de processus de prolifération sur milieu gélosé neuf alors que les prélèvements effectués en profondeur ont formé au bout de quelques jours un nouveau tapis de mycélium. La pénétration des UV-C est donc également affectée par le paramètre épaisseur ou quantité de matière à traiter.

III.4.2. Effet des UV-C sur les matières picturales

III.4.2.1. Analyse de la structure minéralogique par diffractométrie de rayons X

Plusieurs matières picturales (noir d'os, ocre jaune, oxyde de manganèse, oxyde de fer rouge et oxyde de fer jaune) ont été analysées par diffractométrie de rayons X afin d'en préciser la structure minéralogique et de vérifier si l'exposition aux UV-C pouvait altérer cette structure. La première mesure est effectuée avant le traitement aux UV-C (lignes noires sur les graphiques) et la deuxième mesure est effectuée après une exposition de 13 h aux UV-C (100 W, environ 655,2 kJ m⁻²). Les résultats sont présentés sous forme de diagrammes de diffraction dans les **Figure III.4-4** et **Figure III.4-5**.

Premièrement, pour l'oxyde de fer rouge, le noir d'os et l'oxyde de manganèse, aucune différence dans les diagrammes de diffraction n'a été observée. L'acquisition des données avant et après traitement aux UV-C n'indique aucun changement dans la structure minéralogique des échantillons que ce soit au niveau de l'emplacement des pics et de leur hauteur (permettant d'établir des correspondances avec la base de données pour l'identification des minéraux) ou encore de leur surface (traduit l'état de la cristallisation). Les aires de chaque pic ont été mesurées pour chaque acquisition (avant et après traitement aux UV-C) et nous les avons comparées en calculant le coefficient de corrélation R². L'oxyde de fer rouge, le noir d'os et l'oxyde de manganèse présentent respectivement des R² de 0,9984, 0,9997 et 0,9999.

Lors de l'acquisition du diagramme de diffraction de l'ocre jaune, nous n'avons pas non plus observé de différence avant et après traitement aux UV-C. La comparaison des aires des

pics a donné un R^2 de 0,9371. Le diagramme de l'oxyde de fer jaune (**Figure III.4-4 B**) reste également inchangé tout comme pour les autres pigments et affiche un R^2 de 0,923.

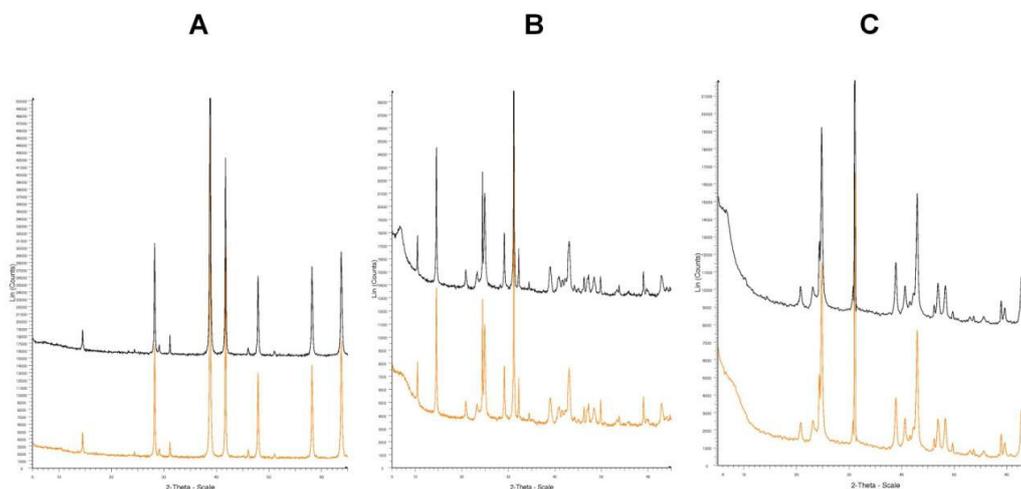


Figure III.4-4 : Diagrammes de diffraction obtenus par diffractométrie de rayons X. A : oxyde de fer rouge. B : oxyde de fer jaune. C : ocre jaune. La courbe noire représente l'échantillon avant l'irradiation aux UV-C et la courbe orange représente le même échantillon après une irradiation de 13 h aux UV-C (lumière continue, 100 W, $655,2 \text{ kJ m}^{-2}$).

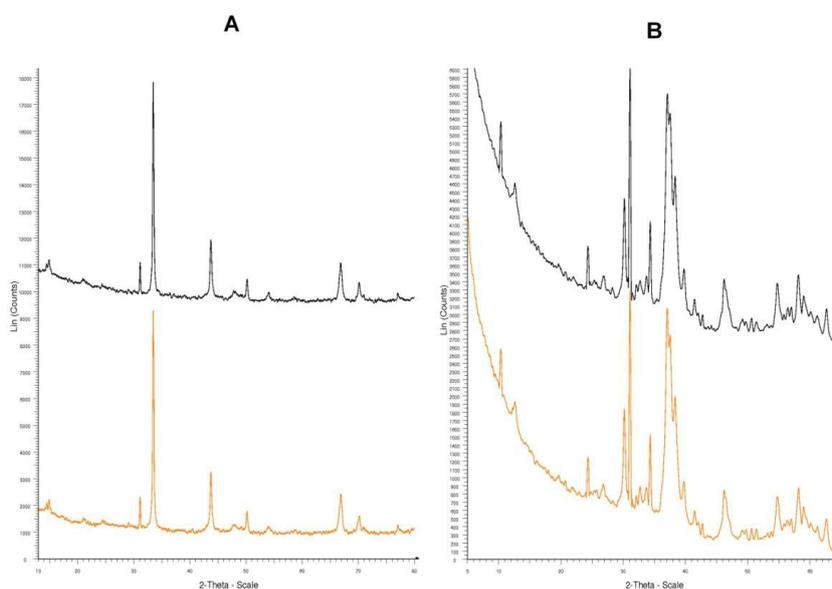


Figure III.4-5 : Diagrammes de diffraction obtenus par diffractométrie de rayons X. A : noir d'os. B : oxyde de manganèse. La courbe noire représente l'échantillon avant l'irradiation aux UV-C et la courbe orange représente le même échantillon après une irradiation de 13 h aux UV-C (lumière continue, 100 W, $655,2 \text{ kJ m}^{-2}$).

III.4.2.2. Analyse de la couleur par spectrocolorimétrie

Pour cette expérience nous avons utilisé deux types de matière picturale : l'oxyde de fer rouge et l'oxyde de fer jaune. Une quantité prédéfinie de pigments humidifiés a été déposée sur des blocs de calcaire afin de former une couche uniforme sur le support (voir protocole dans le **paragraphe II.1.3.2.2**). Après avoir déposé les pigments sur le bloc nous avons effectué une série de 10 mesures sur l'ensemble de la surface peinte (mesures moyennées des échantillons témoins). Ensuite nous avons disposé les blocs dans le système d'exposition aux UV-C (puissance de 100 W) et répété les mesures après une exposition de 8 h (UV-C 1, 400 kJ m⁻²) et après une exposition de 184 h (UV-C 2, 9200 kJ m⁻²) à raison de 8 h / jour soit une durée de 23 jours. Afin d'observer un éventuel changement de couleur ou d'aspect des pigments après traitement(s) aux UV-C, nous avons utilisé les mesures des paramètres colorimétriques L*, a* et b* (**Figure III.4-6**) ainsi que les mesures d'absorbance entre 400 et 700 nm (spectre visible de la lumière, du bleu au rouge) (**Figure III.4-7**).

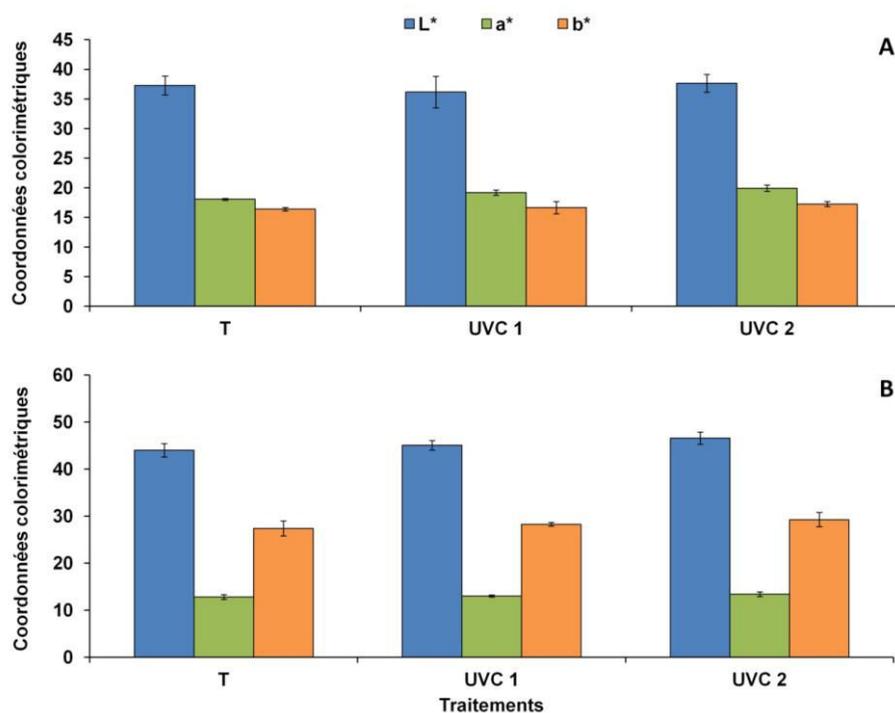


Figure III.4-6 : Mesure des paramètres colorimétriques L*, a* et b* en fonction des traitements appliqués pour les échantillons d'oxyde de fer rouge (A) et oxyde de fer jaune (B). Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types (n = 3).

Les résultats des paramètres L^* , a^* et b^* n'ont pas permis de mettre en évidence de changement de couleur avant et après traitement aux UV-C (**Figure III.4-6**). De même, aucun changement significatif de l'absorbance n'a été observé entre les échantillons témoins et les échantillons traités aux UV-C que ce soit pour l'oxyde de fer rouge ou jaune (**Figure III.4-7**).

III.4.2.3. Discussion des résultats

A notre connaissance, aucune autre étude dans la littérature n'a analysé les effets du rayonnement UV-C en utilisant une technologie similaire à la nôtre, à savoir un système d'irradiation par néon, sur des matières picturales comme les oxydes de fer. Les seules données disponibles concernent l'étude de l'effet de la technologie laser UV sur des pigments de même type. [Athanassiou *et al.* \(2000\)](#) ont observé des changements de couleur ainsi que dans la structure du réseau cristallin de deux types d'oxyde de fer et d'une ocre jaune après traitement au laser UV (propriétés du laser : 248 nm (UV-C), 20 ns / tir, 100 mJ cm⁻², 2000-3000 tirs). Selon les auteurs de cette étude le phénomène de décoloration serait lié à un réarrangement de la structure cristalline dû à l'augmentation de la chaleur provoquée par le laser. [Chappé *et al.* \(2003\)](#) tirent les mêmes conclusions après exposition au laser UV sur plusieurs types de pigments historiques colorés (blanc et rouge de plomb, blanc de zinc, ocre marron, bleu de cobalt...). Le système d'irradiation aux UV-C que nous avons utilisé au cours de cette thèse peut également provoquer des élévations de température au cours de l'allumage des néons. Nous n'avons cependant pas observé de changement similaire dans la structure cristalline et au niveau de la couleur. Ceci peut notamment s'expliquer par le fait que la lumière émise par la technologie laser est très directrice, c'est-à-dire que toute l'énergie dégagée est concentrée en un seul point alors que les néons UV dégagent de l'énergie d'une manière beaucoup plus dissipatrice. De ce fait, sous exposition à une lumière UV-C émise par des néons, l'impact thermique au niveau d'une structure minéralogique s'avèrerait beaucoup moins important voire quasi nul.

