

Biodiversité des écosystèmes karstiques suisses: état des connaissances et tests préliminaires

Décembre 2025



Biodiversité des écosystèmes
karstiques suisses :
état des connaissances
et tests préliminaires

.....

Impressum

- Titre**
Biodiversité des écosystèmes karstiques suisses : état des connaissances et tests préliminaires
- Auteurs**
Michel Valentin, Alther Roman, Blandenier Quentin, Lentendu Guillaume, Nzoko Armand, Blant Denis, Jeannin Pierre-Yves, Mitchell Edward, Luetscher Marc
- Contributions**
Miguel Borreguero, Melvin Chavanne, Yannick Chittaro, Sabrina Joye, Christian Lüthi, Valentin Moser, †Pierre Strinati
- Photo de couverture**
Diplura observé à la Grotte de Milandre, photo M. Luetscher
- Mandant**
Office Fédéral de l'Environnement (OFEV), Division Biodiversité et paysages, 3003 Berne
- Mots-clés**
Grotte, biodiversité, faune cavernicole, *barcoding*, *metabarcoding*
- Mise en page**
ISSKA
- Référence bibliographique**
ISSKA (2025) – Biodiversité des écosystèmes karstiques suisses : Etat des connaissances et tests préliminaires. Institut Suisse de Spéléologie et de Karstologie, rapport non publié – Mandant : Office fédéral de l'environnement, 42p.

Table des matières

Résumé	5
1. Introduction	6
2. Inventaire des espèces cavernicoles suisses	13
3. Collections muséales	28
4. Barcoding	29
5. Metabarcoding	37
6. Conclusions générales	46
7. Remerciements	47
8. Bibliographie	48
Annexes	53

Résumé

Le milieu karstique suisse couvre près de 20% du territoire et comprend plus de 11000 cavités connues, totalisant plusieurs centaines de kilomètres de galeries. Les observations biospéléologiques au cours du dernier siècle ont identifié **191 espèces cavernicoles dont 44 sont considérées comme endémiques** à la Suisse, voire à un réseau spéléologique. Le manque d'études dédiées à la biocénose souterraine implique cependant que les espèces cavernicoles demeurent notoirement absentes des listes rouges nationales: sur les 44 espèces cavernicoles endémiques à la Suisse, seules 4 espèces sont incluses dans la liste des espèces prioritaires. Malgré un statut digne de protection selon l'article 18 de la LPN **aucune mesure de conservation de cette biodiversité n'est en place** alors même qu'une vulnérabilité aux pollutions, aménagements du territoire et changements climatiques est reconnue.

Cette étude identifie un réel besoin pour une meilleure connaissance des habitats souterrains qui va de pair avec un inventaire détaillé de la faune associée. Une approche basée sur l'identification d'ADN environnemental ouvre des perspectives nouvelles pour inventorier la faune souterraine, pour autant que l'on ait accès à une base de données des espèces cavernicoles. Nous avons donc sélectionné un total de 96 spécimens provenant de grottes karstiques du Jura Suisse pour des analyses de *barcoding* moléculaire. Sur les 66 séquences exploitables, 22 séquences étaient déjà présentes dans les bases de données et des identifications à l'espèce ont pu être confirmées ou déterminées par ce biais. Cependant, pour les 44 autres séquences, la similarité était en deçà

du seuil correspondant au niveau de l'espèce (<96%); parfois même le genre ou la famille n'ont pu être associé correctement. A relever que dans six cas au moins, nous avons obtenu les premières séquences d'espèces jusqu'alors uniquement décrite morphologiquement.

L'analyse d'échantillons d'eau de la grotte de Milandre (JU) et celle du Chemin de Fer (NE) révèle qu'une approche purement moléculaire (*metabarcoding*) a toute sa place dans l'outillage pour l'étude de la biodiversité des grottes, moyennant quelques adaptations méthodologiques. Cette approche n'est cependant utile que si une base de données de référence est disponible. Un travail taxonomique combinant les approches morphologiques et moléculaires est donc nécessaire pour établir des données de base solides sur la diversité de la faune des grottes.

Cet état des connaissances biospéléologiques suisses identifie trois axes prioritaires pour les études à venir:

- Déterminer le niveau de priorité pour les espèces dont l'endémisme et/ou le risque d'extinction a été évalué, mais qui ne figurent pas dans la liste des espèces prioritaires.
- Etablir de manière rigoureuse le niveau d'endémisme des espèces considérées comme telles par Bernasconi mais ne figurant pas encore dans la liste officielle; séquençage et identification par *barcoding*.
- Apporter une base scientifique pour identifier les biotopes cavernicoles d'importance nationale.

1. Introduction

Le milieu karstique souterrain, c'est-à-dire le milieu calcaire creusé par l'action de l'eau, abrite une biodiversité plus riche que ce que l'on pourrait soupçonner. Si l'on considère souvent la chauve-souris comme animal typique des grottes, elle n'est, en réalité, pas la «véritable» habitante des milieux souterrains, et certainement pas la seule. En effet ces cavités abritent une richesse beaucoup plus importante incluant de nombreux petits organismes, souvent difficilement observables. L'étude, et plus généralement la protection de cette faune souterraine porte le nom de biospéléologie. Dans les pays voisins, plusieurs centaines d'espèces sont recensées dans les cavités: en Allemagne on estime qu'il existe 748 «véritables» cavernicoles (Zaenker et al., 2020); en Italie ce chiffre monte à 785 (Folegana, 2018); en France, la liste est tellement longue que seule une grossière estimation des espèces fréquentant les grottes est possible, de l'ordre de 2500 à 3000 en comptant les visiteurs occasionnels (données non publiées*).

La faune spéléologique est tellement variée que des laboratoires de recherche lui sont entièrement dédiés, avec comme exemple notable, le laboratoire de biologie souterraine de l'université de Ljubljana (*The Subterranean Biology Lab***).

Dans le but d'inclure les grottes dans le réseau européen des milieux protégés Natura 2000, une méthode allemande classe les cavités selon les structures qui les composent, les espèces qui s'y trouvent, et le niveau de perturbation humaine (Zaenker, 2016). Par ailleurs, plusieurs ouvrages

récents décrivent l'écosystème souterrain et les méthodes pour inventorier les espèces cavernicoles (Zaenker et al., 2020), (Dethier and Rochez, 2022), (Lana and Balestra, 2024) et témoignent de l'investissement consacré pour améliorer les connaissances de ce milieu fragile et le protéger.

A ce jour, les connaissances de la biodiversité souterraine suisse demeurent cependant lacunaires. Si elle fut relativement pionnière dans le domaine de la biospéologie jusque dans les années 1970, la recherche suisse s'est fortement ralentie au début des années 1980 au contraire des autres pays occidentaux. Nous manquons à la fois de connaissances sur la biologie souterraine et d'expérience avec les nouvelles méthodes d'identification ADN. Néanmoins, l'expérience acquise par les autres pays pourra facilement être appliquée à la Suisse, pour peu que la recherche se développe et que des spécialistes soient formés.

Le milieu karstique, épigé ou souterrain, reste totalement ignoré de la protection de la biodiversité, alors même qu'il couvre 20% du territoire national (Malard et al., 2016). Le milieu souterrain abrite près de 40 espèces endémiques suisses, bien qu'elles ne figurent pas dans la liste officielle (Tschudin et al., 2017).

Ce rapport fait un état des connaissances existantes sur le milieu souterrain suisse et sa biodiversité et explore l'application de méthodes génétiques pour l'identification d'espèces. Les

* <https://geb.ffspeleo.fr/>
** <https://www.subbio.net/>

travaux effectués incluent une mise à jour de la bibliographie sur la faune souterraine suisse, un inventaire du matériel disponible dans les musées, du *barcoding* ADN d'une sélection d'espèces des grottes suisses, de test méthodologique au moyen de *metabarcoding* d'ADN environnemental (eDNA) sur de l'eau de sources karstiques.

1.1. Aperçu historique de la biospéléologie suisse

On situe la naissance de la biospéléologie en 1831 à l'occasion de l'observation d'un coléoptère cavernicole dans les grottes de Postojna en Slovénie (Bernasconi, 1967). En Suisse, trente ans plus tard, d'autres coléoptères sont observés et capturés dans deux grottes valaisannes (Strinati, 1966). Depuis, cette discipline a connu une évolution régulière jusque dans les années 1980, avec un travail d'inventaire important mené principalement par trois biospéologues helvétiques:

Dr. Villy Aellen (1926-2000).

Zoologiste originaire de Neuchâtel, il a été respectivement conservateur et directeur du Muséum d'histoire naturelle de Genève. Il a participé à de nombreuses études biospéologiques, notamment en partenariat avec Pierre Strinati.

Dr. Pierre Strinati (1928).

Issu d'une famille de négociants en textile à Genève, il finit par abandonner l'entreprise

familiale pour se consacrer à la science et plus particulièrement à la biospéléologie. En 1966, il y consacrera sa thèse de doctorat faisant, aujourd'hui encore, référence (Strinati, 1966).

Reno Bernasconi (1933-2010).

Pharmacien d'origine tessinoise, spéléologue aguerri, il a mis ses connaissances au service de la biospéléologie. Il aura notamment produit, synthétisé, et regroupé énormément de littérature sur le sujet.

Au début des années 1960, Aellen et Strinati ont fait un important travail de collection (Aellen and Strinati, 1962), synthétisé par Strinati pour sa thèse de doctorat. Dans les années et décennies qui suivirent, plusieurs nouvelles espèces ont été décrites, y compris dans la zone phréatique. La découverte emblématique du copépode *Gelyella monardi* (Moeschler and Rouch, 1988) en est un exemple. L'article «Un nouveau regard sur la faune des eaux souterraines karstiques du Jura suisse» (Moeschler, 1985) marque le basculement entre deux visions: celle qui dépeignait des eaux souterraines suisses pauvres à celle d'un milieu riche en biodiversité. C'est sur cette base, entre autres, que la notion de biocénose fut introduite dans la loi sur l'eau souterraine.

Les travaux de Bernasconi permirent de présenter une première synthèse de la faune souterraine suisse dans l'*Encyclopaedia Biospeologica* en 1994, une encyclopédie regroupant les connaissances biospéologiques à l'échelle mondiale (Bernasconi, 1994). Un article de ce même auteur, publié à titre posthume en 2010

actualise les connaissances par rapport à 1994 (Bernasconi, 2010).

Les différents tomes de l'Inventaires spéléologique de la Suisse (Tome 1: Canton de Neuchâtel (Gigon, 1976), Tome 2: Canton du Jura (Gigon and Wenger, 1986), Tome 3: Höhlen der Region Basel-Laufen (Bitterli, 1996), Tome 4: Jura vaudois, partie ouest (Audétat et al., 2002), Tome 5: Nord vaudois (Deriaz et al., 2007), Tome 6: Jura Bernois (Maire et al., 2022)) donnent un bon aperçu de la faune souterraine régionale. Malgré la faible intensité des investigations biospéléologiques en Suisse au cours des quinze dernières années, plusieurs nouvelles espèces, parfois endémiques, ont été découvertes, provenant autant des écosystèmes souterrains aquatiques (Altermatt and et al., 2014; Fišer et al., 2018, 2017) que terrestres (Mahnert, 2011; Sluys, Ronald, 2012).

1.2. Les biotopes souterrains

Un biotope désigne un milieu de vie caractérisé par des conditions physiques et chimiques relativement uniformes. Les grottes suisses offrent des conditions environnementales variées et abritent donc différents biotopes. En effet, les grottes se trouvent à différentes altitudes, se distinguent par leurs morphologies et bénéficient de flux d'intrants contrastés.

L'un des aspects les plus important des grottes est la présence d'eau liquide. En effet la majeure partie des grottes suisses ont été creusées par l'action de celle-ci. Elle est parfois présente sous forme d'écoulement libre, d'un petit ruis-

seau temporaire à une véritable rivière souterraine. Elle peut aussi former des étendues plus calmes, allant de la petite flaque au véritable lac souterrain, voire noyer totalement une galerie. Parfois, elle ne se manifeste que sous la forme d'un goutte-à-goutte discret. L'eau est une constante dans les grottes suisses, à de rares exceptions près.

En Suisse, les températures moyennes se situent entre 11°C et -7°C degrés selon si l'on se trouve dans un karst de basse ou haute altitude ou dans une cavité soumise à un régime de ventilation particulier. La variabilité de la température au sein d'une grotte dépend largement de sa distance à l'entrée (Sedaghatkish et al., 2024). Les zones proches des entrées sont en contact avec l'atmosphère extérieure et donc directement soumises aux variations thermiques de celle-ci. Au contraire, les zones situées en profondeur, loin de toute influence du milieu extérieur, gardent une température constante tout au long de l'année. Le taux d'humidité se situe, quant à lui, toujours proche des 100% et dépend fortement du régime de ventilation au sein de la cavité (Gunn, 2004).

Les gaz qui composent l'atmosphère des grottes sont les même que ceux qui composent celle à l'extérieur. Les concentrations cependant peuvent sensiblement changer. L'une des raisons est l'eau qui s'enrichit en dioxyde de carbone (CO2) au contact du sol et qui, en arrivant dans une grotte, dégazera suite au changement de pression. Du CO2 peut également être produit lors de la décomposition de matière organique (Lismonde, 2002). En moyenne le

taux de CO2 en grottes se situe entre 0.04% et 0.5%. Dans les cas extrêmes les concentrations peuvent monter à 4%, conditions alors toxiques pour l'être humain. L'oxygène varie lui entre 19% et 21% et peut exceptionnellement descendre jusqu'à 14%.

Les conditions peuvent donc varier à la fois entre différentes grottes, mais aussi au sein d'un même réseau. La géomorphologie, les conditions chimiques, le type de sol et de sédiments, l'apport de nutriments de l'extérieur, les conditions hydrologiques, la ventilation sont autant de facteurs, auxquelles les organismes vivants dans les grottes ont dû s'adapter.

Parmi les biotopes définis par ces différentes variables, on peut citer les plus communément observés et décrits:

- 1. **La zone d'entrée d'une grotte**, zones de transition entre le monde extérieur et le monde souterrain, se caractérise par la présence de lumière contrôlant le cycle circadien. Le plus souvent, on y trouvera les visiteurs accidentels ou occasionnels, arrivés par hasard dans la grotte. Les entrées sont aussi propices aux mousses et lichens car ils y trouvent les conditions idéales: une humidité importante, des températures peu variables, et moins de compétitions avec les plantes vasculaires, leur permettent de coloniser les parois malgré un ensoleillement plus faible.
- 2. **Le fond des gouffres et des galeries** en pente proches des entrées favorise l'accumulation de matière organique telle que des feuilles

ou des branches, de la terre ou des animaux morts. Cette matière sert de source de nourriture pour un bon nombre d'organismes. Une faune endogée, c'est-à-dire celle qui vit dans le sol, sous les cailloux ou dans les fissures est typique de cette partie des grottes. Cette faune n'est pas exclusive aux grottes et peut aussi se retrouver dans le milieu extérieur.

- 3. **Un peu plus profondément**, la lumière s'estompera pour laisser la place à l'obscurité. Dans cette zone, on ne trouvera plus de végétaux développés, et les parois seront alors parcourues par des invertébrés, parfois en grand nombre. On appelle cette mosaïque d'espèce l'association pariétale. Certaines vivent là à l'année, d'autres viennent seulement ponctuellement, pour s'y réfugier ou se reproduire par exemple. Au cœur des grottes, on arrive dans les zones stables. Ce milieu est habité par les espèces les plus typiques du milieu souterrain.
- 4. **La faune aquatique** souterraine est distribuée plus ou moins de la même façon que la faune terrestre en fonction de la distance à l'entrée. Néanmoins il est parfois plus compliqué de définir les limites entre un milieu aquatique et le suivant, car l'eau forme souvent un continuum et facilite les déplacements. Des espèces des milieux aquatiques extérieurs peuvent aussi se retrouver piégés dans une grotte suite à une crue par exemple, ou au contraire, des individus venant des grottes peuvent se retrouver expulsées à l'extérieur. C'est pourquoi il est parfois moins aisé de

caractériser les espèces aquatiques souterraines.