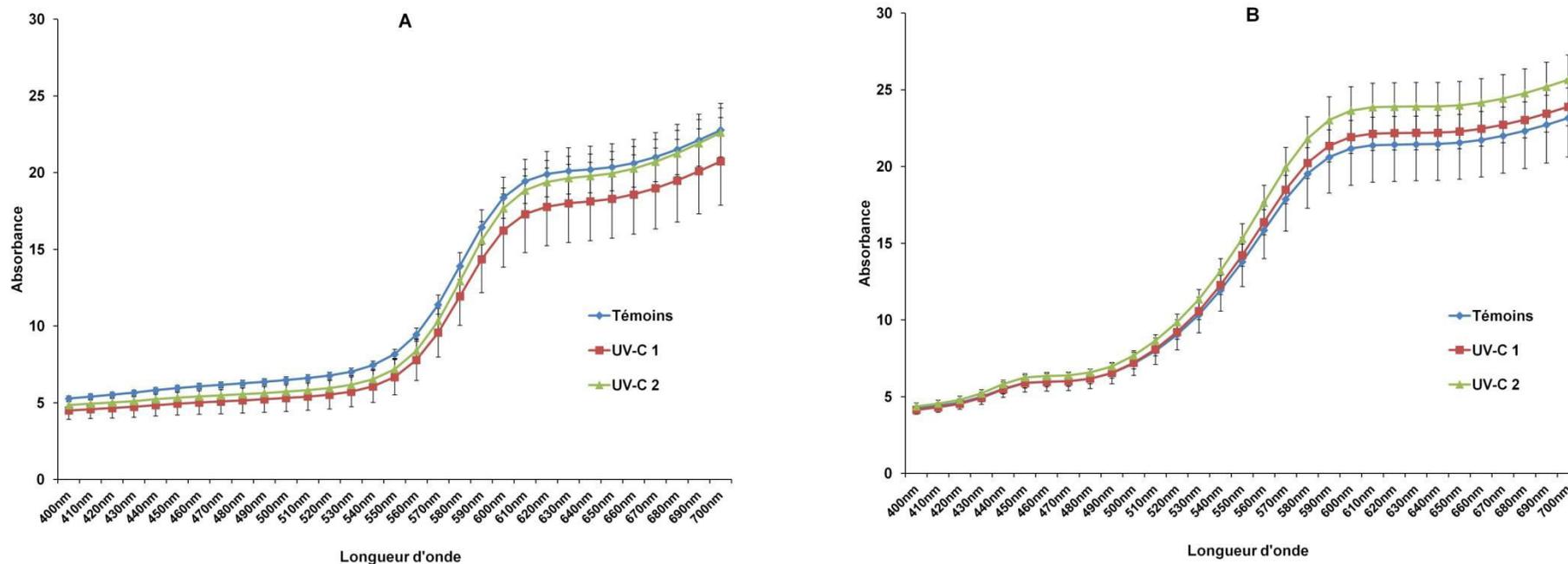


Figure III.4-7 : Courbes d'absorbance en fonction de la longueur d'onde (400 – 700 nm) des échantillons d'oxyde de fer rouge (A) et oxyde de fer jaune (B) traités ou non aux UV-C. UV-C 1 : 8 h d'exposition (400 kJ m^{-2}). UV-C 2 : 184 h d'exposition (9200 kJ m^{-2}). Valeurs exprimées en moyennes \pm écart-types ($n = 3$).

III.4.3. Synthèse du chapitre 4

Ce chapitre est une partie annexe de la thèse puisqu'il traite de façon beaucoup moins avancée des effets du rayonnement UV-C sur deux modèles d'études complémentaires et différents : les champignons filamenteux et les matières picturales.

Au niveau des champignons étudiés, *Verticilium* sp. et *Ulocladium* sp., nous avons pu mettre en évidence l'effet des UV-C au niveau de la viabilité des colonies fongiques par la méthode de mesure des Unités Formant Colonie. Après une longue durée d'exposition aux UV-C (15 h), une diminution significative de la viabilité a été observée chez *Verticilium* sp. mais pas chez *Ulocladium* sp. La présence de pigments de mélanine chez *Ulocladium* sp. lui permet de résister au rayonnement UV-C. Le suivi de la capacité de prolifération de colonies existantes chez *Verticilium* sp. a permis de mettre en évidence une inhibition de la prolifération après traitement aux UV-C. Comme dans le cas des biofilms constitués de micro-organismes photosynthétiques, l'efficacité des traitements UV-C sur des colonies fongiques est également conditionnée par le paramètre épaisseur.

Enfin, nous avons également analysé les effets potentiels du rayonnement UV-C sur plusieurs matières picturales (oxydes de fer rouge et jaune, ocre jaune, noir d'os et noir de manganèse). Ces matières picturales ont été choisies car elles sont proches, en termes de constitution, des matières picturales utilisées autrefois pour la confection des peintures rupestres par les hommes préhistoriques. Deux approches méthodologiques ont été utilisées pour cette étude : une approche structurale, en analysant la structure minéralogique des échantillons avant et après traitement aux UV-C et une approche colorimétrique, afin de détecter d'éventuels changements de couleur des pigments colorés (oxydes de fer rouge et jaune). Aucun changement significatif n'a été observé chez les échantillons exposés aux UV-C que ce soit au niveau structurel ou au niveau colorimétrique.

IV. CONCLUSION GÉNÉRALE

IV.1. Approche théorique au laboratoire

IV.1.1. Effet des UV-C sur des souches cavernicoles de micro-algues vertes

Les résultats présentés dans ce travail constituent une des premières avancées quant à l'étude et l'analyse au laboratoire de l'effet des UV-C sur des souches cavernicoles de micro-algues vertes. Très peu d'études ont analysé auparavant l'effet du rayonnement UV-C sur des souches terrestres de micro-algues vertes ou de cyanobactéries impliquées dans les problématiques de biodétérioration et de conservation des matériaux du patrimoine. A notre connaissance, seule l'étude d'[Adhikary et Sahu \(1997\)](#) apporte un certain nombre d'éléments de réponse quant aux effets des UV-C sur ce type de micro-organismes. Ils ont en effet montré qu'une souche terrestre de cyanobactérie proliférant sur les façades d'un temple Hindou était plus résistante au rayonnement UV-C que son homologue aquatique. Après 24 h d'exposition aux UV-C (correspondant à environ 730 kJ m^{-2}), les auteurs ont observé que la souche terrestre était moins sensible aux UV-C par rapport à la souche aquatique ce qui serait dû à la présence de scytonémine (pigment naturel présent dans la gaine des cyanobactéries) et de Mycosporine-like amino acids (MAAs) qui jouent un rôle de protection contre les rayonnements UV. Lors de nos expériences réalisées sur des souches cavernicoles de micro-algues vertes, des dommages irréversibles ont été observés après exposition aux UV-C se traduisant par une forte diminution de la viabilité cellulaire, de l'activité photosynthétique, des teneurs en chlorophylles et par une dégradation de l'ADN pour des doses d'UV-C d'environ 150 kJ m^{-2} correspondant à 4 h d'exposition. Ces doses étaient largement inférieures à celle utilisée par [Adhikary et Sahu \(1997\)](#). Au cours de ce travail, comme mentionné dans l'**Article 2**, nous avons cherché à mettre en évidence (expérience préliminaire) la présence des MAAs chez *C. minutissima*. Contrairement à une autre souche de micro-algue verte prélevée en extérieur, nous n'avons pas détecté de pic de MAAs chez *C. minutissima*. Comme le suggèrent [Singh et al. \(2008\)](#), la synthèse des MAAs en milieu littoral dépend de la profondeur à laquelle se trouvent les micro-organismes photosynthétiques et donc de l'exposition à la lumière. Ces résultats suggèrent que les micro-algues proliférant en milieux souterrains n'ont pas la même capacité de protection contre les UV-C comparé à certaines souches proliférant en conditions extérieures et soumises quotidiennement aux rayonnements ultraviolets.

IV.1.2. Effets directs et indirects des UV-C et relations entre les différents niveaux d'organisation biologique

L'approche théorique au laboratoire a été menée en étudiant et en analysant l'effet des UV-C sur les micro-algues à plusieurs niveaux d'organisation biologique : moléculaire, cellulaire et à l'échelle du biofilm. L'étude à l'échelle moléculaire et cellulaire a permis de comprendre et d'expliquer en partie les dommages causés par les UV-C, qu'ils soient directs (réactions de photooxydation) ou indirects (stress oxydatif) et dont les conséquences sont visibles à l'échelle du biofilm (diminution de la surface d'occupation et changements colorimétriques). La **Figure IV.1-1** permet de synthétiser et d'avoir une vision globale des différents dommages mis en évidence au cours de ce travail. On remarque dans un premier temps que les effets directs (flèches rouges) sont nombreux et touchent les différents niveaux d'organisation biologique. Comme nous l'avons mentionné dans les différents résultats et articles publiés, l'ensemble des biomolécules chez les algues (membranes cellulaires, pigments chlorophylliens, protéine D1, chaîne de transport des électrons, ADN...) peut être endommagé sous l'action des UV-C provoquant des dommages irréversibles affectant ainsi l'activité métabolique ainsi que la viabilité des cellules (**Articles 1 et 2**). En ce qui concerne la mortalité des cellules d'algues, nous avons pu montrer dans un deuxième temps, que les UV-C induisaient certaines voies de la mort cellulaire programmée (apoptose) et plus particulièrement la fragmentation de l'ADN (réponse tardive de l'apoptose) (**Article 2**). Cette voie de l'apoptose peut être mise en relation avec le stress oxydatif généré sous l'action des UV-C (flèches vertes) et plus particulièrement avec l'accumulation du H₂O₂ qui sert de signal déclencheur de l'apoptose. Le stress oxydatif est également connu pour causer des dommages sur l'ensemble des constituants et composés cellulaires et notamment ceux impliqués dans les réactions photochimiques de la photosynthèse (chaîne de transport des électrons, chlorophylles, protéines...). Au regard de l'ensemble de ces résultats et de leur confrontation avec la littérature existante, il nous a été cependant difficile de faire la distinction entre la part des dommages dus aux effets directs et la part de ceux dus à des effets indirects. Néanmoins, en ce qui concerne les fortes doses d'UV-C utilisées (150 et 300 kJ m⁻²), nous suggérons que les effets directs soient majoritaires étant donné les caractéristiques hautement énergétiques des photons émis par le rayonnement UV-C. Ces dommages, souvent irréversibles, conduisent inévitablement à la mort des cellules et à un effet « bleaching » important au cours du temps.

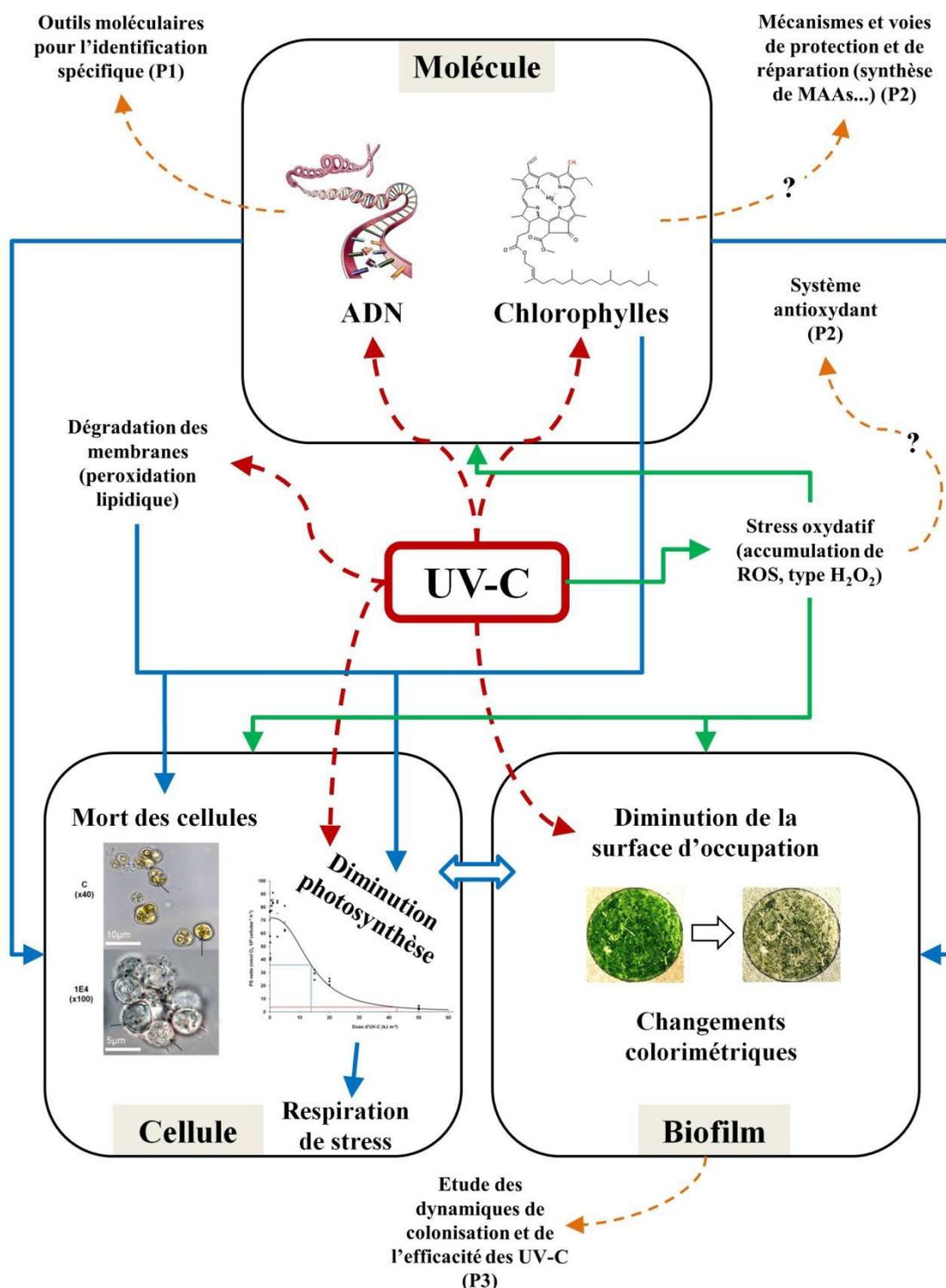


Figure IV.1-1 : Schéma synthétique des différents dommages causés par les UV-C (directs et indirects) et des relations entre les différents niveaux d'organisation biologique pour le modèle d'étude micro-algues vertes. Les flèches pointillées de couleur rouge représentent les dommages directs (réaction de photooxydation). Les flèches de couleur verte montrent les voies et effets du stress oxydatif. Les flèches de couleur bleu indiquent les relations causées à effets entre les différents constituants et compartiments biologiques. Les flèches pointillées de couleur orange représentent les mécanismes non étudiés et/ou proposés en perspectives.

IV.2. Approche pratique sur le terrain

IV.2.1. Etude des facteurs de colonisation et efficacité des traitements UV-C

Le premier objectif des expérimentations menées sur le site d'étude de la grotte des Moidons était de mettre en avant l'efficacité du traitement UV-C sur des biofilms épilithiques phototrophiques proliférant en conditions naturelles. Avant de mettre en application les durées et doses d'UV-C sélectionnées pour leur efficacité d'après l'approche théorique au laboratoire, nous avons tout d'abord mis en place une étude multiparamétrique à deux échelles différentes (celle du biofilm et celle de la cavité) afin de comprendre les dynamiques de colonisation des grottes par ces biofilms. Cette étude s'est avérée pertinente puisqu'elle nous a permis de distinguer plusieurs types de facteurs influençant la répartition des zones colonisées dans la grotte mais également d'interpréter l'efficacité des traitements UV-C en conditions réelles (**Article 3**). Ces différents points sont présentés schématiquement dans la **Figure IV.2-1** où nous montrons les différentes relations mises en évidence au cours de cette thèse entre les compartiments « biofilm », « grotte » et « traitements UV-C ».

Dans un premier temps, nous avons pu montrer qu'un traitement UV-C était efficace au moins pendant une période d'un an avant l'observation et la détection d'un phénomène de recolonisation. Ce phénomène de recolonisation semble être dicté par une combinaison de facteurs propres à chaque biofilm et à chaque site. Tout d'abord, des facteurs à l'échelle du biofilm comme l'épaisseur et le temps d'attente semblent, comme nous l'avons observé en conditions de laboratoire, conditionner l'efficacité des traitements UV-C. Le paramètre épaisseur des biofilms étudiés dans la grotte des Moidons n'a pas été précisément quantifié. Cependant, l'utilisation des mesures colorimétriques s'est avérée pertinente pour évaluer l'intensité de la colonisation de chacun de ces biofilms et ainsi d'observer des différences d'efficacité entre biofilms pour un même traitement. Ensuite, les facteurs à l'échelle de la cavité dont nous avons démontré l'importance dans les phénomènes de colonisation (**Article 3**), jouent un rôle prépondérant dans la reprise de colonisation après traitement. Lorsque l'ensemble de ces facteurs est réuni (vecteur de transport, disponibilité en eau et en lumière), les conditions sont optimales (cercles imbriqués dans la **Figure IV.2-1**) pour une installation et une prolifération rapide des micro-organismes photosynthétiques en milieux souterrains.

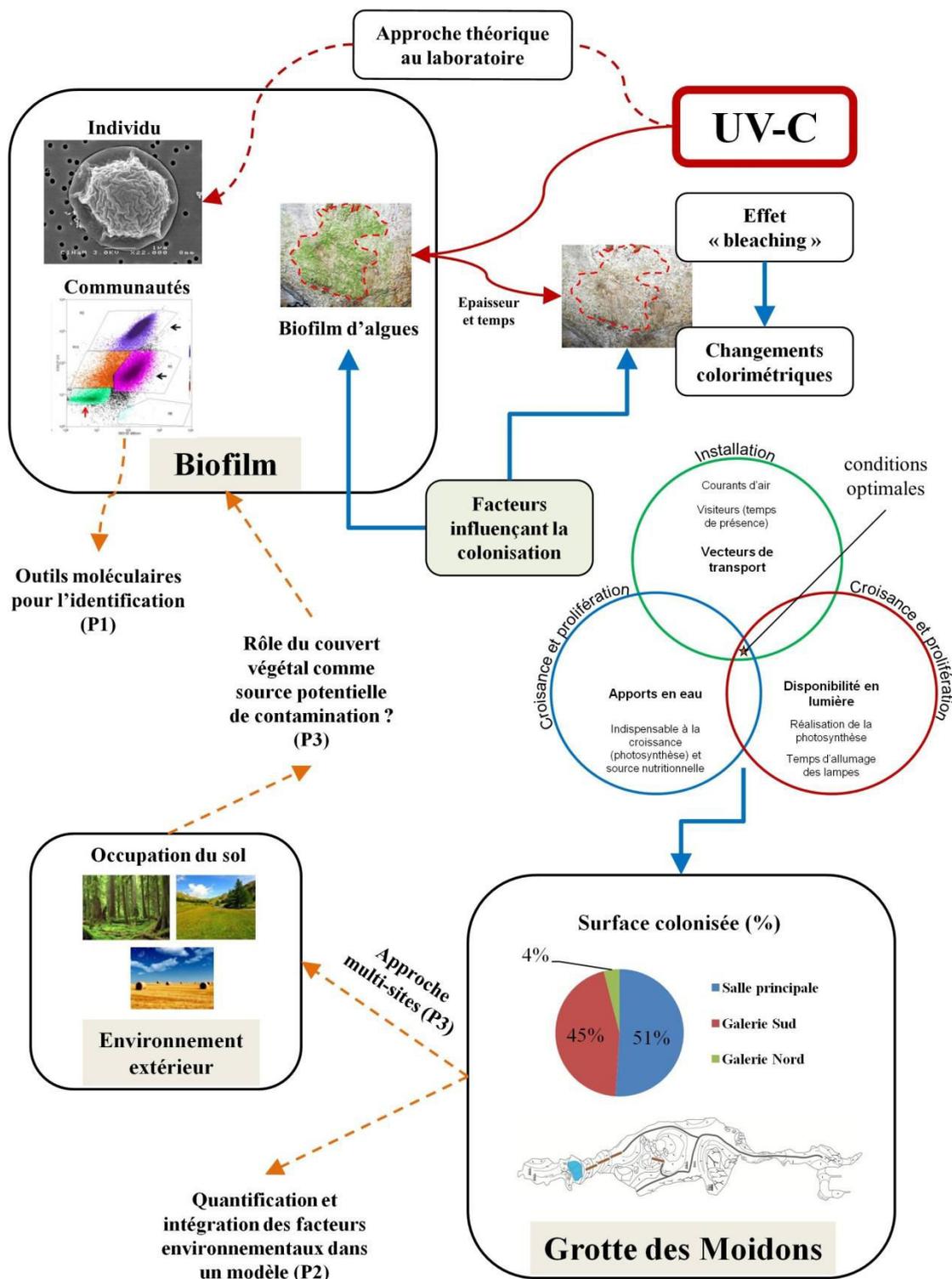


Figure IV.2-1 : Schéma synthétique regroupant les différentes approches étudiées au cours des expérimentations menées sur le terrain. La flèche pointillée de couleur rouge représente les effets de UV-C synthétisés dans la **Figure IV.1-1**. Les flèches pleines rouges montrent les effets des UV-C observés sur les biofilms d'algues traités dans la grotte. Les flèches bleues indiquent les relations mises en évidence entre les compartiments « biofilm », « grotte » et « traitements UV-C ». Les flèches pointillées de couleur orange mettent en avant des approches non étudiées et proposées en perspectives.

Dans la grotte des Moidons la réunion de ces facteurs est différente selon l'endroit où l'on se trouve (salle principale, Galerie Sud et Nord). L'efficacité sur 12 mois des traitements UV-C a été observée sur deux biofilms proliférant dans la salle principale où les conditions sont optimales (**Articles 2 et 3**). Deux autres biofilms proliférant dans la Galerie Sud ont également été traités aux UV-C mais le suivi n'a pu être effectué que pendant une période de 6 mois (**Article 3 et paragraphe III.3.2**). Cette durée de suivi ne nous a pas permis d'observer un éventuel phénomène de recolonisation. Nous suggérons cependant que cette reprise pourrait être bien plus tardive que dans la salle principale étant donné des conditions de prolifération moins propices, notamment au niveau de la disponibilité en lumière plus faible, ralentissant ainsi la prolifération des micro-organismes photosynthétiques. Le fait que les biofilms de la Galerie Sud prolifèrent sur des supports verticaux peut également limiter la vitesse de recolonisation. La rétention en eau et la présence en matière organique sont moins importantes sur ces supports en comparaison avec des supports horizontaux (biofilms de la salle principale).

L'exploitation touristique d'un milieu souterrain est majoritairement responsable des problématiques de contaminations biologiques. En effet, elle conditionne de manière significative l'un des facteurs majeurs favorisant la prolifération d'organismes photosynthétiques : la disponibilité en lumière. La grotte des Moidons est un site ouvert 6 mois dans l'année. Pendant la période de fermeture, l'activité des micro-organismes photosynthétiques et donc les dynamiques de colonisation sont ralenties. Dans d'autres sites, où l'ouverture est quasi permanente, les phénomènes de recolonisation peuvent survenir bien plus tôt et plusieurs traitements aux UV-C seraient alors à préconiser.

Certains facteurs environnementaux non pris en compte au cours de la thèse peuvent également jouer un rôle important dans les phénomènes de colonisation. Il s'agit principalement des relations qu'entretient une cavité souterraine avec son environnement extérieur (flux de matière et d'énergie, couvert végétal...). Ceci constitue une des perspectives de travail à mettre en place afin de mieux comprendre les facteurs influençant la prolifération des micro-organismes photosynthétiques dans les grottes touristiques.

IV.2.2. Intérêts de l'utilisation des traitements UV-C comme méthode alternative aux produits chimiques

D'après les résultats obtenus au cours de cette thèse, le rayonnement UV-C s'est avéré efficace comme méthode de traitement. Les UV-C ont cet avantage à la fois de tuer les micro-organismes mais aussi d'induire la dégradation des pigments qu'ils renferment. Cette approche est donc très intéressante dans le domaine de la conservation des matériaux du patrimoine car, lors de l'utilisation de produits chimiques, l'organisme traité est tué sans que les pigments qu'il renferme ne soient détruits et la couleur persiste donc sur le support (cas de certains algicides). Mais tout l'intérêt de l'utilisation des UV-C dans ce domaine semble être directement associé aux avantages qu'ils proposent en termes de protection des matériaux et de l'environnement. En effet, les UV-C sont avant tout une source lumineuse, donc considérés comme méthode physique de traitement qui ne rejette aucun élément toxique rémanent dans l'environnement. La plupart des matériels d'irradiation utilisant la technologie UV disponibles sur le marché sont des néons dont les verres en quartz filtrent les longueurs d'ondes inférieures à 185 nm créant de l'ozone. De plus, bien que cela reste à prouver par des recherches approfondies, les UV-C ne semblent pas directement avoir de conséquences négatives sur l'intégrité des matériaux. Dans le contexte particulier de la conservation des milieux souterrains, l'utilisation des traitements UV-C semble satisfaire l'enjeu du développement des méthodes alternatives aux produits chimiques. Contrairement aux agents nettoyants tels que le peroxyde d'hydrogène, les composés chlorés ou les produits biocides (algicides, fongicides...), qui peuvent facilement se retrouver en dehors de la zone à traiter par lessivage, les traitements UV-C peuvent être appliqués de manière beaucoup plus contrôlée et ainsi limiter les phénomènes de pollution du réseau karstique ou de perturbation de l'équilibre des populations de la faune cavernicole.

V. PERSPECTIVES DE TRAVAIL

V.1. Etudes et analyses en conditions contrôlées au laboratoire

Identification des micro-organismes étudiés (P1)

L'identification précise des espèces de micro-algues, de champignons mais également de bactéries présentes dans les échantillons biologiques utilisés au cours de la thèse doit être une des priorités pour la poursuite de ces travaux. Les outils de séquençage tels que le polymorphisme de longueur de fragments de restriction terminaux (T-RFLP, *Terminal restriction fragment length polymorphism*), l'analyse automatisée de l'espace intergénique de l'ADN ribosomal (ARISA, *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) où encore le séquençage haut débit (NGS, *Next Generation Sequencing*) pourraient être utilisés dans ce sens.

Mécanismes et voies de protection chez les algues (P2)

En ce qui concerne la résistance des micro-organismes aux UV-C, plusieurs voies et mécanismes de protection et de réparation qui n'ont pas été abordés au cours de la thèse pourraient être étudiés dans la suite des travaux. L'extraction et le dosage des Mycosporine-like amino acids (MAAs) par chromatographie en phase liquide (HPLC) est une approche intéressante pour mettre en évidence une éventuelle synthèse de ces composés UV-protecteurs par des souches d'algues cavernicoles. Ensuite, l'étude des défenses contre le stress oxydatif (système antioxydant) est également une approche intéressante à mettre en œuvre dans la suite des travaux, notamment avec le dosage des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APX) et la glutathion réductase (GR) et autres composés antioxydants à faibles masses moléculaires (tocophérols...).

Analyses à l'échelle du biofilm d'algues (P3)

Les analyses que nous avons mené à l'échelle des biofilms d'algues, à savoir le suivi des paramètres macroscopiques tels que la surface de colonisation et le suivi des mesures colorimétriques, doivent être poursuivies afin d'améliorer la compréhension des dynamiques de colonisation des algues sur un support solide et également pour l'évaluation de l'efficacité des traitements UV-C. Dans ce sens il serait intéressant de mettre en place un système de

culture au laboratoire comme celui présenté dans l'étude de [De Muynck *et al.* \(2009\)](#) (**Figure V.1-1**). Ce système de culture pourrait être modifié pour reproduire les conditions de croissance des algues en milieux souterrains (faible température, faible lumière, conditions oligotrophiques) afin de mettre en évidence les dynamiques de colonisation, de croissance et d'accroche des micro-organismes sur un substrat minéral. De plus, l'utilisation de lampes ou néons UV-C couplés avec l'éclairage normal du système pourrait être intéressant pour évaluer l'effet préventif des UV-C lors des premières phases de colonisation et de croissance des algues.