1.3. La faune cavernicole

En biospéléologie, historiquement, la faune cavernicole est séparée en trois catégories selon leur degré d'affinité avec le milieu souterrain. En effet, toutes les espèces fréquentant les grottes n'en dépendent pas de la même façon pour leur survie. Certaines se retrouvent là par hasard, d'autres utilisent les grottes comme abri occasionnel ou comme site d'hibernation. Les plus inféodées aux grottes passent leur vie complète dans celles-ci. Des catégories intermédiaires permettant une classification plus précise existent et sont déjà utilisées dans d'autres pays (Sket, 2008), mais elles n'ont pas encore permis d'actualiser la classification des espèces suisses, à l'exception de celles figurant dans les inventaires plus récents d'autres pays. Ce rapport se contentera donc de la classification en trois catégories définies comme suit :

La faune trogloxène

Les trogloxènes sont les visiteurs occasionnels, accidentels ou non permanents des grottes, qui ne peuvent pas réaliser leur cycle complet de vie à l'intérieur de celle-ci. Ils sont obligés de sortir pour chercher de la nourriture ou se reproduire par exemple. Les chauves-souris qui utilisent les grottes pour hiberner en sont un bon exemple.

La faune troglophile

Les troglophiles sont les espèces capables de passer leur vie complète dans les grottes. Néanmoins elles s'adaptent aussi au milieu extérieur si elles trouvent des conditions similaires (dans des cavités d'arbres par exemple). Les espèces vivant dans le sol, entre autres, bénéficient d'habitats comparables aux grottes. Certaines araignées, par exemple, sont capables de passer leur vie complète dans les grottes mais peuvent en sortir pour coloniser d'autres habitats. La faune troglophile ne présente pas ou peu d'adaptations spécifiques au milieu souterrain.

La faune troglobie

Les espèces troglobies sont inféodées au milieu souterrain et aux grottes. Elles sont souvent considérées comme les «vrais» cavernicoles. Elles présentent des adaptations spécifiques au milieu souterrain autant morphologiques que physiologiques. On considère que ces espèces ne sont pas capables de survivre ailleurs que dans les grottes. De ce fait, le taux d'endémisme chez les espèces troglobies est important, car leur aire de répartition peut se limiter à une grotte ou un réseau de grottes.

La même classification est utilisée pour les espèces aquatiques, on parlera alors de stygoxènes, stygophiles et stygobies. Il est important de noter que les séparations entre ces différentes catégories ne sont pas clairement définies et différentes définitions ont été utilisées par le passé

(Sket, 2008). Le manque de connaissances peut facilement résulter en une mauvaise classification. Les nouveaux systèmes avec plus de catégories ainsi que des études plus approfondies permettront à l'avenir un classement plus précis. Pour ce rapport, il a été décidé de se concentrer en priorité sur les espèces pouvant effectuer leur vie complète dans les grottes, c'est-à-dire les troglophiles/stygophiles et troglobies/stygobies. Lorsque le terme cavernicole sera employé par la suite il sous-entendra ces deux catégories.

1.4. Adaptations au milieu souterrain

Les espèces vivant dans les entrailles de la terre depuis suffisamment longtemps se sont adaptées à ces conditions particulières. Un des critères pour classer une espèce comme troglobie repose d'ailleurs sur ces adaptations (Sket, 2008). Lorsque que l'on passe sa vie dans l'obscurité, certains organes perdent leur fonctionnalité. C'est le cas, par exemple, des yeux, qui vont s'atrophier au fil de l'évolution cavernicole et même parfois complètement disparaître. Une autre adaptation classique est la dépigmentation de la peau, donnant un aspect caractéristique blanc ou translucide à ces espèces. Au-delà de ces différences facilement observables, de profondes divergences métaboliques, parfois impressionnantes, sont également présentes. On peut facilement supposer que le milieu souterrain, de par son calme relatif, comporte moins de stimuli auxquels réagir. Par exemple, les déplacements du *Niphargus* sont peu nombreux

et non soumis au cycle circadien (jour/nuit) et leur consommation en oxygène, qui reflète l'activité métabolique, est réduite. Le tableau 1, repris de Biospéologie - Initiation à l'étude de la faune cavernicole de Belgique (Dethier and Rochez, 2022) synthétise les différences décrites par Ginet et Decou en 1977 (Ginet and Decou, 1977) entre un *Gammarus* et un *Niphargus*, deux genres d'amphipodes. Le *Gammarus* fréquente les eaux de surface alors que le *Niphargus* est inféodé aux grottes.

Quand il s'agit de reproduction, la stratégie du nombre est remplacée par la stratégie de la qualité : moins d'œufs sont pondus, moins fréquemment, mais ils sont plus gros et prennent plus de temps pour se développer. Cela les rend vulnérables aux dégradations ou aux prélèvements trop fréquents car la population mettra beaucoup plus de temps à se rétablir. La plus frappante des différences reste, cependant, l'extraordinaire longévité des *Niphargus* comparée aux gammarus. En effet, un *Niphargus* vit, en moyenne, dix fois plus longtemps !

.....

Tableau 1 Principales différences entre les genres *Gammarus* et *Niphargus*.

Caractéristiques	Gammarus	Niphargus
Pigmentation	Jaune orange	Blanc
Yeux	Composés, pigmentés	Absents
Nombre de déplacements (par période de 3 h)	150 la nuit, 80-90 le jour	Entre 10 et 20, jour et nuit
Consommation d'O ₂ (mm ³ /h)	0.05 mm ³ à 10°C, 0.4 à 30°C	0.01 mm ³ à 10°C, 0.05 à 30°C
Développement embryonnaire	2 à 3 semaines	3 mois
Vie marsupiale (développement dans une poche de la femelle)	1 à 2 jours	1 mois
Étape juvénile	2 à 3 mois	30 mois
Ponte	1 fois par mois (en été) nombreux petits œufs	1 fois (ou moins) par an 1 seul (ou quelques) gros œuf(s)
Mues	1 toutes les 1 à 3 semaines	5-6 (chez les jeunes), 1 ou 2 (chez les adultes) par an
Longévité moyenne	1 à 2 ans	Parfois plus de 10 ans
Mues	1 toutes les 1 à 3 semaines	5-6 (chez les jeunes), 1 ou 2 (chez les adultes) par an
Longévité moyenne	1 à 2 ans	Parfois plus de 10 ans
Longévité moyenne	1 à 2 ans	Parfois plus de 10 ans

.....

.....

2. Inventaire des espèces cavernicoles suisses

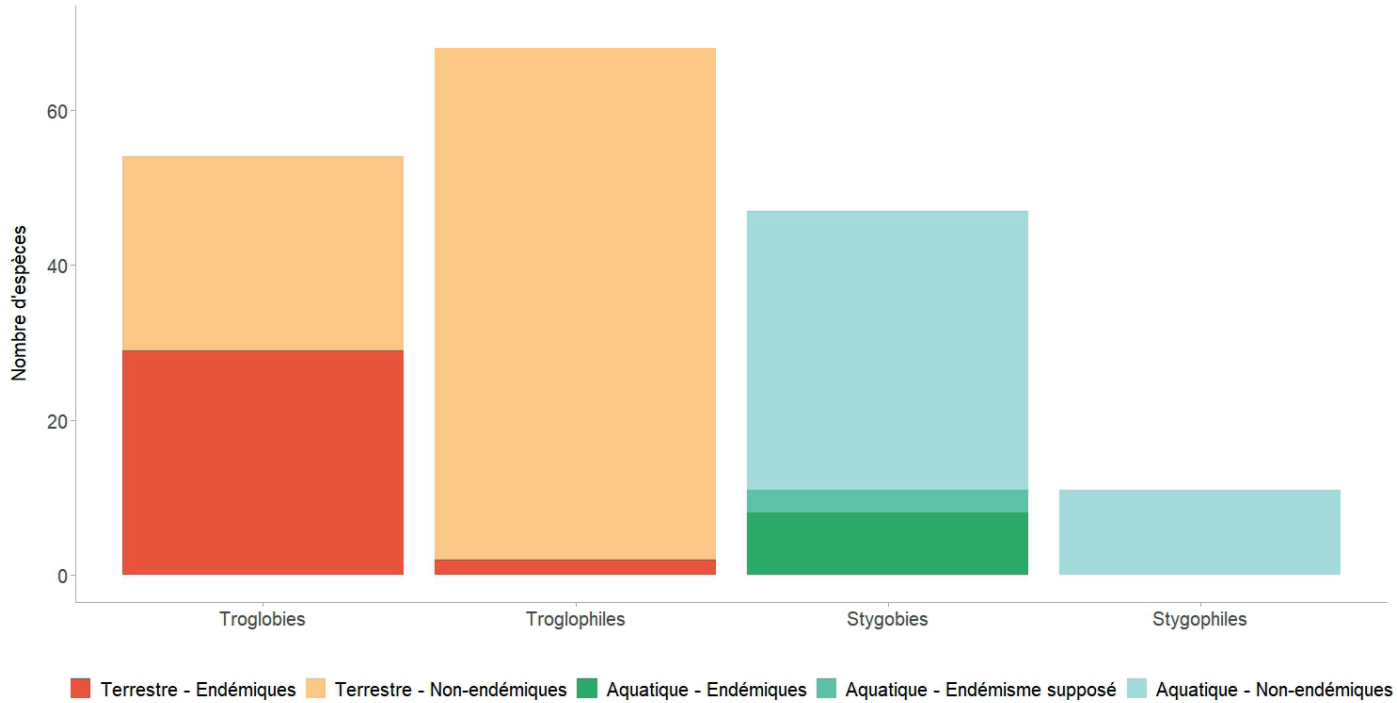
L'inventaire suisse des espèces cavernicoles a été publié dans sa version la plus récente par R. Bernasconi (2010) et a fait l'objet de plusieurs mises à jour informelles depuis lors. Cet inventaire distingue les espèces cavernicoles terrestres des espèces aquatiques, détermine leur degré d'affinité au milieu souterrain (troglaphiles/stygophiles vs troglobies/stygobies), et identifie si ces espèces sont endémiques à la Suisse ou non.

Cette liste comporte actuellement 191 espèces dont 131 terrestres et 60 aquatiques (Annexes 1 et 2).

Parmi les espèces terrestres, 54 sont troglobies, 68 sont troglaphiles, et 9 ont un statut encore incertain. L'endémisme, évalué selon Bernasconi, atteint une proportion de 54% (29/54) chez les troglobies, alors qu'il tombe à 3% (2/68) chez les troglaphiles (Figure 1).

Figure 1 Endémisme chez les espèces cavernicoles Suisse.

Les données sont issues de l'inventaire mis à jour de Bernasconi (2010). Les espèces terrestres et aquatiques sont séparées selon leur affinité au milieu souterrain (troglaphile, troglobie, stygophile, stygobie). Les espèces dont l'affinité n'est pas définie n'ont pas été prises en compte. Pour chaque catégorie, le nombre d'espèces endémiques, supposément endémiques ou non endémiques est indiqué par la couleur.



.....

.....

Le taux d'endémisme est beaucoup plus élevé chez les troglobies que chez les troglophiles. Cela n'est pas surprenant, car ces espèces étant complètement dépendantes des grottes et supposées incapables de survivre à l'extérieur ont une zone de répartition qui peut se limiter à une grotte ou un réseau de grottes. Cela en fait aussi des espèces particulièrement sensibles aux perturbations.

Parmi les espèces aquatiques, on identifie en Suisse plus d'espèces stygobies (47) que stygophiles (11), et les statuts de 2 espèces sont encore indéterminés. De plus, les espèces endémiques ne représentent que 17% des espèces stygobies (8/47). A noter que trois espèces récemment décrites sont supposées endémiques, mais plus de données sont nécessaires pour confirmer ce statut. Le fait qu'il y ait plus de stygobies que de troglobies mais moins d'endémisme chez les espèces aquatiques est probablement dû au fait que les cavités sont souvent parcourues par des réseaux hydriques, plus favorables aux déplacements des individus et donc plus propices à une aire de répartition étendue, même pour des espèces cavernicoles. La liste complète des espèces endémiques selon Bernasconi est donnée par les tableaux 2 et 3.

2.1. Menaces

Même si elles semblent coupées du monde extérieur, les grottes sont intimement liées à ce qu'il se passe en surface. Elles sont, d'une part, l'extrémité inférieure des écosystèmes de surface et d'autre part, la source des écosystèmes aqua-

tiques situés en aval. L'eau qui arrive dans une grotte provient de l'écoulement issu de l'eau météorique et peut avoir une influence non négligeable sur les conditions environnementales de la grotte. Elle peut, par exemple, être enrichie de produits phytosanitaires (pesticides) ou en engrais si elle est passée par un champ agricole. D'autres types de pollution de l'eau peuvent aussi arriver tels que des pollutions aux hydrocarbures si les eaux d'écoulement d'une route ne sont pas correctement traitées. En milieu urbain, des pollutions d'origine industrielle sont également fréquentes (Reinhard et al., 2019). Finalement, nombre de dolines et gouffres sont ou ont été utilisées comme décharge à ciel ouvert. Les contaminations associées peuvent avoir un effet catastrophique sur les populations cavernicoles, soit direct en tuant les individus, soit indirect en modifiant les conditions physico-chimiques de l'eau (Graening and Brown, 2003; Wood et al., 2008). Il est par ailleurs important de noter que les populations humaines qui utilisent l'eau en aval sont aussi concernées par ces pollutions.

Le changement climatique et les événements météorologiques extrêmes qui en découlent ont aussi un impact sur l'écologie des grottes. Par exemple, les périodes de sécheresse peuvent interrompre l'approvisionnement des étendues d'eau souterraines, qui peuvent finir par tarir (Blant, 2024). Bien qu'il ait été montré que certains organismes cavernicoles sont bien adaptés aux phénomènes de dessiccation (Gilbert et al., 2018), il reste à prouver qu'il s'agit là d'une généralité. A l'inverse, l'augmentation du niveau d'eau lié à des périodes de pluie intenses

.....

.....

Tableau 2 Liste des espèces troglaphiles et troglobies endémiques.
Lorsque le nom de l'auteur est entre parenthèse, cela signifie que la nomenclature du genre a changé depuis la description originale de l'espèce.

Espèces	Auteurs	Distribution
ACARI		
Charadracarus aelleni	(Cooreman, 1954)	Jura
Eugamasus kobyi	Schweizer, 1861	Jura
Johnstoniana helvetica	Cooreman, 1959	Jura
Thoribdella brevicornis	Cooreman, 1959	Alpes orientales
Thoribdella subterranea	Cooreman, 1959	Jura
PSEUDOSCORPIONES		
Neobisium aelleni	Vachon, 1976	Jura
Neobisium helveticum	Heurtault, 1971	Valais
Pseudoblothrus infernus	Mahnert, 2011	Alpes orientales
Pseudoblothrus strinatii	Vachon, 1954	Jura
Pseudoblothrus thiebaudi	Vachon, 1969	Alpes occidentales
SYMPHYLA		
Symphylella major	Scheller, 1961	Jura, Alpes occidentales
DIPLOPODA		
Atractosoma gibberosum	Verhoeff, 1900	Ticino
Broelemanneuma gayi	Demange, 1968	Valais
Niphatrogleuma wildbergeri	Mauries, 1986	Alpes occidentales
Propolydesmus helveticus	(Verhoeff, 1894)	Jura, Alpes
Soleurus rothi	(Manfredi, 1957)	Jura
ISOPODA		
Androniscus subterraneus	(Carl, 1906)	Ticino
Calconiscellus gibbosus	(Carl, 1908)	Ticino
Leucocyphoniscus verruciger	Verhoeff, 1900	Ticino
COLLEMBOLA		
Argonychiurus papulosus	(Gisin, 1964)	Graubünden
Bonetogastrura subterranea	(Carl, 1906)	Ticino
Cribrochirus cribrus	(Gisin, 1957)	Alpes occidentales

.....

.....

Espèces	Auteurs	Distribution
Cribrochiusus subcribrosus	(Gisin, 1957)	Alpes orientales
Deuteraphorura antheuili aelleni	(Gisin, 1960)	Jura
Deuteraphorura gigoni	(Gisin, 1962)	Jura
Deuteraphorura handschini strinatii	(Gisin, 1963)	Ticino
Deuteraphorura inferni	(Gisin, 1957)	Eastern Alps
Gnathofolsomia contrapunctata	(Kseneman, 1950)	Western Alps
Pseudosinella infernalis	Gisin, 1964	Eastern Alps, Graub.
Pseudosinella vandeli praealpina	Gisin, 1964	Alpes
COLEOPTERA		
Trichaphaenops jurassicus	Sermet, 1960	Jura
Trichaphaenops sollaudi helveticus	Jeannel, 1950	Jura
Trichaphaenops sollaudi sermeti	Jeannel, 1948	Jura
Pseudoboldoria robatiï	(Reitter, 1889)	Ticino
Royerella villardi matheyi	Jeannel, 1922	Jura
Royerella villardi sermeti	Jeannel, 1955	Jura

Tableau 3 Liste des espèces stygophiles et stygobies endémiques.

Espèces	Auteurs	Distribution
MOLLUSCA: GASTROPODA		
Bythiospeum alpinum	Bernasconi, 1988	Western Alps
Bythiospeum turneri	Bernasconi, 1997	Plateau
Graziana quadrifoglio	Haase, 2003	Tessin
CRUSTACEA: COPEPODA		
Gelyella monardi	Moeschler & Rouch, 1988	Jura
Stygepactophanes jurassicus	Moeschler & Rouch, 1984	Jura
CRUSTACEA: SYNCARIDA		
Pseudobathynella helvetica	Serban & Delamare, 1974	Jura
CRUSTACEA: AMPHIPODA		
Niphargus luchoffmanni	Fišer & Alther, 2018	Northern margin of Alps
CRUSTACEA: ISOPODA		
Proasellus maleri	Henry, 1977	Western Alps

.....

.....

peut aussi avoir un impact négatif (Ferreira and Pellegrini, 2019).

L'aménagement du territoire peut aussi modifier le régime hydrique du milieu karstique, soit par imperméabilisation ou à cause des pompages prélevant de l'eau potable. La construction de routes et tunnels qui drainent l'eau changent également la dynamique naturelle des écoulements (Filipponi et al., 2012; Jeannin et al., 2015). Il est donc possible qu'une grotte puisse être asséchée ou inondée par les infrastructures humaines, perturbant ainsi l'équilibre de l'écosystème.

L'activité humaine directe peut aussi avoir un impact. Les grottes attirent la curiosité d'un public non averti, qui peut les utiliser comme lieux de loisir, explorer, allumer des feux de camp, organiser des soirées, etc. Ces perturbations rompent un équilibre fragile et dans les cas les plus graves, peuvent complètement changer la dynamique du lieu. Dans la grotte du Chemin de fer (NE), une colonie de chauves-souris de plusieurs centaines d'individus a complètement disparu suite aux dérangements multiples liés aux visites humaines (Blant, 1995). Le guano de chauve-souris étant un apport de nutriment considérable, la disparition de cette colonie impacte inévitablement l'écosystème qui en dépend (Ferreira, 2019).

2.2. Mesures de protection

En automne 2022, 196 pays, Suisse incluse, ont signé l'accord de Kunming-Montréal qui prévoit,

entre autres, la protection de 30% des terres et des océans d'ici 2030. A l'heure actuelle, 13.4% des surfaces terrestres helvétiques sont protégées (Gattlen and Klaus, 2023). La Stratégie Biodiversité Suisse vise à faire monter ce taux à 17%, pour satisfaire les exigences du Plan stratégique de la Convention sur la diversité biologique (CDB) et du réseau européen Emeraude de la Convention de Berne (OFEV, 2012). Pourtant certaines études montrent qu'il serait nécessaire de consacrer entre 30 et 40% de la surface à la conservation de la biodiversité (OFEV, 2021).

L'enjeu est donc important et les conflits d'intérêts nombreux (milieux agricoles, industries, tourisme de montagne, chasseurs, etc.). Pour atteindre leurs objectifs de conservation, les cantons ont identifié de nouveaux territoires dignes de protection incluant, parmi d'autres, zones humides, prairies, forêts et zones de montagne. Les grottes sont considérées de manière très générale sous le terme «grottes et cavernes obscures» dans la liste des milieux prioritaires (OFEV, 2019).

Selon l'art. 18 de la loi fédérale sur la protection de la nature et du paysage (LPN; RS 451), «la disparition d'espèces animales et végétales indigènes doit être prévenue par le maintien d'un espace vital suffisamment étendu (biotopes), ainsi que par d'autres mesures appropriées».

Force est de constater que cette loi ne dispose pour l'instant pas des bases scientifiques suffisantes pour être appliquée de manière exhaustive au milieu souterrain. La raison de ce manque de détails se trouve dans les critères utilisés pour définir un milieu comme étant digne de protection. Ces critères sont listés dans l'ordonnance sur

.....

.....

la protection de la nature et du paysage (OPN; RS 451.1) à l'art. 14, al. 3:

«Les biotopes sont désignés comme étant dignes de protection sur la base:

- a. de la liste des milieux naturels dignes de protection figurant à l'annexe 1, caractérisés notamment par des espèces indicatrices;
- b. des espèces de la flore et de la faune protégées en vertu de l'art. 20;
- c. des poissons et écrevisses menacés, conformément à la législation sur la pêche;
- d. des espèces végétales et animales rares et menacées, énumérées dans les Listes rouges publiées ou reconnues par l'OFEV;
- e. d'autres critères, tels que les exigences des espèces migratrices ou la connexion des sites fréquentés par les espèces.»

Aucune espèce cavernicole ne figure dans la liste des espèces protégées (rappel: par cavernicoles sont sous-entendues les espèces troglobies/stygobies et troglaphiles/stygophiles; certaines espèces troglloxènes, tel que les chauves-souris, figurent néanmoins dans la liste). Les conditions «a» et «b» ne sont pas remplies. Aucune espèce de poisson cavernicole n'a encore été trouvée en Suisse et la condition «c» n'est donc pas applicable. Nous allons développer le point «d» ci-après. Pour ce qui est du

* <https://iucn.org/>

point «e», les espèces cavernicoles ne sont pas, à notre connaissance, migratrices.

2.2.1. Niveau de menace

Les listes rouges publiées ou reconnues par l'OFEV évaluent le risque d'extinction d'un groupe d'espèces. Ces listes se basent sur les critères de l'IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*), et classifient les espèces dans l'une des catégories suivantes (Klaus et al., 2023):

- Non évalué
- Non applicable
- Données insuffisantes
- Non menacé
- Potentiellement menacé
- Vulnérable
- En danger
- Au bord de l'extinction
- Éteint en Suisse
- Éteint à l'état sauvage
- Éteint à l'échelle mondiale

Pour ce faire, elles utilisent ces critères:

- Diminution des effectifs (passés, actuels ou futurs)
- Répartition géographique associée à une fragmentation ou des réductions d'habitat

.....

.....

- Population de petite taille associée à une diminution des effectifs
- Population ou aire de distribution de très petite taille
- Analyse quantitative de la probabilité d'extinction

Ces critères se basent donc sur l'état des populations et leur évolution. Pour obtenir ce type de données, il faut faire des suivis dans le temps, établir des aires de répartition, préciser la taxonomie, etc. Il s'agit d'un travail conséquent, nécessitant les connaissances d'experts pour les groupes concernés. Il existe, à ce jour, 21 listes rouges pour la Suisse. Elles sont généralement regroupées par groupe taxonomique (par exemple, la liste rouge des abeilles). Seules 9 espèces cavernicoles figurent sur ces listes (Chittaro et al., 2024; Rüetschi et al., 2012). Il y a donc peu d'espèces susceptibles de classer une grotte comme biotope digne de protection (parmi les espèces troglobies et troglaphiles du moins, car les chauves-souris ont, à plusieurs occasions, profité de mesures de protection dans leurs lieux d'hibernation).

2.2.2. Endémisme

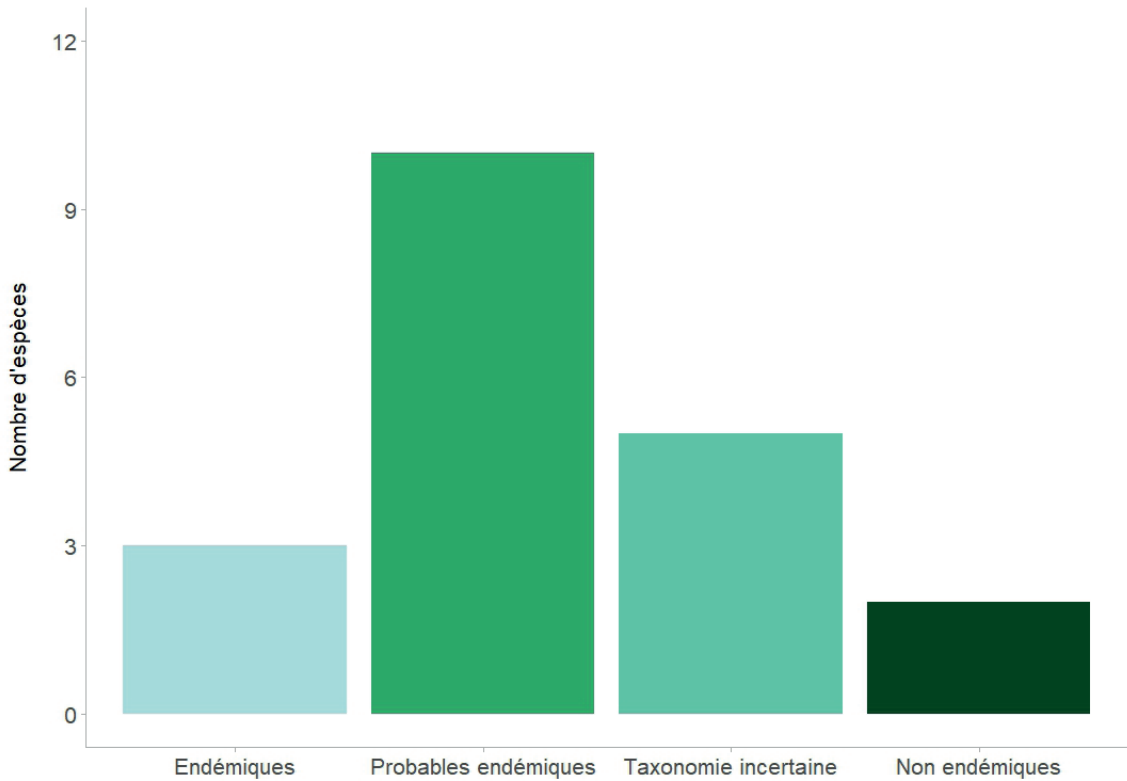
Dans l'art. 18 de la LPN (LPN; RS 451), il est mention d'espèces indigènes. Il est entendu par-là les espèces dont l'aire de répartition naturelle se trouve, au moins en partie, en Suisse. Cela inclut évidemment, les espèces endémiques qui sont prioritaires en matière de protection. Pour être reconnu au niveau fédéral, ce statut se base sur des critères officiels:

- Niveau de connaissances suffisant concernant le groupe d'organismes
- Reconnaissance de l'autonomie du taxon
- Niveau taxonomique de l'espèce
- Niveau de documentation correspondant au degré de connaissances
- Connaissances suffisantes de l'aire de répartition
- Classement actuel du statut de menace

Ici, les espèces ne sont pas évaluées par groupe taxonomique, mais individuellement. Elles figurent alors dans une liste correspondant à leur niveau d'endémisme (Tschudin et al., 2017). Cette liste, qui utilise d'autres critères de classification que celle de Bernasconi, nécessite de bonnes connaissances des espèces, une classification taxonomique claire, et surtout une classification du statut de menace. Le statut de menace décrit plus haut est évalué dans les listes rouges. Seules 9 espèces cavernicoles figurent dans les listes rouges, réduisant dès le départ la liste des espèces dont l'endémisme sera évalué. Heureusement, il est aussi possible que le niveau de menace des espèces ne figurant pas dans une des listes rouges soit estimé par un expert. Grâce à cette clause, le niveau d'endémisme a été évalué pour 20 espèces cavernicoles.

.....

Figure 2 Répartition des espèces cavernicoles par catégorie d'endémisme.



La liste du niveau d'endémisme classe les espèces selon 4 catégories :

- Endémiques et partiellement endémiques pour la Suisse.
- Potentiellement endémiques et partiellement endémiques pour la Suisse.
- Potentiellement endémiques/partiellement endémiques dont l'autonomie taxonomique n'est pas suffisamment prouvée.
- Non endémiques/partiellement endémiques pour la Suisse.

Lorsque l'on regarde la répartition des espèces cavernicoles selon les 4 catégories mentionnées plus haut (Figure 2), on se rend compte que seulement 3 espèces cavernicoles sont endémiques avec un statut clair. La moitié des espèces (10) sont classifiées comme «probables» endémiques. Là encore la faute revient au manque de connaissances de ces espèces. En effet, les espèces figurant dans ces catégories ont été estimées comme endémiques ou partiellement endémiques, mais avec une trop grande incertitude pour figurer dans la liste officielle. Les espèces classées sous taxonomie incertaine (5) sont dans une situation semblable à celles consi-

dérées comme probable endémique, mais ici le critère sur lequel on se base est celui de la classification taxonomique. Il est aussi important de noter que 2 espèces ont été classées comme non endémiques, ce qui veut dire que leur aire de répartition ne se limite pas à la Suisse. Le statut de 75% (15/20) des espèces cavernicoles évaluées dans la liste des endémiques doit donc être clarifié.

La plupart des espèces décrites comme endémiques selon Bernasconi ont un site associé dans lequel elles ont été décrites pour la première fois. Ce lieu, appelée locus typicus, est donné pour les espèces troglobies endémiques dans les figures 3a et 3b. Le manque de monitoring ne permet malheureusement pas encore de définir des cartes de répartition mais, en attendant d'avoir plus de données, ces cartes préliminaires indiquant les locus typicus nous donnent un premier aperçu de la situation géographique de ces espèces.

2.2.3. Espèces prioritaires

La Suisse s'est dotée d'une stratégie biodiversité en 2012 (OFEV, 2012), ainsi que d'un plan d'action pour la mise en place de celle-ci en 2017 (OFEV, 2017). Cette stratégie établit 10 objectifs dans le but d'améliorer l'état de la biodiversité en Suisse. L'un de ces objectifs est le suivant :

«L'état de conservation des espèces prioritaires au niveau national est amélioré et leur extinction est enrayée dans toute la mesure du possible. L'expansion des espèces exotiques

envahissantes susceptibles de provoquer des dommages est endiguée.»

La liste des espèces prioritaires repose sur les listes rouges et la liste du niveau d'endémisme. Elle attribue pour chaque espèce un score. Plus ce score est élevé, plus l'espèce est «prioritaire» pour la protection. Ce score se base sur 2 critères: le niveau de menace et le niveau d'endémisme selon les listes officielles. Plus une espèce est menacée, plus elle aura de points pour le facteur menace (tableau 4) et plus elle est endémique, plus elle aura de points pour le facteur responsabilité (tableau 5). On entend ici par responsabilité l'importance de la Suisse pour la protection de l'espèce. Si une espèce est endémique à la Suisse, toute la responsabilité liée à sa protection repose donc sur les autorités helvétiques.

Parmi les 191 espèces cavernicoles identifiées à ce jour en Suisse, seules 5 (2.6%) sont incluses dans cette liste. Cette faible représentation découle du peu d'espèces évaluées dans les listes rouges et la liste des statuts d'endémisme. En effet, puisque le score de priorité se base sur ces deux listes, les espèces n'apparaissant dans aucune d'elles ne seront pas prises en compte. Celles figurant dans au moins l'une de ces listes peuvent plébisciter de l'avis d'un expert pour statuer sur le critère manquant (menace ou endémisme). Cependant, les experts pour les espèces cavernicoles étant rares et leur évaluation étant pondérée plus faiblement qu'un statut officiel, les espèces à évaluer sont nécessairement moins nombreuses.

Figure 3a Locus typicus (lorsqu'il est connu) des espèces stygobies endémiques selon Bernasconi.