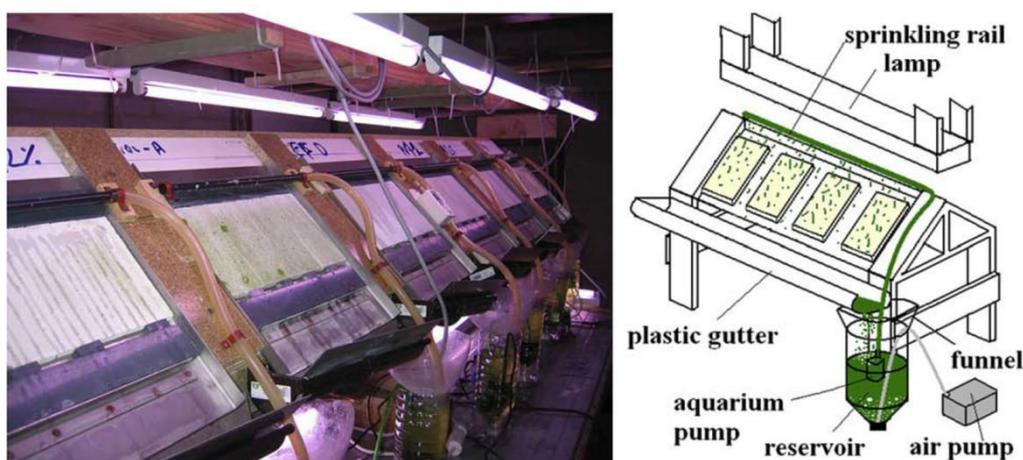


Figure V.1-1 : Système en circuit fermé de culture d'algues sur support solide. D'après [De Muynck *et al.* \(2009\)](#).

Les travaux concernant les effets des UV-C sur des biofilms d'algues en fonction de l'épaisseur du biofilm doivent également être poursuivis. La recherche de méthodes permettant la mesure précise de l'épaisseur d'un biofilm est à prospecter afin d'utiliser ce paramètre comme une variable quantitative et de la mettre en relation avec la durée ou dose d'UV-C à utiliser.

Analyse de l'effet des UV-C sur les pigments de mélanine

En ce qui concerne la souche mélanisée *Ulocladium* sp., la Spectroscopie Raman de surface améliorée (surface enhanced Raman spectroscopy, SERS) pourrait être utilisée afin de détecter d'éventuels changements dans la structure de la molécule de mélanine. Cette approche permettrait d'adapter les traitements UV-C pour optimiser leur efficacité en termes d'éradication de souches fongiques mélanisées.

V.2. Etudes et analyses *in-situ* et application de la méthode dans des contextes variés

Identification des communautés microbiennes (P1)

L'analyse des différentes communautés microbiennes proliférant dans la grotte des Moidons n'a été que partiellement réalisée au cours de ce travail. Des approches morphologiques et cytométriques ont été utilisées afin de distinguer plusieurs groupes de micro-organismes. L'identification précise des différents micro-organismes présents dans la grotte est une approche intéressante à mettre en œuvre dans la suite des travaux. L'utilisation d'outils et de techniques utilisés en biologie moléculaire (T-RFLP, ARISA, NGS...) permettrait d'identifier et d'établir une liste des micro-organismes présents dans la grotte et ainsi de mieux comprendre les dynamiques de colonisation (successions écologiques...). Après identification des communautés microbiennes, certains critères de diversité et de richesse spécifique (indices de Shannon et de Simpson) pourraient être calculés et mis en relation avec les facteurs environnementaux mesurés à l'échelle du biofilm (quantité de lumière, type de support...) et de la cavité (zones sèches ou humides, temps d'allumage des lampes, concentrations en CO₂...). La diversité microbienne pourrait être également évaluée avant et après traitements aux UV-C afin d'étudier les changements de composition des communautés microbiennes et éventuellement de mettre en avant certaines résistances aux UV-C.

Etude à l'échelle de la cavité (P2)

L'étude des facteurs environnementaux à l'échelle de la cavité (grotte des Moidons) a été basée sur de l'observation (infiltration et circulation des eaux) ou de la semi-quantification (temps d'allumage des lampes et temps de présence des visiteurs). Des mesures quantitatives de ces paramètres seraient à envisager pour leur intégration dans un modèle statistique afin de mettre en évidence la part explicative de chacune de ces variables dans les dynamiques et dans la répartition de la colonisation biologique dans la grotte.

Approche multi-sites (P3)

Les dynamiques de colonisation étant propres à chaque site, les futures études et travaux pourraient s'orienter vers une approche multi-sites afin de comprendre et de mettre en évidence l'efficacité des traitements UV-C dans différents contextes. La recherche de nouveaux sites cavernicoles expérimentaux est donc essentielle pour une approche scientifique pertinente au service de la conservation de ces milieux. En effet, il est important de mettre en place une approche globale et pluridisciplinaire qui tienne compte de la complexité d'un système karstique en intégrant et mesurant l'ensemble des paramètres et facteurs abiotiques et biotiques à l'échelle des biofilms de communautés de micro-organismes, de la cavité entière ainsi que de son environnement extérieur (rôle du couvert végétal dans l'apport de contamination biologique, transfert de matière et d'énergie...).

Aspects techniques et amélioration du procédé

L'utilisation des traitements UV-C en milieux cavernicoles est cependant limitée par certains aspects techniques comme l'accessibilité de certaines zones à traiter (plafonds, parois éloignées...). Les caractéristiques d'irradiation multidirectionnelle des néons UV sont un frein à l'efficacité de ceux-ci sur des zones à traiter éloignées. Dans ce sens, l'utilisation de lampes à LED UV-C est à prospecter. En effet, les lampes à LED offrent l'avantage d'avoir un rayonnement unidirectionnel et dont l'énergie est concentrée en une zone restreinte ce qui accroît son efficacité. De plus, les LED sont également intéressantes en termes d'économie d'énergie.

Application dans des contextes variés de conservation

A la vue des résultats obtenus sur les matières picturales, les traitements UV-C pourraient éventuellement être proposés dans des sites à forte valeur patrimoniale avec la présence de peintures rupestres comme par exemple les grottes et abris ornés.

D'une manière plus générale, l'utilisation des UV-C peut être envisagée sur tous types de matériaux pierreux colonisés par des micro-organismes et induisant des phénomènes de biodétérioration : statues dans les parcs, fontaines, façades de bâtiments et de monuments historiques. Dans ces contextes, les communes et conservateurs sont de plus en plus sensibles à la recherche de nouveaux procédés pour limiter l'utilisation des produits chimiques.

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Sites internet

1. <http://2011.igem.org/Team:Glasgow/Biofilm>
2. www.grottes-en-france.com
3. www.utc.fr/~tthomass/Themes/Unites/.
4. <http://inpn.mnhn.fr/carto/metropole/znieff/430020536/2>

Directives européennes

Directive 92/43/CEE du Conseil du 21 mai 1992 concernant la conservation des habitats naturels ainsi que de la faune et de la flore sauvages. Journal officiel n° L 206 du 22/07/1992 p. 0007 – 0050.

Directive 98/8/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 février 1998 concernant la mise sur le marché des produits biocides. Journal officiel n° L 123 du 24/04/1998 p. 0001 – 0063.

Articles et ouvrages scientifiques

A

Adhikary, S.P., Sahu, J.K., 1998. UV protecting pigment of the terrestrial cyanobacterium *Tolypothrix byssoidea*. Journal of Plant Physiology 153, 770-773.

Aguilera, J., Karsten, U., Lippert, H., Vögele, B., Philipp, E., Hanelt, D., Wiencke, C., 1999. Effects of solar radiation on growth, photosynthesis and respiration of marine macroalgae from the Arctic. Marine Ecology progress Series 191, 109-119.

Aiamla-or, S., Yamauchi, N., Takino, S., Shigyo, M., 2009. Effect of UV-A and UV-B irradiation on broccoli (*Brassica oleracea* L. Italica Group) floret yellowing during storage. Postharvest Biology and Technology 54, 177-179.

Albertano, P., 2012. Cyanobacterial biofilms in monuments and caves, In Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time. ed. W.B. A., pp. 317-343. Springer Netherlands.

Aleya, L., 1991. The concept of ecological succession applied to an eutrophic lake

through the seasonal coupling of diversity index and several parameters. *Archiv für Hydrobiologie* 120.

Aleya, L., Dauta, A., Reynolds, C.S., 2011. Endogenous regulation of the growth-rate responses of a spring-dwelling strain of the freshwater alga, *Chlorella minutissima*, to light and temperature. *European Journal of Protistology* 47, 239-244.

Aleya, L., Desmolles, F., Michard, M., Bonnet, M., Devaux, J., 1994. The deterministic factors of the *Microcystis aeruginosa* blooms over a biyearly survey in the hypereutrophic reservoir of Villerest (Roanne, France). *Archiv für Hydrobiologie* 4, 489-515.

Anderson, D.M., Alpermann, T.J., Cembella, A.D., Collos, Y., Masseret, E., Montresor, M., 2012. The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae* 14, 10-35.

Antonelli, F., Grifoni, D., Sabatini, F., Zipoli, G., 1997. Morphological and physiological responses of bean plants to supplemental UV radiation in a Mediterranean climate, In *UV-B and Biosphere*. eds J. Rozema, W.W.C. Gieskes, S.C. Geijn, C. Nolan, H. Boois, pp. 127-136. Springer Netherlands.

Aráoz, R., Häder, D.-P., 1999. Phycoerythrin synthesis is induced by solar UV-B in the cyanobacterium *Nostoc*. *Plant Physiology and Biochemistry* 37, 223-229.

Athanassiou, A., Hill, A.E., Fourrier, T., Burgio, L., Clark, R.J.H., 2000. The effects of UV laser light radiation on artists' pigments. *Journal of Cultural Heritage* 1, Supplement 1, S209-S213.

Atienzar, F.A., Cordi, B., Donkin, M.E., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2000. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmata*. *Aquatic Toxicology* 50, 1-12.

Autin, O., Romelot, C., Rust, L., Hart, J., Jarvis, P., MacAdam, J., Parsons, S.A., Jefferson, B., 2013. Evaluation of a UV-light emitting diodes unit for the removal of micropollutants in water for low energy advanced oxidation processes. *Chemosphere* 92, 745-751.

Azúa-Bustos, A., González-Silva, C., Mancilla, R.A., Salas, L., Palma, R.E., Wynne, J.J., McKay, C.P., Vicuña, R., 2009. Ancient Photosynthetic Eukaryote Biofilms in an Atacama Desert Coastal Cave. 485-496.

B

Baker, A., Genty, D., 1998. Environmental pressures on conserving cave speleothems: effects of changing surface land use and increased cave tourism. *Journal of Environmental Management* 53, 165-175.

Banerjee, G., Gupta, N., Kapoor, A., Raman, G., 2005. UV induced bystander signaling leading to apoptosis. *Cancer Letters* 223, 275-284.

Baqué, M., Viaggiu, E., Scalzi, G., Billi, D., 2013. Endurance of the endolithic desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* under UVC radiation. *Extremophiles* 17, 161-169.

Barberousse, H., Ruot, B., Yéprémian, C., Boulon, G., 2007. An assessment of façade coatings against colonisation by aerial algae and cyanobacteria. *Building and Environment* 42, 2555-2561.

Barberousse, H., Tell, G., Yéprémian, C., Couté, A., 2006. Diversity of algae and cyanobacteria growing on building facades in France. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 120, 81-105.

Barsanti, L., Coltelli, P., Evangelista, V., Frassanito, A., Passarelli, V., Vesentini, N., Gualtieri, P., 2008. The World of Algae, In *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*. eds V. Evangelista, L. Barsanti, A. Frassanito, V. Passarelli, P. Gualtieri, pp. 1-15. Springer Netherlands.

Begum, M., Hocking, A.D., Miskelly, D., 2009. Inactivation of food spoilage fungi by ultra violet (UVC) irradiation. *International Journal of Food Microbiology* 129, 74-77.

Berdoulay, M., 2008. Analyses physico-chimiques et microbiologiques de façades en pierre exposées aux embruns marins du Golfe de Gascogne, p. 226. Université de Pau et des Pays de l'Adour.

Bichai, F., Barbeau, B., Payment, P., 2009. Protection against UV disinfection of *E. coli* bacteria and *B. subtilis* spores ingested by *C. elegans* nematodes. *Water Research* 43, 3397-3406.

Björn, L.O., 2007. Stratospheric ozone, ultraviolet radiation, and cryptogams. *Biological Conservation* 135, 326-333.

Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* 91, 179-194.

Bolige, A., Kiyota, M., Goto, K., 2005. Circadian rhythms of resistance to UV-C and

UV-B radiation in *Euglena* as related to 'escape from light' and 'resistance to light'. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 81, 43-54.

Bolívar, F.C., Sánchez-Castillo, P.M., 1997. Biomineralization processes in the fountains of the Alhambra, Granada, Spain. *International Biodeterioration & Biodegradation* 40, 205-215.