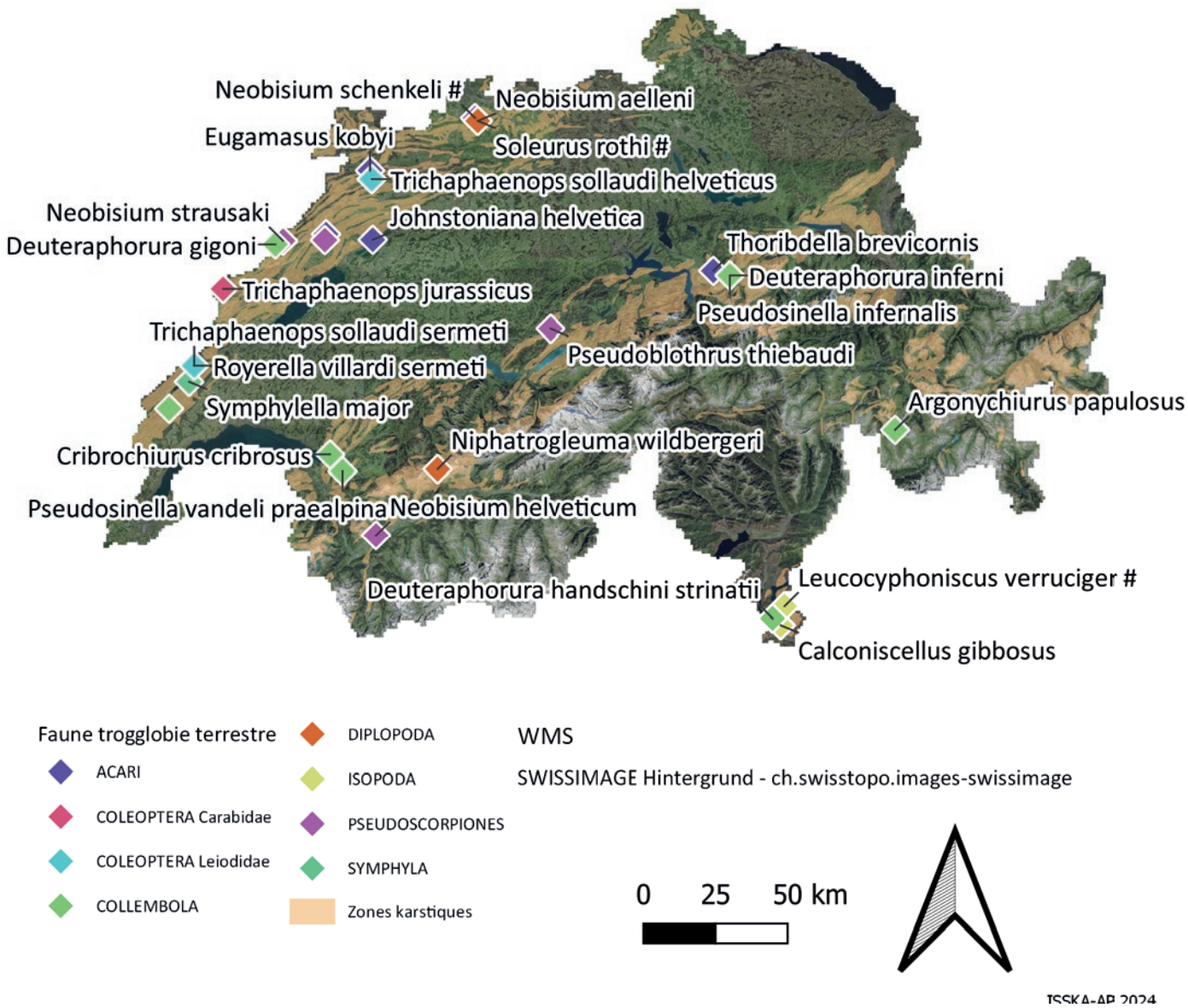


Figure 3b Locus typicus (lorsqu'il est connu) des espèces troglobies endémiques selon Bernasconi.

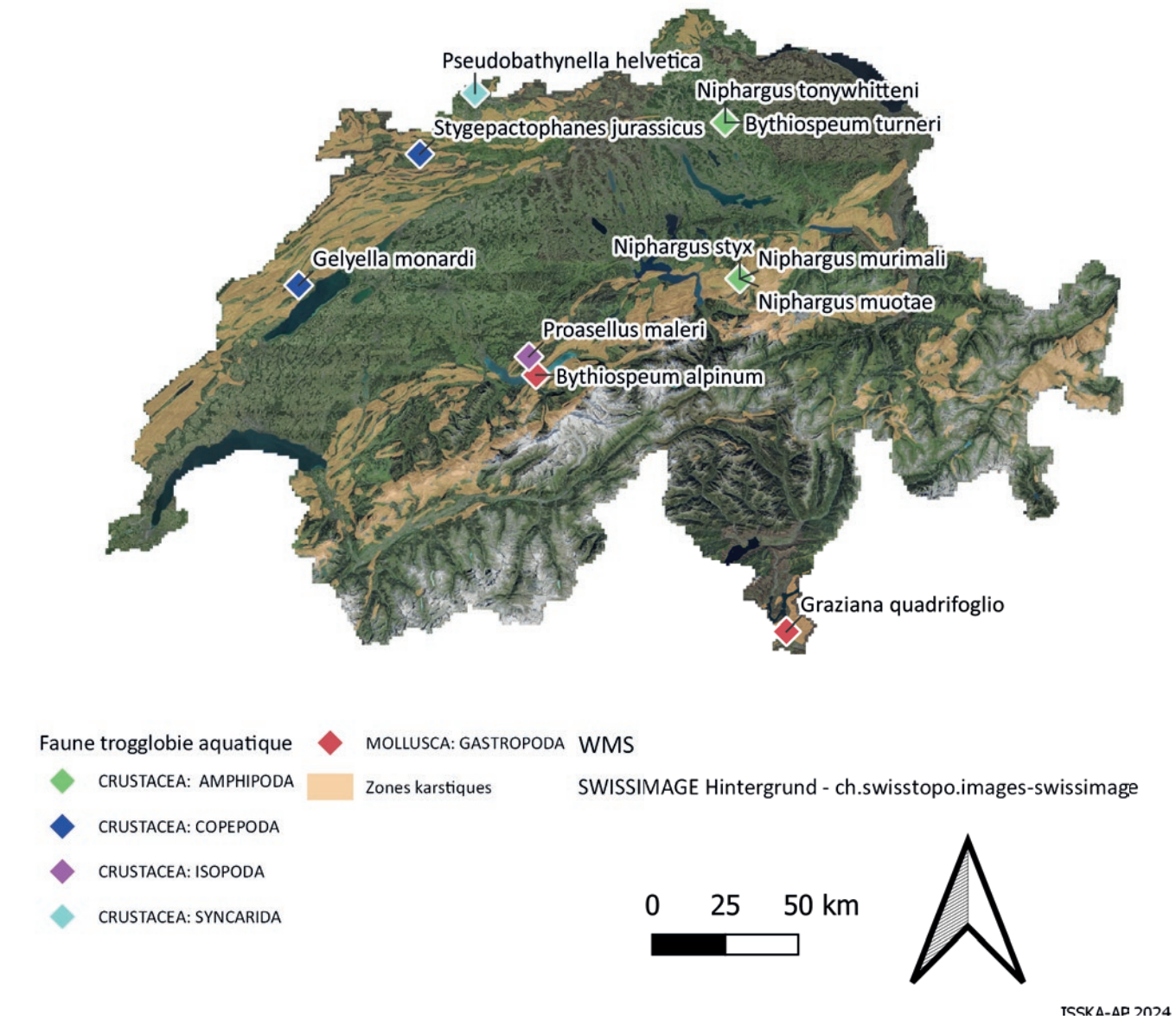


Tableau 4 Nombre de points accordés selon la catégorie de menace.

Nombre de points du facteur «menace»	Liste rouge suisse (catégories avant 2001)	Liste rouge suisse (catégories UICN depuis 2001)	Menace estimée par les experts
4	0, 1	RE, CR	Très élevée
3	2	EN	Élevée
2	3	VU	Moyenne
1	4	NT	Faible
0	n	DD, LC	Inexistante

Tableau 5 Nombre de points accordés selon la responsabilité.

Nombre de points du facteur «responsabilité»	Signification	Explication
4	Très grande responsabilité	L'extinction des populations suisses impliquerait la disparition totale de l'espèce.
3	Grande responsabilité	L'extinction des populations suisses aurait de lourdes conséquences sur l'effectif mondial de l'espèce et augmenterait fortement son degré de menace à l'échelle planétaire.
2	Responsabilité moyenne	L'extinction des populations suisses aurait des conséquences sur l'effectif mondial de l'espèce et augmenterait son degré de menace à l'échelle planétaire.
1	Faible responsabilité	La Suisse assume une coresponsabilité internationale.
0	Aucune responsabilité	La Suisse ne porte aucune responsabilité s'agissant des espèces non indigènes et des hôtes occasionnels.

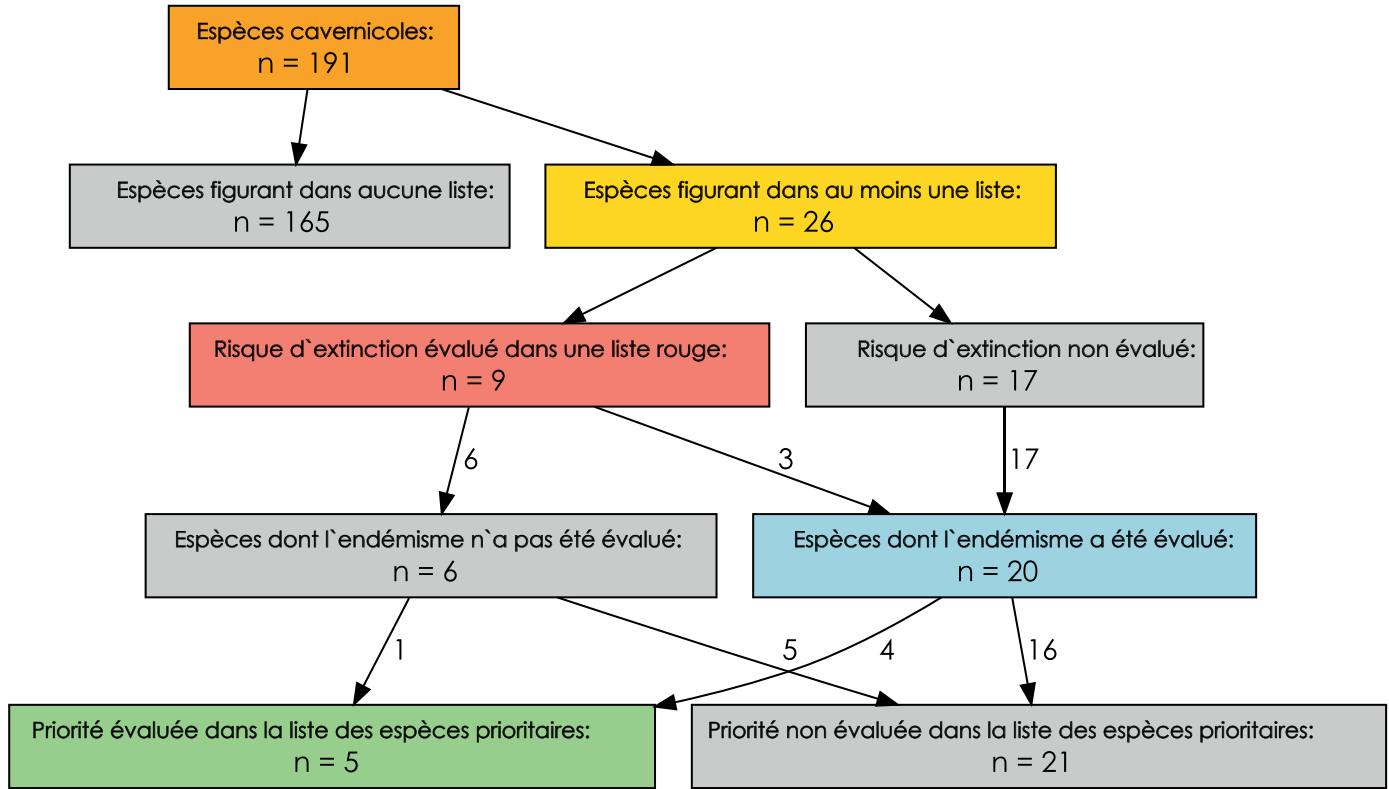
2.3. Synthèse

Une synthèse regroupant les informations données ci-dessus est illustrée dans la figure 4.

L'organigramme (Figure 4) illustre comment les espèces cavernicoles suisses sont classées dans les différentes listes nationales. On observe que seule une faible proportion des espèces connues en Suisse figure dans ces listes (26/191, 14%). Parmi les 26 espèces considérées, seules 9 ont été incluses dans une liste rouge (9/191, 5%). L'en-

démisme a été évalué pour 20 espèces (20/191, 10%). Curieusement, seules 3 des espèces des listes rouges ont été évaluées dans la liste du niveau d'endémisme. Cela est probablement dû au fait que les listes n'ont pas été publiées ou actualisées au même moment. Ainsi, des espèces dont le statut de menace a été évalué après la création de la liste du niveau d'endémisme ne figureront probablement pas dans celle-ci. Enfin, il est important de constater que la priorité n'a été évaluée que pour 4 des 20 espèces dont l'endémisme a été évalué. A noter que

Figure 4 Organigramme de la répartition des espèces cavernicoles (troglophiles/stygophiles, troglobies/stygobies) parmi : les listes rouges, la liste du niveau d'endémisme et la liste des espèces prioritaires

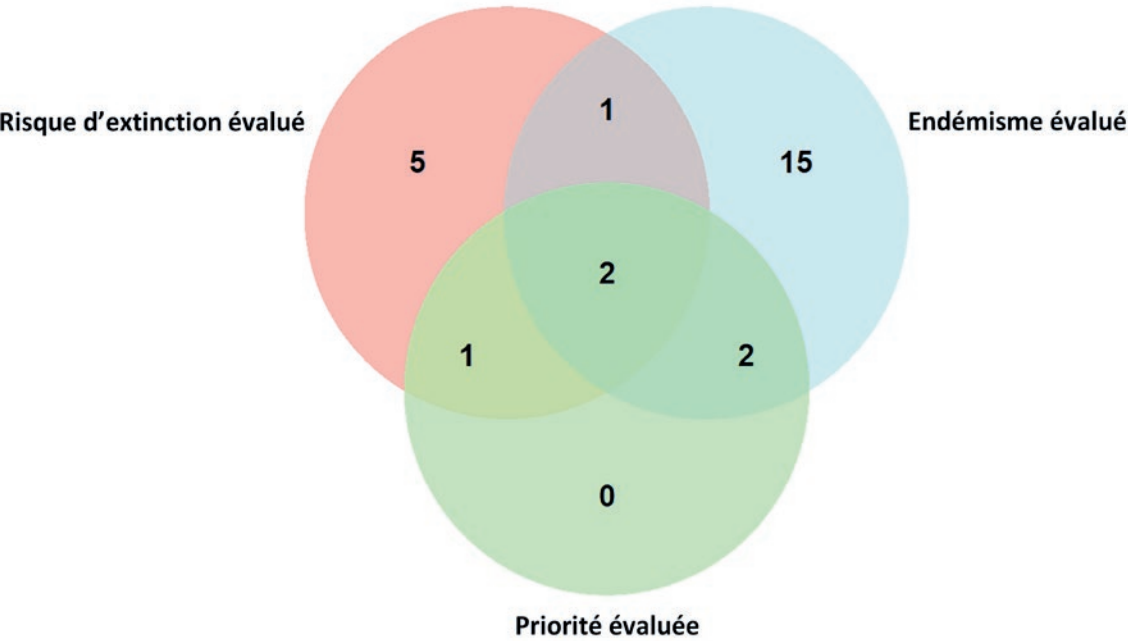


.....

ces espèces prioritaires sont toutes aquatiques et qu'aucun organisme terrestre n'est considéré à ce jour

Lorsque l'on regarde plus en détail le nombre d'espèce présentes dans les listes et que l'on identifie les espèces communes à plusieurs listes sous la forme d'un diagramme de Venn (Figure 5), on se rend compte à quel point il est rare qu'une espèce se trouve dans plus d'une liste.

Figure 5 Diagramme de Venn de la répartition des espèces cavernicoles parmi : les listes rouges, la liste du niveau d'endémisme et la liste des espèces prioritaires.



.....

.....

Tableau 6 Récapitulatif de présence dans les listes par espèce.

En rouge les espèces terrestres, en bleu les espèces aquatiques. Risque d'extinction : RE – éteint en Suisse, CR – en danger critique, EN – en danger, VU – vulnérable, NT – quasi menacées et LC – non menacées. Endémisme : A – endémiques, B – potentiellement endémiques, C – potentiellement endémiques sans autonomie taxonomique prouvée, D – non endémiques. Priorité : 1 – très élevée, 2 – élevée, 3 – moyenne, 4 – faible

Classe	Espèce	Risque d'extinction évalué	Endémisme évalué	Priorité évaluée
Gastropoda	Eucobresia glacialis	VU		3
	Oxychilus cellarius	LC		
	Bythiospeum alpinum	VU	D	
	Bythiospeum charpyi	NT		
	Bythiospeum francomontanum	NT		
	Bythiospeum sterkianum	NT		
	Islamia minuta	NT	D	3
	Graziana quadrifoglio	VU	A	1
Arachnida	Neobisium aelleni		B	
	Neobisium helveticum		B	
	Neobisium schenkeli		B	
	Neobisium strausaki		C	
	Pseudoblothrus infernus		B	
	Pseudoblothrus strinatii		B	
	Pseudoblothrus thiebaudi		B	
	Niphatrogleuma wildbergeri		B	
Diplopoda	Soleurus rothi		B	
Insecta	Trichaphaenops sollaudi helveticus		C	
	Trichaphaenops sollaudi sermeti		C	
	Trechoblemus micros	NT		
	Royerella villardi matheyi		C	
	Royerella villardi sermeti		C	
	Eucyclops teras		B	
	Gelyella monardi		A	1
	Stygepactophanes jurassicus		A	1
Malacostraca	Proasellus maleri		B	

.....

3. Collections muséales

L'un des objectifs de cette étude est de tirer parti des collections muséales disponibles pour constituer une bibliothèque fournie de séquences d'ADN spécifiques (amplicons moléculaires) de spécimens d'invertébrés provenant de grottes karstiques du Jura suisse, et de pouvoir ainsi identifier ces organismes sur la base de leur ADN (approche du *barcoding*). Ces amplicons, en addition à ceux déjà présents dans les bases de données publiques, permettront ensuite d'identifier la diversité détectée dans l'environnement (approche du *metabarcoding*).

Nous avons sollicité l'accès aux collections de cinq principaux musées suisses susceptibles d'abriter d'importantes collections d'invertébrés inféodés aux grottes, à savoir : le Musée d'Histoire Naturelle de Genève, le Musée d'Histoire Naturelle de Neuchâtel, le Musée d'Histoire Naturelle du Tessin, le Museum Cantonal des Sciences Naturelles de Lausanne, ainsi que le Musée d'Histoire Naturelle de Bâle.

Nous avons eu accès aux collections du Musée d'Histoire Naturelle de Neuchâtel et du Museum Cantonal des Sciences Naturelles de Lausanne. Ce dernier musée détient à ce jour l'importante collection d'Albert Sermet contenant des spécimens prélevés dans les grottes suisses et qui était préalablement stockée au Musée d'Yverdon et région. Les trois autres Musées sollicités étant en rénovation pendant la période de cette étude, il ne nous a pas été possible d'accéder à leurs collections.

Au Musée d'Histoire Naturelle de Neuchâtel nous avons eu le privilège d'accéder aux col-

lections d'Ariane Pedrolì, spécialiste des diplopodes dont certaines collectes ont été réalisées dans les grottes suisses. De cette collection nous avons pu isoler deux espèces de diplopodes à savoir *Polydesmus angustus* (1 spécimen) et *Orthochordeumella fulva* (1 spécimen). Au Musée Cantonal des Sciences Naturelles de Lausanne nous avons exploré la collection de Sermet de laquelle nous avons isolé pour cette étude une dizaine d'échantillons de coléoptère du genre *Trichaphaenops* (*T. helveticus*, *T. sollaudi*, *T. jurasicus*, *T. sollaudi sermenti* et *T. sollaudi sermenti globulicollis*). Il n'y avait, dans aucun des deux musées prospectés, de section dédiée à la faune des grottes, ce qui a compliqué la tâche lors du recensement des échantillons devant servir à la constitution de la bibliothèque d'amplicons moléculaires.

Face à cette difficulté nous avons sollicité des spéléologues amateurs et professionnels qui ont gracieusement mis à notre disposition certaines de leurs collections pour compléter notre base de données. Valentin Moser et son équipe, en particulier, nous ont fourni de nombreux spécimens récoltés dans la région bâloise. Finalement, nous avons prospecté la grotte de Milandre (Jura), et celle du Chemin de fer (Neuchâtel) dans l'optique de prélever des spécimens récents. Au cours de ces missions nous avons pu collecter une variété d'invertébrés notamment des clitellates, des diplopodes, des arachnides et des insectes. Tous ces échantillons rassemblés dans le tableau 7 ont par la suite été utilisés pour la partie moléculaire de cette étude.

4. Barcoding

4.1. Sélection des spécimens

Sur l'ensemble des échantillons d'invertébrés cavernicoles suisses rassemblés dans le cadre de ce projet (cf. collections muséales), nous avons sélectionné 96 spécimens pour la partie *barcoding*. Ces spécimens incluent des clitellates (8), un bivalve (1), des diplopodes (5), des malacostracés (7), des acariens (7), des pseudoscorpions (3), des araignées (7), un opilion (1), des collemboles (15), des diploures (13), des coléoptères (17), des diptères (10), un hémiptère (1), et un psocoptère (1).

Ces spécimens étaient conservés sous différentes conditions. Les *Trichaphaenops* et certain *Royella* étaient épinglés et conservés à sec tandis que la quasi-totalité du reste des échantillons étaient préservés dans l'alcool à 70-80%. Nous avons à la fois utilisé des échantillons frais datant de quelques semaines et de vieux échantillons collectés dans les années 1950. Enfin, certains des spécimens étaient intacts et relativement bien préservés, alors que d'autres étaient endommagés, particulièrement aux antennes et autres appendices fragiles. Les informations relatives aux spécimens étudiés, leur collecte et leur état sont disponibles sur demande.

4.2. Identifications morphologiques des spécimens

A l'exception des 10 *Trichaphaenops* provenant du Museum de Lausanne, des deux diplopodes du Musée d'Histoire Naturelle de Neuchâtel et de trois *Royella* provenant de la collection personnelle de Yannick Chittaro, aucun spécimen n'avait été préalablement identifié par des spécialistes. Nous avons donc contacté une série d'experts de différents groupes taxonomiques (voir section remerciements) pour des besoins d'identification et de clarifications taxonomiques et avons pu, grâce à leur aide, déterminer une majorité d'espèce (Table 7, Annexe 3). Les diptères, les clitellates et les pseudoscorpions constituent l'essentiel des échantillons n'ayant pas encore été formellement identifié morphologiquement par des spécialistes. Pour les groupes comme les collemboles, les acariens ou les diplopodes, la taxonomie ne semble pas suffisamment aboutie pour identifier tous les spécimens car, comparativement aux autres groupes d'invertébrés, peu de recherches ont été entreprise dans les milieux karstiques en Suisse.

Méthodes barcoding

Chaque spécimen séquencé a pu être photographié avec une loupe Leica M205 C à l'Université de Neuchâtel ou avec un appareil photo Canon EOS 6D, puis traitées avec Adobe Photoshop Lightroom (<http://www.adobe.com>) et Helicon Focus v. 5.3 (<http://www.heliconsoft.com>) au Museum Cantonal des Sciences Naturelles de Lausanne afin de mettre en évidence les critères morphologiques nécessaires à leur identification (photos disponibles sur demande).


Afin d'extraire l'acide désoxyribonucléique (ADN) des spécimens sans trop les endommager, nous avons suivis l'approche de la digestion avec un tampon «proteinase k» permettant de digérer les tissus internes des individus tout en préservant leur enveloppe chitineuse et ainsi la morphologie extérieure des organismes (Figure 6). Nous avons utilisé les individus entiers lorsque leur taille n'était pas trop importante, ou prélevé une patte pour certains spécimens de coléoptères, d'araignées et d'opilion lorsque les spécimens avaient été séchés ou étaient trop volumineux. Malheureusement, cette approche n'est réellement efficace que pour les arthropodes qui possèdent une enveloppe chitineuse, les mollusques et les annélides possédant des tissus «mous» sont intégralement digérés. C'est pourquoi, pour ces groupes, nous avons prélevé uniquement une portion de tissu afin de préserver le reste de l'organisme. Nous avons utilisé le kit d'extraction NucleoSpin 96 Tissue de Macherey-Nagel en adaptant la durée d'incubation du tampon de proteinase k aux différents spécimens, i.e. les organismes fragiles tels que les collembolés n'ont été digérés que 3h, alors que les acariens et pseudoscorpions plus résistants ont été digérés 15h. Tous les ADN ont été élués avec deux cycles de 100µl de tampon BE préchauffé à 70°C. Les amplifications du gène Cytochrome Oxidase subunit 1 (COI) ont été effectuées avec les amorces LepF et

LepR (Hajibabaei et al., 2006) puis contrôlé par gel d'électrophorèse. Tous les échantillons positifs ont été ensuite purifiés avec plaque Millipore Merck selon les recommandations du fabricant*, puis séquencés avec la technologie Sanger à Macrogen à Amsterdam (NL).

Les séquences brutes ont ensuite été traitées avec le pipeline bioinformatique «sanger_cleaner» récemment développé par Dr. Guillaume Lentendu et disponible sur la plateforme GitHub (https://github.com/lentendu/barcode_toolkit). Cet outil permet de nettoyer, d'assembler et de comparer les séquences aux bases de données avec l'algorithme BLAST. Toutes les séquences sont disponibles sur demande et seront prochainement publiées sur la plateforme Genbank.

Figure 6 Exemple de digestion avec le tampon de proteinase k.

A gauche un *Poecilophysys spelaea* frais, à droite le même individu après 3h de digestion. NB. Sur l'image de droite il ne reste plus que l'enveloppe chitineuse qui préserve la morphologie de l'individu permettant ainsi son identification.



* https://www.merckmillipore.com/CH/fr/product/MultiScreen-PCR96-Filter-Plate,MM_NF-LSKMPCR50

4.3. Résultats du barcoding

Parmi les 96 spécimens sélectionnés, nous avons obtenu des séquences convaincantes pour 66 individus (69% de réussite) (Tableau 7). Malheureusement les vieux spécimens de Trichaphaenops conservés à sec n'ont pu être amplifiés correctement, mais cela est également vrai pour les spécimens conservés dans l'alcool dont le succès d'amplification décroît avec le temps de stockage. Ce taux de succès est néanmoins réjouissant compte-tenu de la diversité taxonomique des spécimens sélectionnés, de leur variabilité de conservation, et de la pauvreté des bases de données moléculaires. Toutes ces séquences ont été obtenues avec un protocole unique et l'expérience gagnée permettra certainement d'améliorer les futures recherches.

Une fois les séquences obtenues, une recherche de similarité avec les bases de données Genbank et BOLD a pu être effectuée avec l'outil BLAST. Force est de constater qu'une grande disparité existe pour la caractérisation moléculaire entre les différents clades taxonomiques. En effet, dans le cas des diptères ou des araignées, nos séquences possèdent une similarité moyenne au-dessus de 98% avec les deux bases de données, alors que pour les diplopodes, les collembolés, les diploures et les acariens ce taux de similarité est bien inférieur à 90%. A titre d'information, la limite de similarité entre deux espèces (i.e. *barcoding gap*) est généralement comprise entre 95-96% pour ce marqueur, alors qu'un seuil inférieur à 90% indique vraisemblablement une limite entre deux genres. Signalons au

passage qu'un manque de séquences dans les bases de données peut conduire à des assignations erronées, et que ces dépotoires ne sont pas exempts d'erreurs d'identifications. Finalement, les séquences obtenues peuvent contenir des erreurs d'amplifications ou de séquençage et leurs interprétations doivent donc être effectuées avec un esprit critique et conservateur.

Dès lors, nous pouvons en déduire que nos dip-tères sont tous associés à une espèce, à l'exception d'un spécimen associé au genre *Speolepta* qui est à la limite de ce seuil (94%) et appartient possiblement à une espèce non présente dans les bases de données (Tableau 7). Toutes les araignées et le spécimen d'opilion ont pu être identifiés à l'espèce, mais *Porrhomma rosenhaueri* n'ayant jamais été barcodé jusqu'alors, nos quatre séquences de cette espèce ne dépassent pas les 96% de similarité par rapport aux bases de données actuelles. Pour les clitellates, trois espèces ont pu être identifiées moléculairement (*Erpobdella testacea*, *Globulidrilus riparius* et *Glossiphonia complanata*) mais non validées morphologiquement par une personne compétente (Tableau 8), et quatre spécimens ne possèdent aucune séquence ni pour le genre ni pour la famille dans les bases de données. Ce cas de figure se retrouve pour les malacostracés avec trois espèces identifiées moléculairement (*Androniscus helveticus*, *Niphargus rhe-norhodanensis* et *Proasselus cavaticus*) et deux spécimens de *Proasselus* à 85%. Cela est finalement le cas pour les acariens avec une seule espèce identifiée, il s'agit de *Poecilophysys spelaea* (Figure 6), les autres séquences possédant

.....

une similarité de 82-84% indiquent que non seulement ces espèces n'ont pas encore été caractérisées, mais que leur genre et famille ne le sont pas davantage (Tableau 7). La situation est vraiment plus critique pour les diplopodes, collemboles et diploures pour lesquels les bases de données sont trop peu fournies pour identifier des espèces. Nous avons ainsi obtenu les premières séquences pour *Orthochordeumella ful-*

va et *Soleurus rothi*, ainsi qu'une séquence pour *Polydesmus angustus* mais trop médiocre pour pouvoir être comparée avec les cinq séquences présentent sur Genbank (Tableau 8). De manière générale, la taxonomie de beaucoup de ces groupes n'est pas suffisamment connue et/ou les bases de données moléculaires trop lacunaires pour pouvoir déterminer les espèces de manière adéquate.

Tableau 7 Synthèse des identifications morphologiques et moléculaires pour les différents clades.

Clades	Spéci- mens in- vestigués	Spéci- mens identifiés morpho- logique- ment	Espèces identifiées morpho- logique- ment	Spéci- mens barcodés	Espèces identifiés généti- quement	Similarités avec les bases de données généti- ques [%]*	Spéci- mens trogllobies	Spéci- mens tro- glophiles
Clitellates	8	*	*	7	2	92 (84-99)		
Bivalves	1	*	*	0		NA		
Diplopodes	5	3	3	4	1	86 (81-91)	1	1?
Malacostracés	7	2	1	5	3	94 (85-100)	3	
Acariens	7	5	2	6	1	87 (82-98,9)		1-2
Pseudoscorpions	3	*	*	3	2	90 (85-97)		
Araignées/Opi- lions	8	7	4	7	4	98 (95-100)	1	2
Collemboles	15	9	2	10		83 (80-85)		
Diploures	13	*	*	8		84 (80-84)		
Coléoptères	17	11	2	4	1	91 (86-97,8)	16	
Diptères	10	*	*	10	9	99 (94-100)	2	5
Autres insectes	2	1	1	2	1	99 (98-100)		
Total	96	38	15	66	24	90 (73-100)	23	8-10

*Sans validations taxo-
nomiques d'experts

*Moyenne (min-max)

.....

.....

4.4. Écologie des spéci- mens étudiés

De manière générale, tous les spécimens étu-
diés dans ce projet semblent à divers degrés
inféodés aux grottes. Parmi ces espèces, nous
pouvons citer le diplopode *Soleurus rothi*, obser-
vé uniquement dans quelques grottes du can-
ton de Soleure (Manfredi, 1957), les coléoptères
Trichaphaenops sollaudi et *Royerella villardi*,
tous deux inféodés aux grottes du Jura, l'arai-
gnée *Porrhomma rosenhaueri*, très commune en
Suisse et dans les pays voisins, les deux espèces
de diptères *Bradysia forficulata* et *Corynoptera*
spoeckeri, ainsi que les deux malacostracés *Ni-*
phargus rhenorhodanensis et *Proasselus cavati-*
cus, qui vivent exclusivement dans les eaux sou-
terraines (Figure 7).

Nous n'avons pas rencontré d'espèces sty-
gophiles, mais plusieurs troglophiles ont été
identifiées, bien que ces catégories soient en-
core relativement arbitraires au vu du peu de
connaissances disponibles pour nombre de ces
organismes. Parmi elles figurent les araignées
Meta menardi et *Metellina merianae*, très com-
munes dans les grottes jurassiennes, les diptères
Heleomyza serrata, *Scoliocentra brachypter-*
na, *Scoliocentra villosa*, *Trichocera regelationis*
ainsi que *Speolepta leptogaster* dont les larves
prédatrices forment un réseau de fils gluants sur
les parois pour capturer leurs proies [4], le clo-
porte *Trichoniscoides helveticus*, le pseudoscor-
pion *Neobisium simile*, le diplopode *Polydesmus*
angustus, l'acarien *Poecilophysis spelaea*, ainsi

que le collembole *Isotomurus cf. alticolus* (Ta-
bleau 8).

Le statut des autres espèces demeure inconnu,
notamment celles insuffisamment décrites ou
classées comme trogloxènes, un groupe décri-
vant les espèces qui se retrouvent occasionnel-
lement dans les grottes. Dans tous les cas, de
nombreux traits morphologiques, tels que la ré-
duction des yeux, la dépigmentation ou le dé-
veloppement accru des appendices, indiquent
souvent une adaptation spécifique au milieu
souterrain (Ginet and Decou, 1977). Ces traits se
retrouvent chez de nombreux collemboles ob-
servés tels qu'*Isotomurus cf. alticolus* et *Pygmar-*
hopalites cf. postumicus (Annexe 4).