Borderie, F., Alaoui-Sehmer, L., Bousta, F., Alaoui-Sossé, B., Aleya, L., 2014a. Cellular and molecular damage caused by high UV-C irradiation of the cave-harvested green alga *Chlorella minutissima*: Implications for cave management. *International Biodeterioration & Biodegradation* 93, 118-130.

Borderie, F., Alaoui-Sehmer, L., Bousta, F., Oriol, G., Rieffel, D., Richard, H., Alaoui-Sosse, B., 2012. UV irradiation as an alternative to chemical treatments: a new approach against algal biofilms proliferation contaminating building facades, historical monuments and touristic subterranean environments, In *Algae: Ecology, Economic uses and Environmental Impact*. eds D. Krueger, H. Meyer, pp. 1-28. Nova Science Publishers, Inc.

Borderie, F., Alaoui-Sehmer, L., Raouf, N., Bousta, F., Oriol, G., Rieffel, D., Alaoui-Sossé, B., 2011. UV-C irradiation as a tool to eradicate algae in caves. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 579-584.

Borderie, F., Tête, N., Cailhol, D., Alaoui-Sehmer, L., Bousta, F., Rieffel, D., Aleya, L., Alaoui-Sossé, B., 2014b. Factors driving epilithic algal colonization in show caves and new insights into combating biofilm development with UV-C treatments. *Science of The Total Environment* 484, 43-52.

Brinkmann, R., Parise, M., 2012. *Karst Environments: Problems, Management, Human Impacts, and Sustainability - An Introduction to the Special Issue*. *Journal of Cave and Karst Studies* 74, 135-136.

Brunet, J., Fortier, L., Stefanaggi, M., Vouvé, J., Malaurent, P., 2000. *Conservation et protection de l'art préhistorique*. LRMH, Direction de l'architecture et du Patrimoine du Ministère de la Culture et de la Communication.

Buma, A.G.J., Walter Helbling, E., Karin de Boer, M., Villafañe, V.E., 2001. Patterns of DNA damage and photoinhibition in temperate South-Atlantic picophytoplankton exposed to solar ultraviolet radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 62, 9-18.

Büchert, A.M., Civello, P.M., Martínez, G.A., 2011a. Chlorophyllase versus

pheophytinase as candidates for chlorophyll dephytilation during senescence of broccoli. *Journal of Plant Physiology* 168, 337-343.

Büchert, A.M., Civello, P.M., Martínez, G.A., 2011b. Effect of hot air, UV-C, white light and modified atmosphere treatments on expression of chlorophyll degrading genes in postharvest broccoli (*Brassica oleracea* L.) florets. *Scientia Horticulturae* 127, 214-219.

C

Caneva, G., Nugari, M.P., Salvadori, O., 2008. *Plant Biology for Cultural heritage: Biodeterioration and Conservation*. Getty Conservation Institute.

Carreto, J.I., Carignan, M.O., 2011. Mycosporine-Like Amino Acids: Relevant Secondary Metabolites. Chemical and Ecological Aspects. *Marine Drugs* 9, 387-446.

Cennamo, P., Marzano, C., Ciniglia, C., Pinto, G., Cappelletti, P., Caputo, P., Pllio, A., 2012. A survey of the algal flora of anthropogenic caves of Campi Flegrei (Naples, Italy) archeological district. *Journal of Cave and Karst Studies* 74, 243-250.

Chairat, B., Nutthachai, P. and Varit, S., 2013. Effect of UV-C treatment on chlorophyll degradation, antioxidant enzyme activities and senescence in Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*). *International Food Research Journal* 20, 623-628.

Chappé, M., Hildenhagen, J., Dickmann, K., Bredol, M., 2003. Laser irradiation of medieval pigments at IR, VIS and UV wavelengths. *Journal of Cultural Heritage* 4, Supplement 1, 264-270.

Charles, M.T., Tano, K., Asselin, A., Arul, J., 2009. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit. V. Constitutive defence enzymes and inducible pathogenesis-related proteins. *Postharvest Biology and Technology* 51, 414-424.

Cheeseman, J.M., 2006. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany* 57, 2435-2444.

Chen, B., Wang, L., Song, S., Huang, B., Sun, J., Liu, H., 2011. Comparisons of picophytoplankton abundance, size, and fluorescence between summer and winter in northern South China Sea. *Continental Shelf Research* 31, 1527-1540.

Chen, L., Xie, M., Bi, Y., Wang, G., Deng, S., Liu, Y., 2012. The combined effects of UV-B radiation and herbicides on photosynthesis, antioxidant enzymes and DNA damage in two bloom-forming cyanobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 224-230.

Chun, H., Kim, J., Chung, K., Won, M., Song, K.B., 2009. Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, and *Campylobacter jejuni* in ready-to-eat sliced ham using UV-C irradiation. *Meat Science* 83, 599-603.

Ciferri, O., 1999. Microbial Degradation of Paintings. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 879-885.

Cigna, A.A., 1993. Environmental management of tourist caves. *Environmental Geology* 21, 173-180.

Cigna, A.A., 2012. Show caves, In *Encyclopedia of caves*. eds D.C. Culver, W.B. White, pp. 690-697. Academic Press in Elsevier.

Clément-Larosière, B., 2012. Etude de la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO₂, In *Sciences pour l'ingénieur*. p. 232. Centrale paris.

Cockell, C.S., Knowland, J., 1999. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews* 74, 311-345.

Cordi, B., Hyde, P., Donkin, M.E., Price, D.N., Depledge, M.H., 1999. Evaluation of in vivo thallus absorptance and chlorophyll fluorescence as biomarkers of UV-B exposure and effects in marine macroalgae from different tidal levels. *Marine Environmental Research* 48, 193-212.

Costa, L., Vicente, A.R., Civello, P.M., Chaves, A.R., Martínez, G.A., 2006. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biology and Technology* 39, 204-210.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial Biofilms. *Annual Revue of Microbiology* 49, 711-745.

Cutler, N.A., Oliver, A.E., Viles, H.A., Ahmad, S., Whiteley, A.S., 2013a. The characterisation of eukaryotic microbial communities on sandstone buildings in Belfast, UK, using TRFLP and 454 pyrosequencing. *International Biodeterioration & Biodegradation* 82, 124-133.

Cutler, N.A., Viles, H.A., Ahmad, S., McCabe, S., Smith, B.J., 2013b. Algal 'greening' and the conservation of stone heritage structures. *Science of The Total Environment* 442, 152-164.

D

Dadachova, E., Bryan, R.A., Huang, X., Moadel, T., Schweitzer, A.D., Aisen, P., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., 2007. Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. *PLoS ONE* 2.

Dahms, H.-U., Lee, J.-S., 2010. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquatic Toxicology* 97, 3-14.

Dakal, T., Cameotra, S., 2012. Microbially induced deterioration of architectural heritages: routes and mechanisms involved. *Environmental Sciences Europe* 24, 36.

Danon, A., Gallois, P., 1998. UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 437, 131-136.

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.

Devesa, R., Moldes, A., Díaz-Fierros, F., Barral, M.T., 2007. Extraction study of algal pigments in river bed sediments by applying factorial designs. *Talanta* 72, 1546-1551.

Dragovich, D., Grose, J., 1990. Impact of tourists on carbon dioxide levels at Jenolan Caves, Australia: an examination of microclimatic constraints on tourist cave management. *Geoforum* 21, 111-120.

Duval, B., Shetty, K., Thomas, W., 1999. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *Journal of Applied Phycology* 11, 559-566.

E

Ekelund, N.G.A., 2000. Interactions between photosynthesis and 'light-enhanced dark respiration' (LEDR) in the flagellate *Euglena gracilis* after irradiation with ultraviolet radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 55, 63-69.

Elleder, M., Borovanský, J., 2001. Autofluorescence of Melanins Induced by Ultraviolet Radiation and Near Ultraviolet Light. A Histochemical and Biochemical Study. *The Histochemical Journal* 33, 273-281.

Engel, A.S., Porter, M.L., Stern, L.A., Quinlan, S., Bennett, P.C., 2004. Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic

springs dominated by chemolithoautotrophic "Epsilonproteobacteria". FEMS Microbiology Ecology 51, 31-53.

F

Faimon, J., Stelcl, J., Kubesová, S., Zimák, J., 2003. Environmentally acceptable effect of hydrogen peroxide on cave "lamp-flora", calcite speleothems and limestones. Environmental Pollution 122, 417-422.

Falkowski, P.G., Owens, T.G., Ley, A.C., Mauzerall, D.C., 1981. Effects of growth irradiance levels on the ratio of reaction centers in two species of marine phytoplankton. Plant physiology 68, 969-973.

Feng, H., Li, S., Xue, L., An, L., Wang, X., 2007. The interactive effects of enhanced UV-B radiation and soil drought on spring wheat. South African Journal of Botany 73, 429-434.

Fernandez-Cortes, A., Calaforra, J.M., Sanchez-Martos, F., 2006. Spatiotemporal analysis of air conditions as a tool for the environmental management of a show cave (Cueva del Agua, Spain). Atmospheric Environment 40, 7378-7394.

Figuroa, F.L., Korbee, N., Carrillo, P., Medina-SÁnchez, J.M., Mata, M., Bonomi, J., SÁnchez-Castillo, P.M., 2009. The effects of UV radiation on photosynthesis estimated as chlorophyll fluorescence in *Zygnemopsis decussata* (Chlorophyta) growing in a high mountain lake (Sierra Nevada, Southern Spain). Journal of Limnology 68, 206-216.

Folly, P., 2000. Catabolisme de la chlorophylle b : structures, mécanismes et synthèses, In Institut de Chimie Organique. p. 200. Université de Fribourg (Suisse).

Fonseca, A.J., Pina, F., Macedo, M.F., Leal, N., Romanowska-Deskins, A., Laiz, L., Gómez-Bolea, A., Saiz-Jimenez, C., 2010. Anatase as an alternative application for preventing biodeterioration of mortars: Evaluation and comparison with other biocides. International Biodeterioration & Biodegradation 64, 388-396.

Frohmeyer, H., Staiger, D., 2003. Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants. Balancing Damage and Protection. Plant Physiology 133, 1420-1428.

Fukuda, S., Satoh, A., Kasahara, H., Matsuyama, H., Takeuchi, Y., 2008. Effects of ultraviolet-B irradiation on the cuticular wax of cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons. Journal of Plant Research 121, 179-189.

G

Gadjev, I., Stone, J.M., Gechev, T.S., 2008. Chapter 3: Programmed Cell Death in Plants: New Insights into Redox Regulation and the Role of Hydrogen Peroxide, In International Review of Cell and Molecular Biology. ed. W.J. Kwang, pp. 87-144. Academic Press.

Gao, Y., Cui, Y., Xiong, W., Li, X., Wu, Q., 2009. Effect of UV-C on Algal Evolution and Differences in Growth Rate, Pigmentation and Photosynthesis Between Prokaryotic and Eukaryotic Algae. Photochemistry and Photobiology 85, 774-782.

Gay, C., Collins, J., Gebicki, J.M., 1999. Hydroperoxide Assay with the Ferric-Xylenol Orange Complex. Analytical Biochemistry 273, 149-155.

Gaylarde, P.M., Gaylarde, C.C., 2000. Algae and cyanobacteria on painted buildings in Latin America. International Biodeterioration & Biodegradation 46, 93-97.

Gevaert, F., Creach, A., Davoult, D., Holl, A.C., Seuront, L., Lemoine, Y., 2002. Photo-inhibition and seasonal photosynthetic performance of the seaweed *Laminaria saccharina* during a simulated tidal cycle: chlorophyll fluorescence measurements and pigment analysis. Plant, Cell & Environment 25, 859-872.

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48, 909-930.

Graening, G.O., Brown, A.V., 2003. Ecosystem dynamics and pollution effects in an Ozark Cave stream. JAWRA Journal of the American Water Resources Association 39, 1497-1507.

Grobbelaar, J.U., 2000. Lithophytic algae: A major threat to the karst formation of show caves. Journal of Applied Phycology 12, 309-315.

Groth, I., Vettermann, R., Schuetze, B., Schumann, P., Saiz-Jimenez, C., 1999. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). Journal of Microbiological Methods 36, 115-122.

Grégori, G., Citterio, S., Ghiani, A., Labra, M., Sgorbati, S., Brown, S., Denis, M., 2001. Resolution of Viable and Membrane-Compromised Bacteria in Freshwater and Marine Waters Based on Analytical Flow Cytometry and Nucleic Acid Double Staining. Applied and Environmental Microbiology 67, 4662-4670.

Guillitte, O., 1995. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. Science

of The Total Environment 167, 215-220.

Gómez, I., Pérez-Rodríguez, E., Viñepla, B., Figueroa, F.L., Karsten, U., 1998. Effects of solar radiation on photosynthesis, UV-absorbing compounds and enzyme activities of the green alga *Dasycladus vermicularis* from southern Spain. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 47, 46-57.

H

Halpern, B.S., Walbridge, S., Selkoe, K.A., Kappel, C.V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J.F., Casey, K.S., Ebert, C., Fox, H.E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H.S., Madin, E.M.P., Perry, M.T., Selig, E.R., Spalding, M., Steneck, R., Watson, R., 2008. A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. Science 319, 948-952.

Hannen, E.J.v., Gons, H.J., 1997. UVC-induced lysis and detritus production of *Oscillatoria limnetica* in a two-stage continuous-flow system. Journal of Plankton Research 19, 723-733.

Herrera, L.K., Arroyave, C., Guimet, P., de Saravia, S.G., Videla, H., Biodeterioration of peridotite and other constructional materials in a building of the Colombian cultural heritage. International Biodeterioration & Biodegradation 54, 135-141.

Herrera, L.K., Arroyave, C., Guimet, P., de Saravia, S.G., Videla, H., 2004. Biodeterioration of peridotite and other constructional materials in a building of the Colombian cultural heritage. International Biodeterioration & Biodegradation 54, 135-141.

Herrmann, H., Ghetti, F., Scheuerlein, R., Häder, D.-P., 1995. Photosynthetic Oxygen and Fluorescence Measurements in *Ulva laetevirens* Affected by Solar Irradiation. Journal of Plant Physiology 145, 221-227.

Herrmann, H., Häder, D.P., Köfferlein, M., Seidlitz, H.K., Ghetti, F., 1996. Effects of UV radiation on photosynthesis of phytoplankton exposed to solar simulator light. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 34, 21-28.

Hollósy, F., 2002. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. Micron 33, 179-197.

Holzinger, A., Lütz, C., 2006. Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. Micron 37, 190-207.

Hörtensteiner, S., 2009. Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding

protein degradation during senescence. *Trends in Plant Science* 14, 155-162.

Hörtensteiner, S., Kräutler, B., 2011. Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807, 977-988.

Hosseini Sarghein, S., Carapetian, J., Khara, J., 2008. Effects of UV-Radiation on Photosynthetic Pigments and UV Absorbing Compounds in *Capsicum longum* (L.). *International Journal of Botany* 4, 486-490.

Hoyos, M., Soler, V., Cañaveras, J.C., Sánchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E., 1998. Microclimatic characterization of a karstic cave: human impact on microenvironmental parameters of a prehistoric rock art cave (Candamo Cave, northern Spain). *Environmental Geology* 33, 231-242.

J

Janknegt, P.J., Rijstenbil, J.W., van de Poll, W.H., Gechev, T.S., Buma, A.G.J., 2007. A comparison of quantitative and qualitative superoxide dismutase assays for application to low temperature microalgae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 87, 218-226.

Jansen, M.A.K., Gaba, V., Greenberg, B.M., 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* 3, 131-135.

Jayakumar, M., Eyini, M., Selvinthangadurai, P., Lingakumar, K., Premkumar, A., Kulandaivelu, G., 1999. Changes in Pigment Composition and Photosynthetic Activity of Aquatic Fern (*Azolla Microphylla* Kaulf.) Exposed to Low Doses of UV-C (254 nm) Radiation. *Photosynthetica* 37, 33-38.

John, D.M., Whitton, B.A., Broof, A.J., 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae.*

Johnson, K., 1979. Control of Lampenflora at Waitomo Caves, New Zealand, In *Cave Management in Australia III: Proceedings of the 3rd Australasian Cave Tourism and Management Conference, Mount Gambier.* pp. 105-122.

Jones, B., 2010. Speleothems in a wave-cut notch, Cayman Brac, British West Indies: The integrated product of subaerial precipitation, dissolution, and microbes. *Sedimentary Geology* 232, 15-34.

Joshi, P., Gartia, S., Pradhan, M.K., Biswal, B., 2011. Photosynthetic response of clusterbean chloroplasts to UV-B radiation: Energy imbalance and loss in redox homeostasis between QA and QB of photosystem II. *Plant Science* 181, 90-95.

Jurado, V., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C., 2008. Entomogenous fungi and the conservation of the cultural heritage: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 325-330.

K

Karsten, U., 2008. Defense Strategies of Algae and Cyanobacteria Against Solar Ultraviolet Radiation, In *Algal Chemical Ecology*. ed. C.D. Amsler, pp. 273-296. Springer Berlin Heidelberg.

Karsten, U., Lembcke, S., Schumann, R., 2007. The effects of ultraviolet radiation on photosynthetic performance, growth and sunscreen compounds in aeroterrestrial biofilm algae isolated from building facades. *Planta* 225, 991-1000.

Kitajima, K., Hogan, K.P., 2003. Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant, Cell & Environment* 26, 857-865.

Kowalczyk, A.J., Froelich, P.N., 2010. Cave air ventilation and CO₂ outgassing by radon-222 modeling: How fast do caves breathe? *Earth and Planetary Science Letters* 289, 209-219.

Kowalski, W., 2009. *Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

L

Lebaron, P., Servais, P., Agogué, H., Courties, C., Joux, F., 2001. Does the High Nucleic Acid Content of Individual Bacterial Cells Allow Us To Discriminate between Active Cells and Inactive Cells in Aquatic Systems? *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1775-1782.

Lee, T.-M., Shiu, C.-T., 2009. Implications of mycosporine-like amino acid and antioxidant defenses in UV-B radiation tolerance for the algae species *Pterocladia*

capillacea and *Gelidium amansii*. *Marine Environmental Research* 67, 8-16.

Lefèvre, M., 1974. La maladie verte de Lascaux. *International Institute for Conservation of Historic and Artistic Works* 19, 126-156.

Lewin, R., 2002. Prochlorophyta – a matter of class distinctions. *Photosynthesis Research* 73, 59-61.

Longnecker, K., Sherr, B.F., Sherr, E.B., 2005. Activity and Phylogenetic Diversity of Bacterial Cells with High and Low Nucleic Acid Content and Electron Transport System Activity in an Upwelling Ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7737-7749.

M

Ma, Z., Gao, K., 2010. Spiral breakage and photoinhibition of *Arthrospira platensis* (Cyanophyta) caused by accumulation of reactive oxygen species under solar radiation. *Environmental and Experimental Botany* 68, 208-213.

Mandal, S., Rath, J., 2013. Algal colonization and its ecophysiology on the fine sculptures of terracotta monuments of Bishnupur, West Bengal, India. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, 291-299.

Mangin, A., Bourges, F., d'Hulst, D., 1999. La conservation des grottes ornées: un problème de stabilité d'un système naturel (l'exemple de la grotte préhistorique de Gargas, Pyrénées françaises). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science* 328, 295-301.

Martinez, A., Asencio, A.D., 2010. Distribution of Cyanobacteria at the Gelada Cave (Spain) by physical parameters. *Journal of Cave and Karst Studies* 72, 11-20.

Matile, P., Hörtensteiner, S., Thomas, H., 1999. Chlorophyll degradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 67-95.

Menetrez, M.Y., Foarde, K.K., Dean, T.R., Betancourt, D.A., 2010. The effectiveness of UV irradiation on vegetative bacteria and fungi surface contamination. *Chemical Engineering Journal* 157, 443-450.

Miller, A., Dionísio, A., Laiz, L., Macedo, M., Saiz-Jimenez, C., 2009a. The influence of inherent properties of building limestones on their bioreceptivity to phototrophic microorganisms. *Annals of Microbiology* 59, 705-713.

Miller, A., Dionísio, A., Macedo, M.F., 2006. Primary bioreceptivity: A comparative study of different Portuguese lithotypes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57, 136-142.

Miller, A.Z., Laiz, L., Dionísio, A., Macedo, M.F., Saiz-Jimenez, C., 2009b. Growth of phototrophic biofilms from limestone monuments under laboratory conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 860-867.

Miller, A.Z., Sanmartín, P., Pereira-Pardo, L., Dionísio, A., Saiz-Jimenez, C., Macedo, M.F., Prieto, B., 2012. Bioreceptivity of building stones: A review. *Science of The Total Environment* 426, 1-12.

Mitbavkar, S., Rajaneesh, K.M., Anil, A.C., Sundar, D., 2012. Picophytoplankton community in a tropical estuary: Detection of *Prochlorococcus*-like populations. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 107, 159-164.

Moharikar, S., D'Souza, J.S., Kulkarni, A.B., Rao, B.J., 2006. Apoptotic-like cell death pathway is induced in unicellular chlorophyte *Chlamydomonas Reinhardtii* (Chlorophyceae) cells following UV irradiation: detection and functional analyses. *Journal of Phycology* 42, 423-433.

Moreau, C., Vergès-Belmin, V., Leroux, L., Oriol, G., Fronteau, G., Barbin, V., 2008. Water-repellent and biocide treatments: Assessment of the potential combinations. *Journal of Cultural Heritage* 9, 394-400.

Mulec, J., 2008. Microorganisms in Hypogean: Examples from Slovenian Karst Caves. *Acta Carsologica* 37, 153-160.

Mulec, J., 2012. Lampenflora, In *Encyclopedia of caves*. eds D.C. Culver, W.B. White, pp. 451-456. Academic Press in Elsevier.

Mulec, J., 2014. Human impact on underground cultural and natural heritage sites, biological parameters of monitoring and remediation actions for insensitive surfaces: Case of Slovenian show caves. *Journal for Nature Conservation* 22, 132-141.

Mulec, J., Kosi, G., 2009. Lampenflora algae and methods of growth control. *Journal of Cave and Karst Studies* 71, 109-115.

Mulec, J., Kosi, G., Vrhovsek, D., 2008. Characterization of cave aerophytic algal communities and effects of irradiance levels on production of pigments. *Journal of Cave and Karst Studies* 70, 3-12.

N

Najeeb, U., Xu, L., Ahmed, Z., Rasheed, M., Jilani, G., Naeem, M., Shen, W., Zhou, W., 2011. Ultraviolet-C mediated physiological and ultrastructural alterations in *Juncus effusus* L. shoots. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 481-488.

Negoescu, A., Lorimier, P., Labat-Moleur, F., Drouet, C., Robert, C., Guillermet, C., Brambilla, C., Brambilla, E., 1996. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 44, 959-968.

Nikolaev, Y.A., Plakunov, V.K., 2007. Biofilm—"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* 76, 125-138.

Nugari, M.P., Pietrini, A.M., Caneva, G., Imperi, F., Visca, P., 2009. Biodeterioration of mural paintings in a rocky habitat: The Crypt of the Original Sin (Matera, Italy). *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 705-711.

Nuhoglu, Y., Oguz, E., Uslu, H., Ozbek, A., Ipekoglu, B., Ocak, I., Hasenekoglu, I., 2006. The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey. *Science of The Total Environment* 364, 272-283.

O

Orial, G., Bousta, F., François, A., Pallot-Frossard, I., Warscheid, T., 2009. Gestion des activités biologiques à Lascaux : identification des microorganismes, contrôles, traitements, p. 29, LRMH (France) LBW Bioconsult (Allemagne).

Ortega-Morales, B.O., Gaylarde, C., Anaya-Hernandez, A., Chan-Bacab, M.J., De la Rosa-García, S.C., Arano-Recio, D., Montero-M, J., 2013. Orientation affects *Trentepohlia*-dominated biofilms on Mayan monuments of the Rio Bec style. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, 351-356.

Ou, H., Gao, N., Deng, Y., Wang, H., Zhang, H., 2011. Inactivation and degradation of *Microcystis aeruginosa* by UV-C irradiation. *Chemosphere* 85, 1192-1198.

Ou, H., Gao, N., Deng, Y., Qiao, J., Wang, H., 2012. Immediate and long-term impacts of UV-C irradiation on photosynthetic capacity, survival and microcystin-LR release risk of

Microcystis aeruginosa. Water Research 46, 1241-1250.

P

Peraza Zurita, Y., Cultrone, G., Sánchez Castillo, P., Sebastián, E., Bolívar, F.C., 2005. Microalgae associated with deteriorated stonework of the fountain of Bibatauín in Granada, Spain. *International Biodeterioration & Biodegradation* 55, 55-61.

Pessoa, M.F., 2012. Harmful effects of UV radiation in Algae and aquatic macrophytes - A review. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24, 510-526.

Petushkova, J.P., Lyalikova, N.N., Nichiporov, F.G., 1988. Effect of ionizing radiation on monument deteriorating microorganisms. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 125, 367-371.

Pongprasert, N., Sekozawa, Y., Sugaya, S., Gemma, H., 2011. A novel postharvest UV-C treatment to reduce chilling injury (membrane damage, browning and chlorophyll degradation) in banana peel. *Scientia Horticulturae* 130, 73-77.

Prasad, K.N., Chew, L.Y., Khoo, H.E., Yang, B., Azlan, A., Ismail, A., 2011. Carotenoids and antioxidant capacities from *Canarium odontophyllum* Miq. fruit. *Food Chemistry* 124, 1549-1555.

Prasad, S., Dwivedi, R., Zeeshan, M., Singh, R., 2004. UV-B and cadmium induced changes in pigments, photosynthetic electron transport activity, antioxidant levels and antioxidative enzyme activities of *Riccia* sp. *Acta Physiologiae Plantarum* 26, 423-430.

Prieto, B., Rivas, T., Silva, B., 2002. Rapid quantification of phototrophic microorganisms and their physiological state through their colour. *Biofouling* 18, 229-236.

Prieto, B., Sanmartín, P., Aira, N., Silva, B., 2010. Color of cyanobacteria: some methodological aspects. *Appl. Opt.* 49, 2022-2029.

Prieto, B., Silva, B., 2005. Estimation of the potential bioreceptivity of granitic rocks from their intrinsic properties. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56, 206-215.