4.5. Conclusion barcoding

Nous avons pu sélectionner un total de 96 spé-
cimens provenant de grottes karstiques du Jura
suisse pour des analyses de *barcoding* molécu-
laire et 66 d'entre eux ont permis d'obtenir des
séquences exploitables. Dans 22 cas, des sé-
quences étaient déjà présentes dans les bases
de données et des identifications à l'espèce ont
pu être confirmées par ce biais. Cependant,
pour les 44 autres séquences, la similarité était
en deçà du seuil correspondant au niveau de
l'espèce (<96%); parfois même le genre ou la
famille n'ont pu être associés correctement. Il est
important de relever que dans six cas au moins
nous avons obtenu les premières séquences
d'organismes identifiés morphologiquement, et
Il n'est pas exclu que certains spécimens ap-
partiennent à des espèces nouvelles pour la

.....

science. Cette analyse démontre qu'un travail taxonomique combinant les approches morphologiques et moléculaires est nécessaire pour établir des données de base solides sur la diversité de la faune des grottes. Ce n'est en effet

qu'une fois que ces données auront été obtenues que l'utilisation d'une approche purement moléculaire comme le *metabarcoding* pourra réellement fournir des résultats précis (cf. section suivante).

Figure 7 Exemples de troglobiontes rencontrés dans le cadre de cette étude.
A. *Trichaphaenops sollaudi*, B. *Royerella villardi*, C. *Soleurus rothi*, D. *Porrhomma rosenhaueri*, E. *Niphargus rhenorhodanensis*, F. *Proasellus cavaticus*, G. *Bradysia forficulata* , and H. *Corynoptera spoeckeri*.

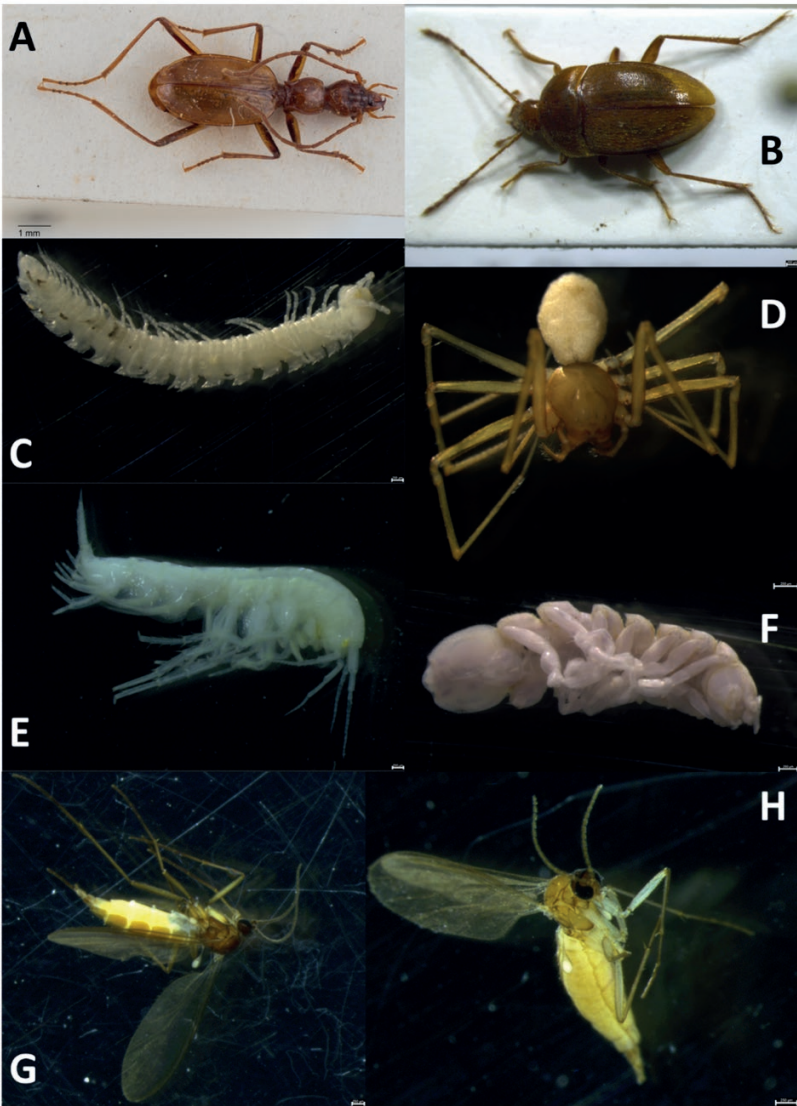


Tableau 8 Synthèse des espèces identifiées avec confiance

Clades	Espèces	Nombre de spécimens investigués	Nombre de spécimens identifiés morphologiquement	Nombre de spécimens barcodés	Similarités avec les bases de données génétiques [%]*	Statuts écologiques	Espèces endémiques de Suisse
Clitellates							
	Erpobdella testacea	1	0	1	98		
	Globulidrilus riparius	1	0	1	99		
	Glossiphonia complanata	1	0	1	99.2		
Diplopodes							
	Orthochordeumella fulva	1	1	1	87		
	Polydesmus angustus	1	1	1	NA	Troglophile	Non
	Soleurus rothi	1	1	1	91	Troglobie	Oui
Malacostracés							
	Trichoniscoides helveticus	1	0	1	100	Troglophile	Non
	Niphargus rhenorhodanensis	2	2	1	99.5	Stygobie	
	Proasellus cavaticus	1	0	1	98	Stygobie	
Acarie							
	Eugamasus monticolus	4	4	3	82-83		Oui
	Poecilophysys spelaea	1	1	1	99	Troglophile	
Pseudoscorpions							
	Neobisium simile	1	0	1	97	Troglophile	
Araignées/Opilions							
	Amelinus aurantiacus	1	1	1	99.8	Trogloxène	
	Meta cf. menardi	1	1	1	99.5	Troglophile	
	Metellina merianae	1	1	1	99.4	Troglophile	
	Porrhomma rosenhaueri	5	4	4	96	Troglobie	
Collembol							
	Isotomurus cf. alticolus	3	3	3	83	Troglophile	
	Pygmarrhopalites cf. postumicus	1	1	0			
Coléoptères							
	Royerella villardi	6	6	3	87	Troglobie	Oui
	Trichaphaenops sollaudi	10	10	0		Troglobie	Oui
Diptères							
	Bolitophila saundersii	1	0	1	100	Trogloxène	Non
	Bradysia forficulata	1	0	1	99.5	Troglobie	Non

5. Metabarcoding

Clades	Espèces	Nombre de spécimens investigués	Nombre de spécimens identifiés morphologiquement	Nombre de spécimens barcodés	Similarités avec les bases de données génétiques [%]*	Statuts écologiques	Espèces endémiques de Suisse
	Corynoptera spoeckeri	1	0	1	99.9	Troglobie	Non
	Heleomyza serrata	1	0	1	99.9	Troglophile	Non
	Limonia nubeculosa	1	0	1	99.7	Trogloxène	Non
	Scoliocentra brachypterna	1	0	1	99.5	Troglophile	Non
	Scoliocentra villosa	1	0	1	99.7	Troglophile	Non
	Speolepta leptogaster	1	0	1	99.9	Troglophile	Non
	Trichocera regelationis	1	0	1	99.7	Troglophile	Non
Autres insectes							
	Bertkauia lucifuga	1	1	1	98		
	Trigonocranus emmeae	1	0	1	100		

5.1. But et intérêt du test méthodologique

Un des buts majeurs de cette étude est de tester la possibilité de révéler la biodiversité des grottes à partir de l'ADN environnemental disponibles dans les eaux souterraines des grottes grâce à l'approche du *metabarcoding*. L'intérêt de cette approche est de pouvoir effectuer un échantillonnage relativement simple et qui ne nécessite pas de trouver les organismes d'intérêt, tels que les troglodytes qui ont un fort potentiel pour la description de nouvelles espèces en Suisse. Cette approche de *metabarcoding*, contrairement au *barcoding*, ne permet pas d'identifier directement les espèces, et est par conséquent très dépendante de la constitution de bases de données de références pour le(s) marqueur(s) génétique(s) employé(s). Les deux approches sont donc complémentaires, le *barcoding* fournissant les séquences de référence pour pouvoir exploiter au mieux les données de *metabarcoding*. Le *metabarcoding* permet quant à lui de cibler des sites d'intérêt pour des investigations plus poussées et contribue ainsi à la description de la biodiversité des milieux souterrains. Pour cette étude pilote, nous avons choisi de cibler l'ensemble des métazoaires à l'aide d'amorces génériques afin d'être sûr d'obtenir des amplifications PCR et des séquences, avec toutefois un risque accru de ne pouvoir récupérer le signal de tous les groupes cibles.

5.2. Résultats du metabarcoding

Le nombre de séquences obtenu par échantillon est bien supérieur à celui attendu, avec une moyenne de 53724 séquences COI et 34944 séquences 28S de haute qualité utilisées pour construire les OTUs (Figure 8).

Il n'y a pas de chute importante du nombre de séquences lors des étapes du traitement bio-informatique, signe de la bonne qualité générale du séquençage. Il est cependant évident que seule une très faible quantité de séquences se trouve dans des OTUs assignés à des métazoaires, et ce pour les deux gènes. La majorité des séquences 28S couvre des clades d'organismes unicellulaires eucaryotes (aka. protistes), et notamment des flagellés du clade kinétoplastidés (*Kinetoplastea*), des ciliés (*Ciliophora*), des algues dorées (*Chrysophyceae*), des cercozoaires, des algues vertes unicellulaires (*Chlorophyceae*, *Trebouxiophyceae*), ainsi que des champignons (Figure 9). Les séquences de métazoaires ne représentent au final que 0.2% des séquences de l'ensemble des OTUs 28S. Une part importante des OTUs 28S (31 %) n'a pas pu être identifiée car leurs séquences représentatives présentaient une similarité inférieure à 80% à n'importe quelle séquence connue.

L'analyse détaillée des 7 OTUs de métazoaires nous indique la détection d'un gastéropode, d'un bivalve, d'un ver plat du sous-phylum *Catenulida* et d'éponges (Figure 10). Au vu de

Méthodes moléculaires

Nous avons extrait l'ADN environnemental provenant de neuf échantillons d'eau, i.e., petits lacs, gouilles, rivières et petits affluents, collectés dans la grotte de Milandre et celle du Chemin de Fer, en suivant les indications d'un précédent guide de l'OFEV (Pawlowski et al., 2020). Pour chaque échantillon, une bouteille plastique PEHD d'un litre (Semadeni AG, Ostermundigen, Switzerland) préalablement stérilisée par autoclave a été remplie en évitant de collecter trop de sédiments et de contamination humaine grâce à des gants en latex, transportée dans une glacière jusqu'au laboratoire, puis conservée une nuit à 4°C. L'eau a ensuite été préfiltrée dans un filtre de 10 µm pour retirer les particules trop volumineuses, puis ces échantillons ont été filtrés à l'aide d'une cartouche filtrante de type Sterivex™ (Merck, Darmstadt, Allemagne) à l'aide d'une pompe à vide électrique (Vacuubrand ME2 NT, Wertheim, Allemagne). Un échantillon d'eau miliQ autoclavé a aussi été filtré dans les mêmes conditions pour servir de contrôle négatif lors de l'extraction d'ADN, des PCR et du séquençage. Tous les filtres et matériels de filtration ont été soigneusement stérilisés à la javelle entre les différents échantillons afin d'éviter toute contaminations croisées. Les cartouches filtrantes ont ensuite été stockées à -20°C pour un mois maximum. L'ADN a été extraites des filtres contenus à l'intérieur des cartouches à l'aide du kit d'extraction d'ADN «NucloSpin eDNA Water» (Marchery-Nagel, Oensingen, Suisse), puis conservé à -20°C.

L'ADN des métazoaires a été amplifié à l'aide de la paire d'amorces LepF/LepR (Hajibabaei et al., 2006) qui amplifie un fragment de ~650 nt du gène mitochondrial COI (cytochrome oxydase de type I) ainsi qu'avec la paire d'amorces Met-LSU-M1/Met-LSU-M11-RC (Machida and Knowlton, 2012) qui amplifie un fragment de ~ 2000 nt du gène nucléaire codant pour la grande sous-unité (28S) de l'ARN ribosomal (ARNr). Les produits PCRs ont été contrôlés sur gel d'agarose puis purifiés à l'aide des

Analyses bio-informatiques

La transformation du signal en base nucléotidique et le démultiplexage a été effectué par la plateforme de séquençage à l'aide du logiciel MinKNOW v23.11.7 utilisé en mode haute précision. Les séquences brutes ont ensuite été analysées avec l'outil DeltaMP v0.7 (<https://github.com/lentendu/DeltaMP>), pour lequel le code traitant les séquences de type Nanopore a été développé spécifiquement pour ce projet. En bref, pour chaque échantillon, la région entre chaque paire d'amorce est extraite à l'aide de cutadapt v4.1 (Martin, 2011) en ne permettant aucune erreur sur les régions des amorces, puis les séquences coupées sont groupées à 90% de similarité avec vsearch v2.22.1 (Rognes et al., 2016) et alignés à l'aide de MAFFT v7.505 (Kato and Standley, 2013) pour créer un profil d'alignement à l'aide du programme HMMER v3.3.2 (Eddy, 2011). L'ensemble des séquences brutes est de nouveau aligné contre ce profil ce qui permet d'extraire l'ensemble des copies dans les deux orientations, car la technologie Nanopore produit des séquences qui contiennent les deux orientations dans une même séquences et produit parfois des séquences chaînées (enchaînement de plusieurs séquences indépendantes), et les outils courant comme cutadapt ne permettent pas d'extraire plus d'une copie de la séquence d'intérêt par séquence brute. Les séquences extraites sont ensuite corrigées à l'intérieur de groupes de séquences similaires à 95% (vsearch avec l'option -cluster-fast), à l'aide du logiciel racon v1.4.3 (Vaser et al., 2017). La correction est répétée plusieurs fois jusqu'à ce que les séquences corrigées des deux dernières itérations soient en moyenne similaires à plus de 98%. Les séquences corrigées sont ensuite polies, en les comparant de nouveau aux séquences extraites par HMMER, à l'aide du logiciel medaka v1.11.3 (<https://github.com/nanoporetech/medaka>). Les séquences de l'ensemble des échantillons sont ensuite groupées dans des OTUs (Operational Taxonomic Unit groupement de séquences similaires se rapprochant d'une espèce moléculaire) à 98% (COI) ou 99% (LSU) de similarité avec l'option «cluster_smallmem» de vsearch. Les chimères sont éliminées à l'aide de l'algorithme UCHIME (Edgar et al., 2011). La séquence représentative (la plus abondante) de chaque OTU est utilisée pour l'assignation taxonomique contre les bases de données 28S de GenBank (release 263; [58]), ou COI de Midori2 (based on GenBank release 263; (Leray et al., 2022)). Les séquences COI générées avec l'approche barcoding (cf. section barcoding) ont été ajoutés à cette dernière base de données. Une taxonomie consensus est assignée à chacun des OTUs lorsqu'au moins une séquence de référence est similaire à au moins 80% avec la séquence représentative de l'OTU (couverture > 80%). Les séquences de référence dans un éventail de similarité entre la plus haute valeur de similarité (max) et max-(100-max)*0.1 sont utilisées pour trouver les rangs taxonomiques partagés par au moins 60% de ces séquences afin de déterminer la taxonomie de chaque OTU.

la faible similarité de ces séquences avec les bases de données, une identification plus précise n'est pas possible. Il est à noter qu'aucun OTU de métazoaire n'a été détecté dans cinq des neuf sites.

La composition taxonomique des OTUs pour le marqueur génétique COI est elle aussi dominé par des organismes unicellulaires eucaryotes, principalement des amibes de la sous-classe Flabellinia, des oomycètes (*Oomycota*) et des algues dorées (*Chrysophyceae* et *Synurophy-*

ceae) (Figure 11). Cependant, la très grande majorité des séquences (69%) et des OTUs (79%) n'a pas pu être identifié. Seul 9 OTUs (<1% des séquences) sont assignées à des clades métazoaires, cinq collemboles, deux hyménoptères de la famille Apidae, un coléoptère de la famille Silphidae et un arachnide. Aucun des organismes barcodés dans la section précédente n'a été retrouvé dans les OTUs des deux grottes.

Figure 8 Profondeur de séquençage et diminution du nombre de séquences à chaque étapes clés pour le gène 28S (A) et le gène COI (B).