Prieto, B., Silva, B., Lantes, O., 2004. Biofilm quantification on stone surfaces: comparison of various methods. *Science of The Total Environment* 333, 1-7.

R

Ragon, M., 2011. Diversité et processus de colonisation microbienne dans des biofilms sur des substrats minéraux, p. 212. Université de Paris-Sud 6.

Ravanat, J.-L., Douki, T., Cadet, J., 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63, 88-102.

Reed, S., Schnell, R., Moore, J.M., Dunn, C., 2012. Chlorophyll a + b Content and Chlorophyll Fluorescence in Avocado. *Journal of Agricultural Science*; Vol 4, No 4 (2012).

Reynolds, C.S., 1997. Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory. Oldendorf/Luhe, Germany: Ecology Institute.

Richmond, A., 2004. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science.

Rindi, F., Guiry, M.D., López-Bautista, J.M., 2008. Distribution, morphology, and phylogeny of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in urban environments in Europe. *Journal of Phycology* 44, 1529-1540.

Robert, C., Muel, B., Benoit, A., Dubertret, L., Sarasin, A., Stary, A., 1996. Cell Survival and Shuttle Vector Mutagenesis Induced by Ultraviolet A and Ultraviolet B Radiation in a Human Cell Line. *J Investig Dermatol* 106, 721-728.

Roldán, M., Hernández-Mariné, M., 2009. Exploring the secret of the three-dimensional architecture of phototrophic biofilms in caves. *International Journal of Speleology* 38, 41-53.

Russell, M.J., MacLean, V.L., 2008. Management issues in a Tasmanian tourist cave: Potential microclimatic impacts of cave modifications. *Journal of Environmental Management* 87, 474-483.

R Development Core Team, 2011. *R: a Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3- 900051-07-0. <http://www.R-project.org/>.

S

Saiz-Jimenez, C., Cuezva, S., Jurado, V., Fernandez-Cortes, A., Porca, E., Benavente, D., Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S., 2011. *Paleolithic Art in Peril: Policy and Science*

Collide at Altamira Cave. *Science* 334, 42-43.

Sánchez-Moral, S., Soler, V., Cañaveras, J.C., Sanz-Rubio, E., Van Grieken, R., Gysels, K., 1999. Inorganic deterioration affecting the Altamira Cave, N Spain: quantitative approach to wall-corrosion (solutional etching) processes induced by visitors. *Science of The Total Environment* 243/244, 67-84.

Sanmartín, P., Aira, N., Devesa-Rey, R., Silva, B., Prieto, B., 2010. Relationship between color and pigment production in two stone biofilm-forming cyanobacteria (*Nostoc* sp. PCC 9104 and *Nostoc* sp. PCC 9025). *Biofouling* 26, 499-509.

Sanmartín, P., Villa, F., Silva, B., Cappitelli, F., Prieto, B., 2011. Color measurements as a reliable method for estimating chlorophyll degradation to phaeopigments. *Biodegradation* 22, 763-771.

Šantic, D., Krstulovic, N., Šolic, M., Kuspilic, G., 2012. HNA and LNA bacteria in relation to the activity of heterotrophic bacteria. *Acta Adriatica* 53, 25-39.

Sarró, M.I., García, A.M., Rivalta, V.M., Moreno, D.A., Arroyo, I., 2006. Biodeterioration of the Lions Fountain at the Alhambra Palace, Granada (Spain). *Building and Environment* 41, 1811-1820.

Scheerer, S., Ortega Morales, O., Gaylarde, C., 2009. Chapter 5: Microbial Deterioration of Stone Monuments--An Updated Overview, In *Advances in Applied Microbiology*. eds A.I. Laskin, S. Sariaslani, G.M. Gadd, pp. 97-139. Academic Press.

Schmidt, É.C., Pereira, B., dos Santos, R.W., Gouveia, C., Costa, G.B., Faria, G.S.M., Scherner, F., Horta, P.A., Martins, R.d.P., Latini, A., Ramlov, F., Maraschin, M., Bouzon, Z.L., 2012. Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. *Aquatic Botany* 100, 8-17.

Selvakumar, P., Rajasekar, S., Periasamy, K., Raaman, N., 2008. Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus* (telomorph of *Antromycopsis macrocarpa*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 2125-2131.

Shirayama, H., Tohezo, Y., Taguchi, S., 2001. Photodegradation of chlorinated hydrocarbons in the presence and absence of dissolved oxygen in water. *Water Research* 35, 1941-1950.

Simon, K.S., 2012. Cave ecosystems, In *Encyclopedia of caves*. eds D.C. Culver, W.B. White, pp. 99-102. Academic Press in Elsevier.

Singaravelan, N., Grishkan, I., Beharav, A., Wakamatsu, K., Ito, S., Nevo, E., 2008.

Adaptive Melanin Response of the Soil Fungus *Aspergillus niger* to UV Radiation Stress at “Evolution Canyon”, Mount Carmel, Israel. PLoS ONE 3, e2993.

Singh, S.P., Kumari, S., Rastogi, R.P., Singh, K.L., Sinha, R.P., 2008. Mycosporines-like amino acids (MAAs): chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. Indian Journal of Experimental Biology 46, 7-17.

Sinha, R.P., Klisch, M., Walter Helbling, E., Häder, D.-P., 2001. Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 60, 129-135.

Stahl, W., Sies, H., 2003. Antioxidant activity of carotenoids. Molecular Aspects of Medicine 24, 345-351.

Stapleton, A.E., 1992. Ultraviolet radiation and plants: burning questions. Plant cell 4, 1353-1358.

Suryanarayanan, T.S., Ravishankar, J.P., Venkatesan, G., Murali, T.S., 2004. Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte. Mycological Research 108, 974-978.

T

Takahashi, A., Shibata, N., Nishikawa, S., Ohnishi, K., Ishioka, N., Ohnishi, T., 2006. UV-B light induces an adaptive response to UV-C exposure via photoreactivation activity in *Euglena gracilis*. Photochem. Photobiol. Sci 5, 467-471.

Tao, Y., Zhang, X., Au, D.W.T., Mao, X., Yuan, K., 2010. The effects of sub-lethal UV-C irradiation on growth and cell integrity of cyanobacteria and green algae. Chemosphere 78, 541-547.

Tao, Y., Mao, X., Hu, J., Mok, H., Wang, L., Au, D., Zhu, J., Zhang, X., 2013. Mechanisms of photosynthetic inactivation on growth suppression of *Microcystis aeruginosa* under UV-C stress. Chemosphere 93, 637-644.

Tian, J., Yu, J., 2009. Changes in ultrastructure and responses of antioxidant systems of algae (*Dunaliella salina*) during acclimation to enhanced ultraviolet-B radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 97, 152-160.

Tiano, P., Accolla, P., Tomaselli, L., 1995. Phototrophic biodeteriogens on lithoid

surfaces: An ecological study. *Microbial Ecology* 29, 299-309.

Tomaselli, L., Lamenti, G., Bosco, M., Tiano, P., 2000. Biodiversity of photosynthetic micro-organisms dwelling on stone monuments. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 251-258.

Tyagi, R., Saxena, S., Kaushik, B.D., 1995. Induction and Characterization of UV Resistant *Calothrix braunii*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 4, 127-129.

U

Upadhyaya, H., Khan, M.H., Panda, S.K., 2007. Hydrogen peroxide induces oxidative stress in detached leaves of *Oriza sativa* L. *Gen. Appl. Plant Physiology* 33, 83-95.

Urzi, C., Leo, F., Bruno, L., Albertano, P., 2010. Microbial Diversity in Paleolithic Caves: A Study Case on the Phototrophic Biofilms of the Cave of Bats (Zuheros, Spain). *Microbial Ecology* 60, 116-129.

V

Valero, A., Begum, M., Leong, S.L., Hocking, A.D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2007. Effect of germicidal UVC light on fungi isolated from grapes and raisins. *Letters in Applied Microbiology* 45, 238-243.

Van Der Molen, J.M., Garty, J., Aardema, B.W., Krumbein, W.E., 1980. Growth control of algae and cyanobacteria on historical monuments by a mobile UV unit (MUVU). *Studies in Conservation* 25, 71-77.

Vázquez-Nion, D., Sanmartín, P., Silva, B., Prieto, B., 2013. Reliability of color measurements for monitoring pigment content in a biofilm-forming cyanobacterium. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84, 220-226.

W

Warscheid, T., Braams, J., 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 343-368.

Watnick, P., Kolter, R., 2000. Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology* 182,

2675-2679.

Wiethaus, J., Busch, A.W.U., Dammeyer, T., Frankenberg-Dinkel, N., 2010. Phycobiliproteins in *Prochlorococcus marinus*: Biosynthesis of pigments and their assembly into proteins. *European Journal of Cell Biology* 89, 1005-1010.

Y

Yakovleva, I.M., Titlyanov, E.A., 2001. Effect of high visible and UV irradiance on subtidal *Chondrus crispus*: stress, photoinhibition and protective mechanisms. *Aquatic Botany* 71, 47-61.

Yin, R., Dai, T., Avci, P., Jorge, A.E.S., de Melo, W.C.M.A., Vecchio, D., Huang, Y.-Y., Gupta, A., Hamblin, M.R., 2013. Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. *Current Opinion in Pharmacology* 13, 731-762.

Z

Zimmermann, J., Gonzalez, J., Saiz-Jimenez, C., 2006. Epilithic biofilms in Saint Callixtus Catacombs (Rome) harbour a broad spectrum of Acidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 89, 203-208.

Zlatev, Z.S., Lidon, F.J.C., Kaimakanova, M., 2012. Plant physiological responses to UV-B radiation. *Emirates Journal of Food and Agriculture (EJFA)* 24.

Zvezdanović, J., Cvetić, T., Veljović-Jovanović, S., Marković, D., 2009. Chlorophyll bleaching by UV-irradiation in vitro and in situ: Absorption and fluorescence studies. *Radiation Physics and Chemistry* 78, 25-32.

VII. ANNEXES



PhytoTechnology Laboratories®
 Helping to Build a Better Tomorrow through Plant Science™

Product Information Sheet

B1411 BG-11 Medium Solution, 50x

Synonym: Blue-Green (BG) Medium

Properties

Form: Liquid
 Appearance: Light Yellow to Yellow
 Application: Cyanobacteria Media
 Solubility: Miscible with Water
 Typical Working Concentration: 20.00 mL/L
 Storage Temp: 2-6°C
 Storage Temp of Stock Solution: 2-6°C
 Biological Assay: Biologically tested with *Synechocystis* sp. PCC 6803.
 Solution pH is approx. 4.2 +/- 0.5
 Other Notes: It is suggested not to autoclave BG-11, 50x concentrate solution as precipitation may result.

Formula (mg/L)

Boric Acid	143	Manganese Chloride·4H ₂ O	90.5
Calcium Chloride Anhydrous	1359	Na ₂ ·Mg·EDTA	50
Citric Acid, Anhydrous	300	Potassium Phosphate dibasic	2000
Cobalt Nitrate·6H ₂ O	2.45	Sodium Carbonate Anhydrous	1000
Cupric Sulfate·5H ₂ O	3.95	Sodium Molybdate·2H ₂ O	19.5
Ferric Ammonium Citrate	300	Sodium Nitrate	75000
Magnesium Sulfate·7H ₂ O	3750	Zinc Sulfate*7H ₂ O	11.1

Application Notes

BG-11 is generally a freshwater growth medium for culturing cyanobacteria such as *Synechocystis* sp. PCC 6803.
 HEPES – H326 (Akira *et al.* 1996) or TES (Xu *et al.* 1994) can be added to buffer the pH. After adding the BG-11 concentrated solution, adjust to pH 8.0 with KOH or NaOH and autoclave.
 20 mM HEPES (H326) was used during biological testing of this product with *Synechocystis* sp. PCC 6803

References

Akira, K., K. Lee, H. Fukuzawa, K. Ohyama, and T. Ogawa. (1996) *cemA* homologue essential to CO₂ transport in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93:4006-4010.
 Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman, and R. Y. Stanier (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111:1-61.
 Stanier, R.Y., R. Kunisawa, M. Mandel, and G. Cohen-Bazire. (1971) "Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order *Chroococcales*)." *Bacteriological Reviews* 35(2):171-205.
 Xu, H., D. Vavilin, C. Funk, and W. Vermaas. "Multiple Deletions of Small-Cab-like Proteins in the

PhytoTechnology Laboratories®

P.O. Box 12205, Shawnee Mission, KS 66282-2205

Phone: 1-888-749-8682 or 1-913-341-5343; Fax: 1-888-449-8682 or 1-913-341-5442

Web Site: www.phytotechlab.com

© 2012 PhytoTechnology Laboratories®

Annexe 2 – Résultats des dosages des éléments chimiques (1)

Éléments chimiques	Al	As	Ca	Cd	Cr	Cu	Fe
Milieu de culture BG11 1x (µg l⁻¹)	< LQM	< LQM	11441	< LDM	< LDM	24,962	124,88
Milieu de culture BG11 0,01x (µg l⁻¹)	< LQM	< LQM	114,41	< LDM	< LDM	0,24962	1,2488
Eaux Moidons (µg l⁻¹)							
E1-1	< LQM	< LDM	95189	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
E1-2	< LQM	< LDM	78380	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
E1-3	< LQM	< LDM	98874	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
E2-1	21,74	< LDM	85717	< LDM	< LDM	5,6571	< LDM
E2-2	< LQM	< LDM	82606	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
E2-3	< LQM	< LDM	83569	< LDM	< LDM	< LQM	< LDM
E3-1	< LQM	< LDM	106200	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
E3-2	< LQM	< LDM	111270	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
E3-3	< LQM	< LDM	108830	< LDM	< LDM	< LQM	< LDM
E4-1	< LQM	< LDM	94633	< LDM	< LDM	< LQM	< LDM
E4-2	56,086	< LDM	98434	< LDM	< LDM	< LQM	23,003
E4-3	23,257	< LDM	93823	< LDM	< LDM	< LQM	< LDM
E5-1	< LQM	< LDM	89007	< LDM	< LDM	< LQM	< LDM
E5-2	< LQM	< LDM	78803	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
E5-3	< LQM	< LDM	87024	< LDM	< LDM	< LQM	< LDM
Sols Moidons (µg g⁻¹)							
S1-1	6407,76	8,43	269753,91	< LQM	11,56	4,42	12295,88
S1-2	6943,13	8,78	> LQM	0,21	12,12	4,47	12597,13
S1-3	6099,70	8,87	> LQM	0,19	11,07	4,90	10939,47
S2-1	28305,75	12,46	10316,19	0,79	48,53	10,26	30906,23
S2-2	20141,05	7,36	9942,43	0,46	29,30	7,78	20250,43
S2-3	30833,49	12,85	10204,42	0,78	46,22	10,72	31318,53
S3-1	11985,05	11,49	221597,75	0,38	23,81	7,26	18076,10
S3-2	11974,17	11,06	228549,23	0,40	20,61	7,54	18672,56
S3-3	9913,60	9,02	250640,76	0,41	16,75	7,36	13807,36
S4-1	7347,53	9,81	228918,17	0,18	13,31	4,45	13287,10
S4-2	7840,17	10,71	242430,79	0,17	14,30	4,89	14181,23
S4-3	8191,20	10,92	238009,96	0,22	14,90	4,63	14213,20
S5-1	7215,01	9,35	269502,87	0,31	13,70	7,05	12576,48
S5-2	6081,91	8,21	> LQM	0,23	10,61	5,70	9901,07
S5-3	6336,74	8,44	> LQM	0,29	11,36	6,25	10530,30

Annexe 2 – Résultats des dosages des éléments chimiques (2)

Éléments chimiques	Hg	K	Mg	Mn	Na	Ni	P
Milieu de culture BG11 1x (µg l ⁻¹)	< LDM	14886	8017,4	518,37	447780	< LDM	5966,9
Milieu de culture BG11 0,01x (µg l ⁻¹)	< LDM	148,86	80,174	5,1837	4477,8	< LDM	59,669
Eaux Moidons (µg l⁻¹)							
E1-1	< LDM	131,96	831,72	< LDM	771,83	< LDM	28,424
E1-2	< LDM	< LQM	859,95	< LQM	652,22	< LDM	22,563
E1-3	< LQM	< LQM	820,29	< LDM	629,35	< LDM	36,224
E2-1	< LDM	801,73	693,02	1,0579	2566,5	3,3483	33,439
E2-2	< LDM	< LQM	639,13	< LDM	563,14	< LDM	16,481
E2-3	< LDM	97,366	641,13	< LDM	680,85	< LDM	< LDM
E3-1	< LQM	96,342	1012,5	< LDM	517,93	< LDM	20,933
E3-2	< LDM	122,47	1041,4	< LDM	541,86	< LDM	26,684
E3-3	< LQM	111,59	1051,3	< LDM	544,15	< LDM	24,615
E4-1	< LDM	136,78	861,28	< LDM	561,44	< LDM	< LDM
E4-2	< LDM	143,77	875,97	< LQM	588,43	< LDM	< LDM
E4-3	< LQM	138,13	851,03	< LDM	550,77	< LDM	< LDM
E5-1	< LQM	< LQM	740,89	< LDM	492,72	< LDM	< LDM
E5-2	< LDM	< LQM	740,56	< LDM	540,11	< LDM	19,024
E5-3	< LDM	< LQM	723,39	< LDM	482,96	< LDM	< LDM
Sols Moidons (µg g⁻¹)							
S1-1	0,76	777,32	2757,73	284,39	114,81	11,19	388,72
S1-2	0,50	816,39	2890,80	280,27	119,11	11,71	423,80
S1-3	0,70	746,05	2537,88	249,60	96,94	10,29	408,19
S2-1	< LQM	1197,30	3681,05	792,78	62,72	28,95	1130,52
S2-2	< LDM	906,93	2483,69	476,91	46,23	19,72	722,69
S2-3	< LQM	1392,03	3806,91	692,76	67,16	30,05	1146,44
S3-1	0,51	1587,17	3219,96	372,11	134,52	17,30	1815,08
S3-2	0,59	1388,81	2959,22	374,72	121,79	16,66	1094,58
S3-3	0,72	1312,22	3007,96	327,40	123,51	14,31	1188,71
S4-1	0,53	1050,82	2865,66	287,86	121,26	12,43	319,21
S4-2	0,62	1065,78	2946,30	324,37	120,62	13,49	362,98
S4-3	0,59	1269,79	3098,80	333,23	125,97	14,21	420,58
S5-1	0,73	834,35	2925,53	327,09	113,48	12,40	816,09
S5-2	0,64	774,12	2471,29	225,83	96,05	9,49	896,58
S5-3	0,59	701,68	2518,94	273,36	99,33	10,36	966,00

Annexe 2 – Résultats des dosages des éléments chimiques (3)

Éléments chimiques	Pb	Sb	Se	Si	Sn	Sr	Ti	Zn
Milieu de culture BG11 1x (µg l⁻¹)	< LDM	< LDM	< LQM	34,293	< LDM	3,6298	< LQM	62,024
Milieu de culture BG11 0,01x (µg l⁻¹)	< LDM	< LDM	< LQM	0,34293	< LDM	0,036298	< LQM	0,62024
Eaux Moidons (µg l⁻¹)								
E1-1	< LQM	< LDM	< LDM	1254,8	< LDM	56,689	2,8559	< LQM
E1-2	< LQM	< LDM	< LDM	1449,7	< LDM	65,426	2,7596	< LDM
E1-3	< LDM	< LDM	< LDM	1284,7	< LDM	59,092	2,9322	< LDM
E2-1	< LDM	< LDM	< LDM	1231,3	< LDM	51,123	3,1662	14,128
E2-2	< LQM	< LDM	< LDM	1152,6	< LDM	45,853	2,8494	< LDM
E2-3	< LDM	< LDM	< LDM	1128,2	< LDM	46,352	2,632	5,7645
E3-1	< LQM	< LDM	< LDM	1113,1	< LDM	64,711	3,3631	< LDM
E3-2	< LDM	< LDM	< LDM	1182,9	< LDM	67,419	4,2711	< LDM
E3-3	< LQM	< LDM	< LDM	1133,1	< LDM	66,424	3,3656	< LDM
E4-1	< LQM	< LDM	< LDM	1154,7	< LDM	58,041	3,7967	81,97
E4-2	< LDM	< LDM	< LDM	1261	< LDM	60,664	4,7122	71,213
E4-3	< LQM	< LDM	< LDM	1159,1	< LDM	57,621	3,4386	84,422
E5-1	< LDM	< LDM	< LDM	1024,7	< LDM	50,545	3,0612	0,96141
E5-2	< LDM	< LDM	< LDM	1075	< LDM	52,882	2,733	< LDM
E5-3	< LDM	< LDM	< LDM	1039,4	< LDM	49,684	2,8615	< LQM
Sols Moidons (µg g⁻¹)								
S1-1	10,76	1,57	< LQM	281,39	< LDM	208,19	106,58	30,44
S1-2	11,15	1,90	< LQM	248,75	0,63	215,29	110,47	33,04
S1-3	9,94	1,68	< LQM	240,24	< LDM	180,53	96,01	33,64
S2-1	31,44	2,39	< LQM	282,65	1,24	15,51	192,78	79,85
S2-2	20,76	< LQM	< LQM	254,78	0,88	11,34	179,16	54,05
S2-3	32,35	2,09	1,58	293,55	1,12	16,71	227,80	83,17
S3-1	15,73	2,08	< LQM	246,43	< LQM	180,77	246,43	57,11
S3-2	16,25	1,81	< LQM	244,94	< LQM	168,77	120,30	55,49
S3-3	12,83	1,76	< LQM	275,09	< LDM	181,13	108,42	55,09
S4-1	11,62	< LQM	< LQM	264,18	< LDM	198,97	119,13	34,46
S4-2	12,60	1,88	< LQM	276,12	< LQM	207,33	130,22	37,69
S4-3	12,68	1,87	< LQM	270,71	< LQM	211,92	110,36	39,86
S5-1	11,85	1,73	< LQM	236,16	< LDM	201,66	96,39	46,26
S5-2	9,03	1,96	< LQM	245,25	< LDM	168,64	85,94	42,80
S5-3	10,45	1,58	< LQM	218,32	< LDM	170,99	81,38	43,41

Résumé

L'objectif général de cette thèse est d'étudier et d'analyser l'effet du rayonnement UV-C comme méthode alternative aux produits chimiques dans la lutte et le contrôle de la prolifération des micro-organismes photosynthétiques dans les grottes touristiques. Dans un premier temps, l'effet des UV-C a été analysé sur différentes souches cavernicoles de micro-algues cultivées au laboratoire. Des analyses à l'échelle moléculaire, cellulaire et à l'échelle du biofilm d'algues ont permis de mettre en évidence un ensemble de dommages causé par l'irradiation aux UV-C (diminution de la viabilité et de l'activité photosynthétique, dégradation des membranes, décoloration des cellules par destruction des pigments chlorophylliens, fragmentation de l'ADN, diminution de la surface d'occupation des biofilms d'algues cultivés sur support solide). Ceux-ci sont soit directs (réactions de photooxydation) soit indirects (liés à un stress oxydatif important). L'ensemble de ces résultats ont servi à la sélection de différentes durées d'exposition aux UV-C (traduites en doses d'UV-C) efficaces en termes d'éradication et de décoloration des micro-algues. Ces doses d'UV-C ont dans un deuxième temps été testées en conditions réelles sur le site d'étude de la grotte des Moidons (Jura, France). Une étude préalable à ces tests a été menée afin de comprendre les dynamiques et les facteurs favorisant l'installation et la prolifération des biofilms de micro-organismes photosynthétiques dans la grotte. L'étude des facteurs environnementaux mesurés à l'échelle du biofilm (quantité de lumière, type de support, localisation dans la grotte) ainsi que ceux mesurés à l'échelle de la cavité (circulation horizontale et verticale des eaux, vitesse des courants d'air, temps d'allumage des lampes et temps de présence des visiteurs) ont permis de distinguer des zones de colonisation préférentielle. Plusieurs biofilms ont ensuite été sélectionnés pour tester l'efficacité des UV-C. Selon les caractéristiques des biofilms (intensité de colonisation) et en fonction de leur emplacement dans la grotte (variations des facteurs préalablement déterminés), nous avons pu mettre en évidence une efficacité des UV-C variable dans le temps. Avec l'appui de résultats complémentaires obtenus sur deux souches de champignons et sur plusieurs types de matières picturales, l'ensemble des données collectées au cours de la thèse souligne l'intérêt et l'applicabilité des traitements aux UV-C dans divers contextes de conservation des matériaux du patrimoine.

Mot-clés : matériaux du patrimoine ; grottes touristiques ; conservation ; micro-algues vertes ; champignons ; biofilms ; éradication ; méthode alternative ; rayonnement UV-C ; applications.

Abstract

The aim of this thesis is to study and analyze the effect of UV-C radiation as an alternative method to chemicals to combat phototrophic microorganisms' proliferation in show caves. First, the effect of UV-C was analyzed on several cave-dwelling unicellular green algae sub-cultured in laboratory conditions. Analysis at the molecular, cellular and biofilm scale highlighted several damages (decrease of viability and photosynthetic activity, membrane degradation, chlorophyll bleaching, DNA fragmentation, decrease of the biofilms' colonized area...) both direct (photooxydation reaction) or indirect (oxidative stress). These results helped to select efficient UV-C exposure times (traded in UV-C doses) both to eradicate and bleach green micro-algae. Second, these efficient UV-C doses were used to test the efficiency of UV-C treatments on natural phototrophic biofilms proliferating in the Moidons Cave (Jura, France). Previous study to the UV-C tests was performed to understand the dynamics and factors that promote algal proliferation in this cave. Factors measured at the biofilm scale (quantity of light, type of the physical support, localization in the cave...) and at the cavity scale (horizontal and vertical circulation of waters, air currents, illumination time and visitors' presence time) allowed to distinguish several preferential areas where growth-supporting conditions were present for algal proliferation. Then, several biofilms were selected to test the efficiency of UV-C treatments. According to the characteristics of the biofilms (colonization intensity) and their localization in the cave (variations of the factors promoting colonization) UV-C efficiency varied over time. Supplementary results obtained on filamentous fungi and mineral pigments used for prehistoric paintings, emphasize the interest and the applicability of the UV-C treatments in various contextual approaches for the conservation of cultural heritage materials.

Keywords: heritage materials; show caves; conservation; green algae; fungi; biofilms; eradication; alternative method; UV-C radiation; applications.