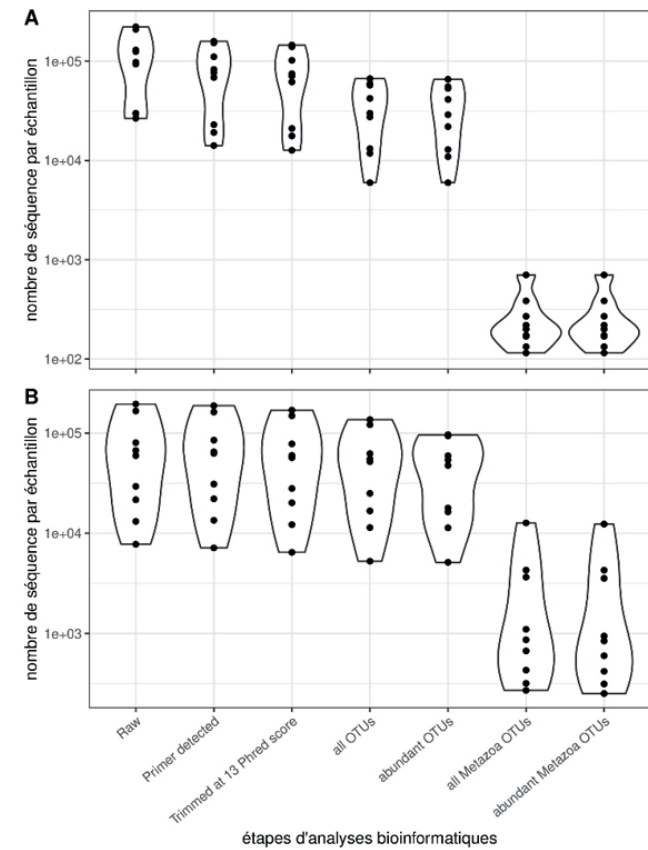


Figure 9 Composition taxonomique des OTUs 28S avec une identification pour trois rangs taxonomiques. La hauteur des boîtes est proportionnelle au log du nombre de séquences.

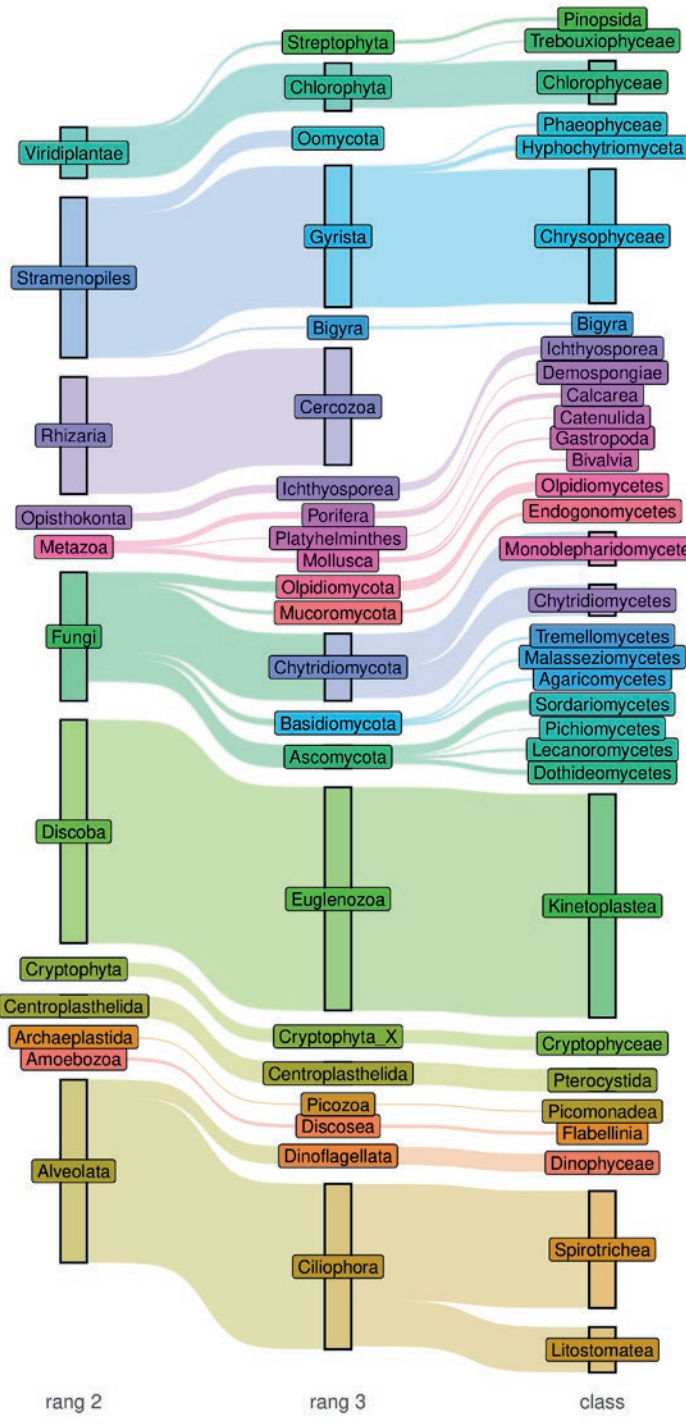


Figure 10 Identité, abondance et similarité des OTUs 28S de métazoaires avec les séquences de références

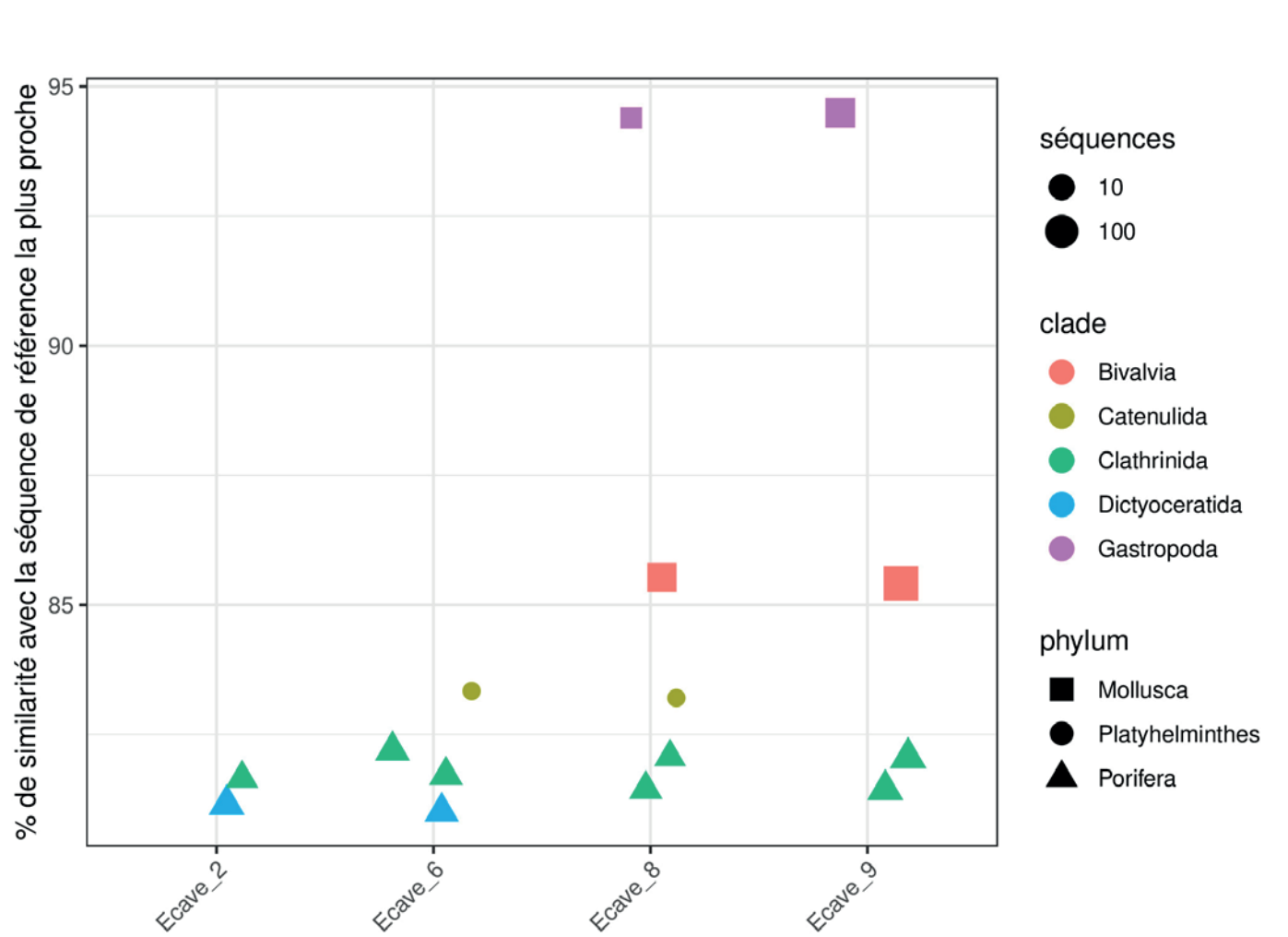
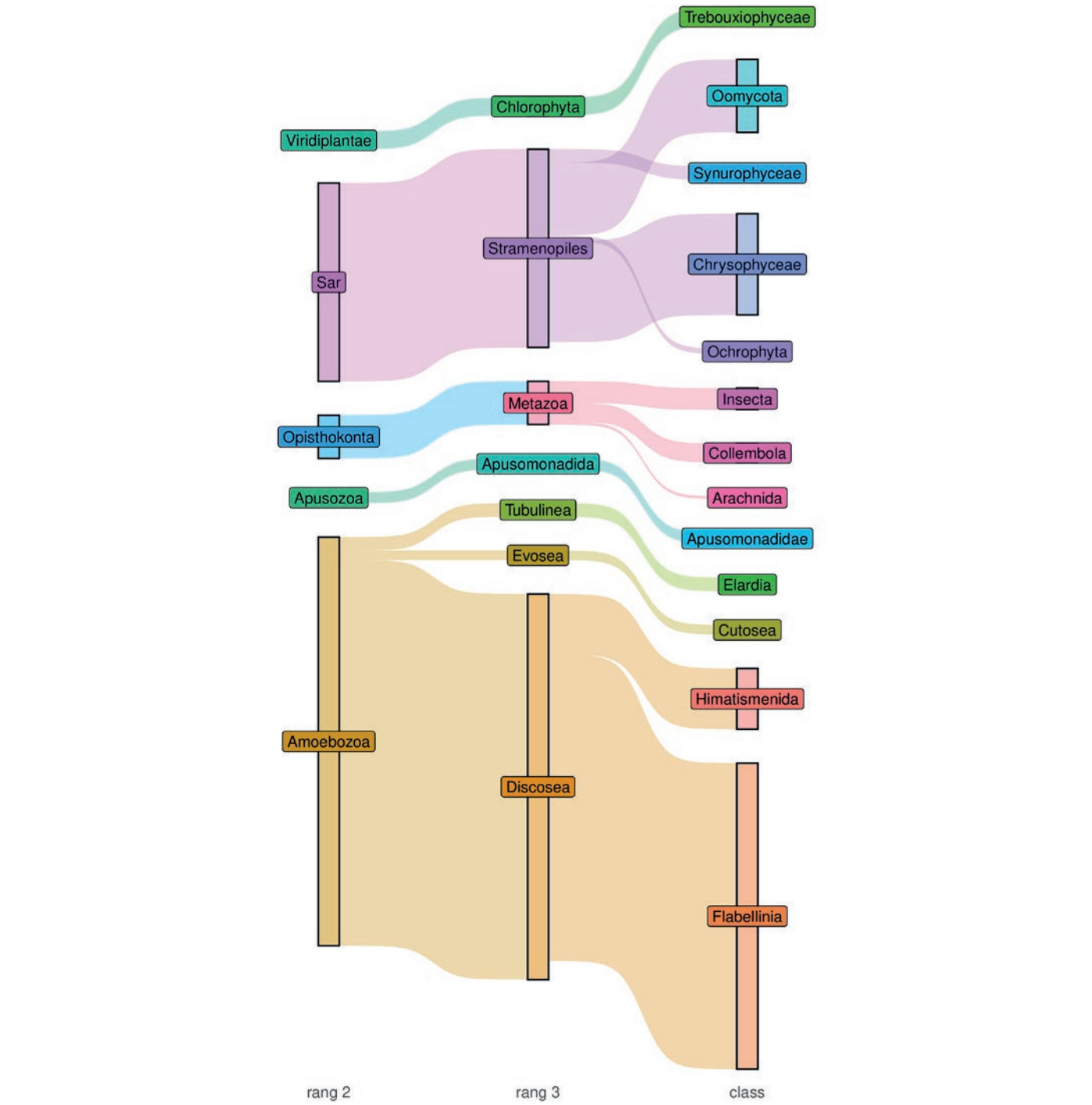


Figure 11 Composition taxonomique des OTUs COI avec une identification pour trois rangs taxonomiques. La hauteur des boîtes est proportionnelle au log du nombre de séquences.



5.3. Discussion

Malheureusement, l'approche *metabarcoding* basée sur les filtrats d'eau provenant de mares, gouilles et rivières souterraines ne permet pas encore de détecter de manière convaincante les organismes métazoaires cavernicoles. En effet, seulement 7 OTUs de métazoaires ont été détectés pour le 28S et 9 OTUs pour le COI, alors que plusieurs centaines étaient attendues. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat médiocre ; elles sont discutées ci-dessous, accompagnées de suggestions pour de futures études.

La raison la plus évidente est probablement la quantité trop faible d'ADN des organismes cibles dans ces échantillons, comparée à celle des autres eucaryotes (notamment les protistes et champignons). Cela est principalement dû aux difficultés d'échantillonnage dans les grottes et aux choix méthodologiques faits pour cette étude pilote. Préalablement, lors de tests préliminaires, nous avons constaté qu'une filtration manuelle à l'aide de seringues à usage unique n'était pas envisageable : les filtres se bouchaient rapidement à cause des particules fines présentes dans l'eau des gouilles. En conséquence, seuls quelques centaines de décilitres d'eau pouvaient être filtrés, et ce, au prix d'efforts considérables et en une heure. Nous avons donc opté pour une filtration en laboratoire à l'aide d'une pompe sous vide électrique, permettant de filtrer jusqu'à un litre sans effort physique et en une vingtaine de minutes par échantillon. Toutefois, certains échantillons n'ont permis de filtrer que 7 à 9 dl, en raison d'une

abondance excessive de particules fines. Afin d'optimiser le volume filtré, nous avons également introduit une pré-filtration à 10 µm pour éliminer un maximum de débris, en espérant que l'ADN libre de métazoaires serait suffisant pour détecter ces organismes. Force est de constater que cette approche n'a pas été concluante. Il serait donc essentiel de trouver un moyen de filtrer de plus grands volumes tout en conservant les débris d'animaux, sans avoir à transporter de lourdes charges à travers les grottes, ce qui reste peu praticable.

Une autre explication possible réside dans la faible spécificité des amorces utilisées, qui ont été conçues dans l'objectif de couvrir un large spectre de métazoaires, sans chercher à limiter la coamplification de groupes externes tels que les protistes. Avec l'accumulation de nouvelles séquences pour ces deux marqueurs au cours de la dernière décennie, il serait pertinent de concevoir des amorces plus spécifiques à certains groupes afin d'obtenir une composition des communautés plus représentative des groupes cibles.

Enfin la question de la pertinence de l'utilisation de la technologie Nanopore, qui est encore une technologie vraiment récente, pour le *metabarcoding* reste à être démontrée. Elle offre une flexibilité accrue par rapport aux autres plateformes de séquençage (Illumina, PacBio), notamment grâce à la possibilité d'arrêter le séquençage une fois la profondeur de séquençage désirée atteinte. Ceci nous a ainsi permis de travailler avec de petites séries d'échantillons à moindre coût de manière satisfaisante. De nouveaux dé-

veloppements bio-informatiques ont dû être réalisés spécifiquement pour ce projet. Toutefois, en l'absence d'échantillons de contrôle provenant de grottes permettant de valider l'obtention des séquences attendues, il reste difficile d'évaluer précisément la qualité de notre approche. La création d'une communauté artificielle, en plaçant différents spécimens cavernicoles (par exemple des *Niphargus*) dans un volume réduit d'eau pendant quelques heures, ou en mélangeant différent ADN obtenus durant la phase de *barcoding*, permettrait de vérifier la précision de l'assemblage des séquences en OTUs. Néanmoins, le fait que de nombreuses séquences 28S représentatives d'OTUs de protistes et champignons soient très similaires à des séquences de référence présentes dans les bases de données (>98% de similarité) suggère que la méthode produit des séquences avec peu d'erreurs et valide en partie sa pertinence.

5.4. Conclusion metabarcoding

L'approche *metabarcoding*, telle que décrite dans cette étude, n'est pas encore adaptée au suivi des organismes métazoaires des grottes. Des développements méthodologiques sont encore nécessaires pour son application, notamment l'utilisation d'amorces PCR plus spécifiques afin d'exclure les organismes eucaryotes non-cibles. Le prélèvement d'un plus grand volume d'eau ainsi que l'utilisation d'échantillons de sédiments devraient permettre d'obtenir un aperçu plus précis de la diversité des communautés présentes, ce qui constituerait un atout majeur pour mieux comprendre l'écologie des organismes cavernicoles.

6. Conclusions générales

Ce rapport met en lumière le manque de connaissances biospéléologiques en Suisse et, en particulier, par rapport à ses voisins. Autrefois pionnière et active dans ce domaine, la biospéléologie helvétique s'est presque complètement arrêtée. La pratique bénévole de quelques passionnés ne remplacera jamais de véritables programmes de recherche, monitoring, et protection des populations. Les conséquences de ce manque sont multiples. Premièrement cela aboutit en une très faible représentation du milieu souterrain dans les listes nationales, que soit les listes rouges, la liste des espèces endémiques ou la liste des espèces prioritaires. De plus, le manque d'experts rend compliqué les identifications des espèces connues et la description de nouvelles espèces. Cela limite aussi les méthodes moléculaires, qui ne disposent pas de suffisamment d'informations à l'heure actuelle pour être efficaces. En effet, les séquences ADN ne peuvent être utilisées pour du monitoring (ADN environnemental) que si l'on dispose d'une base de données complète. Pour compléter une telle base de données il faut pouvoir identifier et décrire morphologiquement les espèces afin d'avoir des informations utilisables. De plus, la méthodologie pour les analyses *metabarcoding* doivent être adaptées aux conditions des grottes, avant de pouvoir être applicables pour ce milieu. Néanmoins, cette étude pilote a démontré qu'il y avait du potentiel pour ces méthodes, laissant entrevoir des applications concrètes une fois que les lacunes mentionnées seront comblées.

Parmi les études possibles pour améliorer les connaissances du milieu souterrain helvétique on peut notamment proposer:

- *Synthèse bibliographique sur la biospéléologie.* Une telle synthèse permettrait d'avoir un aperçu complet de la recherche en biologie souterraine et cibler les lacunes méritant d'être comblées.
- *Amélioration des connaissances génétique des espèces cavernicoles suisses.* Comblar les lacunes actuelles pour permettre une utilisation plus fiable des méthodes de *metabarcoding*.
- *Monitoring national des espèces cavernicoles.* Cela permettrait un suivi des populations, d'améliorer les connaissances taxonomiques et les descriptions des espèces et, le cas échéant, les inscrire sur les listes rouges, endémiques ou prioritaires.
- *Méthode de classification des biotopes souterrains.* Développer une méthode pour classer les biotopes souterrains, selon les espèces qui y habitent, les conditions physicochimiques, morphologiques, climatiques, etc.
- *Etude de l'impact de forçages externes sur le milieu cavernicole.* Mesurer l'impact du réchauffement climatique et des perturbations d'origine anthropique sur les biotopes souterrains et plus particulièrement sur la biocénose qui la fréquente.

7. Remerciements

Nous tenons à remercier les personnes suivantes pour leur contribution dans le cadre de ce projet pilote : Alberto Sendra (conseil municipal de Valence), Cyrille d'Haese (Muséum national d'Histoire naturelle de Paris), Gilles Blandenier (Haute École Pédagogique BEJUNE), Jessica Litman (Muséum d'histoire naturelle de Neuchâtel), Loïc Bulliard (Horizon a), Marion Podolak (Muséum cantonal des sciences naturelles de l'Etat de Vaud), Michel Blant (Institut Suisse de Spéléologie et Karstologie), Miguel Borreguero (Société Suisse de Spéléologie), Nadir Alvarez (Muséum cantonal des sciences naturelles de l'Etat de Vaud), Sylvain Lanz (Horizon a), Valentin Moser (Société Suisse de Spéléologie), Yannick Chittaro (Info Fauna).

8. Bibliographie

Aellen, V., Strinati, P., 1962. Nouveaux matériaux pour la faune cavernicole de la Suisse. *Revue suisse de zoologie* 69 (2), 25–66.

Altermatt, F., et al., 2014. Diversity and Distribution of Freshwater Amphipod Species in Switzerland (Crustacea : Amphipoda). *PLoS ONE* 9(10), e110328. doi:10.1371/journal.pone.0110328 10.

Audétat, M., Heiss, G., Christen, D., Deriaz, P., Heiss, C., Lüscher, M., Morel, P., Perrin, J., Wittwer, M., 2002. Inventaire spéléologique de la Suisse, Tome IV, inventaire du Jura Vaudois, partie ouest. Commission de Spéléologie de l'Académie Suisse des Sciences Naturelles, La Chaux de Fonds.

Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2012. GenBank. *Nucleic Acids Research* 41, D36–D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>

Bernasconi, R., 2010. Les karsts et la faune cavernicole de Suisse. *Stalactite* 60, 53–71.

Bernasconi, R., 1994. Suisse (Schweiz/Svizzera), in: Juberthie, C., Decu, V. (Eds.), *Encyclopaedia Biospeologica*. pp. 809–818.

Bernasconi, R., 1967. Biospéléologie et faune des grottes suisses (dans numéro spécial «Spé-léo» 67). *Cavernes* 11, 26–29.

Bitterli, T., 1996. *Speläologisches Inventar der Schweiz*, Band III, Höhlen der Region Basel-Laufen.

Blant, D., 2024. *Projet RPT 2020-2024 Biodiversité dans le karst (no SAP 131) - rapport final*. ISSKA.

Blant, J.-D., 1995. *Les chauves-souris du canton de Neuchâtel*, Editions de la Giraffe. ed, Cahiers du MHN.

Chittaro, Y., Hoess, R., Huber, C., Luka, H., Marggi, W., Szallies, A., Gonseth, Y., 2024. *Liste rouge des Carabidés. Espèces menacées en Suisse*, Environnement pratique UV. Office fédéral de l'environnement OFEV, info fauna, Berne.

Deriaz, P., Bourret, F., Jeannin, P., Lalou, J., Lambelet, J., Pauli, C., Spring, D., Thévoz, D., 2007. *Inventaire spéléologique du Nord vaudois*, Inventaire spéléologique de la Suisse. Commission de Spéléologie de l'Académie suisse des Sciences naturelles, La Chaux-de-Fonds.

Dethier, M., Rochez, G., 2022. *Biospéologie - Initiation à l'étude de la faune cavernicole de Belgique*, MASEPAS. ed. Namur, Belgique.

Eddy, S.R., 2011. Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput Biol* 7, e1002195. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195>

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>

Ferreira, R., Pellegrini, T., 2019. Species-area model predicting diversity loss in an artificially flooded cave in Brazil. *International Journal of Speleology* 48. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.48.2.2244>

Ferreira, R.L., 2019. Guano communities, in: *Encyclopedia of Caves*. Elsevier, pp. 474–484. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814124-3.00057-1>

Filipponi, M., Parriaux, A., Schmassmann, S., Jeannin, P.Y., 2012. *KarstALEA: Wegleitung zur Prognose von karstspezifischen Gefahren im Untertagbau*. Bundesamt für Strassen ASTRA / Schweizerischer Verband der Strassen- und Verkehrsfachleute VSS, Zürich, Schweiz.

Fišer, C., Alther, R., Zakšek, V., Borko, S., Fuchs, A., Altermatt, F., 2018. Translating Niphargus bar-codes from Switzerland into taxonomy with a description of two new species (Amphipoda, Niphargidae). *Zookeys* 113–141. <https://doi.org/10.3897/zookeys.760.24978>

Fišer, C., Konec, M., Alther, R., Švara, V., Altermatt, F., 2017. Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of Niphargus (Amphipoda: Crustacea) in the Hölloch cave system (Switzerland). *Systematics and Biodiversity* 15, 218–237.

Folegana, L.B., 2018. *A catalogue of the fauna in natural and artificial caves of Italy*.

Gattlen, N., Klaus, G., 2023. *Biodiversité en Suisse - État et évolution, État de l'environnement*. Office fédéral de l'environnement OFEV.

Gigon, R., 1976. *Inventaire spéléologique de la Suisse, Tome I, Canton de Neuchâtel*. Commission de Spéléologie de la société helvétique des Sciences naturelles, Neuchâtel, Bibliothèque de l'ISSKA.

Gigon, R., Wenger, R., 1986. *Inventaire spéléologique de la Suisse, Tome II, Canton du Jura*. Schweizerische Akademie der Naturwissenschaften, Porrentruy.

Gilbert, H., Keany, J., Culver, D.C., 2018. Response of shallow subterranean freshwater amphipods to habitat drying. *SB* 28, 15–28. <https://doi.org/10.3897/subtbiol.28.30700>

Ginet, R., Decou, V., 1977. *Initiation à la biologie et à l'écologie souterraines*, Jean-Pierre Delarge. ed.

Graening, G.O., Brown, A.V., 2003. Ecosystem dynamics and pollution effects in an ozark cave stream. *J American Water Resour Assoc* 39, 1497–1507. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2003.tb04434.x>

Gunn, J., 2004. *Encyclopedia of caves and karst science*. Routledge.

Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 968–971. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510466103>

Jeannin, P.Y., Malard, A., Rickerl, D., Weber, E., 2015. Assessing karst-hydraulic hazards in tunneling - the Brunnmühle spring system - Bernese Jura, Switzerland. *Environmental Earth Sciences* 74(12), 7655–7670.

Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improve-ments in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* 30, 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Klaus, G., Cordillot, F., Künzle, I., 2023. Espèces et milieux menacés en Suisse, État de l'environnement. Office fédéral de l'environnement OFEV, Berne.

Lana, E., Balestra, V., 2024. Biospeleologia - Guida alle tecniche di ricerca e atlante fotografico, WBA hansbooks 12. ed. Verona (I).

Leray, M., Knowlton, N., Machida, R.J., 2022. MIDORI2: A collection of quality controlled, preformat-ted, and regularly updated reference databases for taxonomic assignment of eukaryotic mi-tochondrial sequences. *Environmental DNA* 4, 894–907. <https://doi.org/10.1002/edn3.303>

Lismonde, 2002. Climatologie du monde souterrain. Tome 2: Aérologie des Systèmes Karstiques. Comité Départemental de Spéléologie de l'Isère.

Machida, R.J., Knowlton, N., 2012. PCR Primers for Metazoan Nuclear 18S and 28S Ribosomal DNA Sequences. *PLoS ONE* 7, e46180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046180>

Mahnert, V., 2011. Pseudoblothrus infernus sp. n. (Pseudoscorpiones, Syarinidae) from the Hölloch cave (Schwyz, Switzerland), with new records of Pseudoblothrus strinatii Vachon from Switzerland and France. *Revue suisse de zoologie* 118, 11–15.

Maire, F., Bélet, S., Boillat, T., Chopard, C., Christ, M., Frésard, J., Guenot, P., Ioset, C., Jeannin, P.-Y., Joye, S., Kunz, C., Lab, D., Lachat, R., Linder, D., Maire, M., Maire, O., Staehelin, L., Uldry, V., We-ber, E., 2022. Inventaire spéléologique de la Suisse, Tome VI, Jura bernois, Commission de spéléologie de l'Académie suisse des Sciences naturelles. ed. La Chaux-de-Fonds.

Malard, A., Sinreich, M., Jeannin, P.-Y., 2016. A novel approach for estimating karst groundwater re-charge in mountainous regions and its application in Switzerland. *Hydrological Processes* 30(13), 2153–2166.

Manfredi, P., 1957. Due nuovi Diplpodi cavernicoli della Svizzera. *Bulletin de la Société entomologique suisse* 30, 161–164.

Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j.* 17, 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

Moeschler, P., 1985. Un nouveau regard sur la faune des eaux souterraines karstiques du

Jura suisse. Actes de la Société jurassienne d'émulation: 311-332.

Moeschler, P., Rouch, R., 1988. Découverte d'un nouveau représentant de la famille des Gelyellidae (Copepoda, Harpacticoida) dans les eaux souterraines de Suisse. *Crustaceana*, Leiden 55, 1–16.

OFEV (Ed.), 2021. Infrastructure écologique. Guide de travail pour la planification cantonale dans le cadre de la période de convention-programme 2020-2024.

OFEV (Ed.), 2019. Liste des espèces et des milieux prioritaires au niveau national. Espèces et milieux prioritaires pour la conservation en Suisse, L'environnement pratique. Office fédéral de l'environnement OFEV, Berne.

OFEV (Ed.), 2017. Plan d'action du Conseil fédéral 2017 : Plan d'action Stratégie Biodiversité Suisse. Office fédéral de l'environnement OFEV.

OFEV (Ed.), 2012. Stratégie Biodiversité Suisse, Les miscellanées de l'environnement. Office fédéral de l'environnement OFEV (éd.). Berne.

Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Mächler, E., Altermatt, F., 2020. Environmental DNA applications for biomonitoring and bioassessment in aquatic ecosystems. <https://doi.org/10.5167/UZH-187800>

Reinhard, M., Güler, A., Schürch, M., Sinreich, M., Zimmermann, S., Kunz, M., 2019. État et évolution des eaux souterraines en Suisse.

Résultats de l'Observation nationale des eaux souterraines NAQUA, état 2016 (No. 1901), Etat de l'environnement. Office fédéral de l'environnement, Berne.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

Rüetschi, J., Stucki, P., Müller, P., Vicentini, H., Claude, F., 2012. Liste rouge Mollusques (gastéropodes et bivalves). Espèces menacées en Suisse, état 2010., L'environnement pratique. Office fédéral de l'environnement OFEV, Centre suisse de cartographie de la faune CSCF.

Sedaghatkish, A., Pastore, C., Doumenc, F., Jeannin, P.-Y., Luetscher, M., 2024. Thermal Modeling of a Ventilated Cave. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4998824>

Sket, B., 2008. Can we agree on an ecological classification of subterranean animals? *Journal of Natural History* 42, 1549–1563. <https://doi.org/10.1080/00222930801995762>

Sluys, Ronald, 2012. A new, sibling species of cave flatworm from Switzerland (Platyhelminthes, Tricladida, Dendrocoelidae). *Revue suisse de zoologie* 119, 181–188. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.150024>.

Strinati, P., 1966. Faune cavernicole de la Suisse (Centre national de recherche scientifique). Faculté des Sciences de Toulouse, Toulouse.

.....

Tschudin, P., Eggenberg, S., Fivaz, F., Jutzi, M., Sanchez, A., Schnyder, N., Senn-Irlet, B., Gonseth, Y., 2017. Endemiten der Schweiz – Methode und Liste 2017. Bundesamts für Umwelt (BAFU), Bern.

Vaser, R., Sović, I., Nagarajan, N., Šikić, M., 2017. Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Res.* 27, 737–746. <https://doi.org/10.1101/gr.214270.116>

Wood, P.J., Gunn, J., Rundle, S.D., 2008. Response of benthic cave invertebrates to organic pollution events. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 18, 909–922. <https://doi.org/10.1002/aqc.933>

Zaenker, S., 2016. Vorschlag für ein neues Bewertungsverfahren des Lebensraumtyps 8310 (Nicht touristisch erschlossene Höhlen) im Rahmen der europäischen FFH-Richtlinie.

Zaenker, S., Bogon, K., Weigand, A., 2020. Die Höhlentiere Deutschlands. Verlag Wiebelsheim.

.....

Annexes

- Annexe 1** *Listes des espèces terrestres cavernicoles. Les espèces endémiques sont indiquées par «e» dans la colonne «Endémisme».*
- Annexe 2** *Liste des espèces cavernicoles aquatiques. Les espèces endémiques sont indiquées par «e» dans la colonne «Endémisme».*
- Annexe 3** *Liste des spécimens pour lesquels les personnes ayant récolté et déterminé sont connues, ainsi que leur classification taxonomique au niveau le plus précis atteint.*
- Annexe 4** *Cave project, portfolio of specimens.*

Les annexes peuvent être consultées en ligne aux adresses suivantes :

- Annexe 1 : [https://www.isska.ch/pdf/Fr/Competences/Annexes Biodiv OFEV 2025/Annexe1 cav ter.pdf](https://www.isska.ch/pdf/Fr/Competences/Annexes_Biodiv_OFEV_2025/Annexe1_cav_ter.pdf)
- Annexe 2 : [https://www.isska.ch/pdf/Fr/Competences/Annexes Biodiv OFEV 2025/Annexe2 cav aqu.pdf](https://www.isska.ch/pdf/Fr/Competences/Annexes_Biodiv_OFEV_2025/Annexe2_cav_aqu.pdf)
- Annexe 3 : [https://www.isska.ch/pdf/Fr/Competences/Annexes Biodiv OFEV 2025/Annexe3 col id.pdf](https://www.isska.ch/pdf/Fr/Competences/Annexes_Biodiv_OFEV_2025/Annexe3_col_id.pdf)
- Annexe 4 : [https://www.isska.ch/pdf/Fr/Competences/Annexes Biodiv OFEV 2025/Annexe4 Portfolio.pdf](https://www.isska.ch/pdf/Fr/Competences/Annexes_Biodiv_OFEV_2025/Annexe4_Portfolio.pdf)