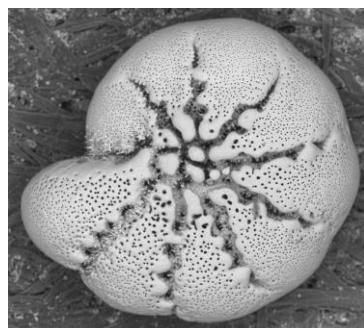


Comparaison entre l'ADNe et la morphologie en zone intertidale de la Manche, des îles de Ré et d'Oléron



Rapport de stage de Master 1 BEE

Parcours : Mer Anthropisation Diagnostic

Université d'Angers

Faculté des Sciences

2 Boulevard Lavoisier
49045 Angers Cedex

Type de stage : Stage scientifique avec
obtention et traitement des résultats

Master 1

Biodiversité Ecologie Evolution

Parcours Mer Anthropisation Diagnostic

Laboratoire de Planétologie et Géosciences

Maître de stage :

Antoine Thomas

Magali Schweizer

Année universitaire 2022/2023

Comparaison entre l'ADNe et la morphologie en zone intertidale de la Manche, des îles de Ré et d'Oléron

Résumé

La diversité des foraminifères est très étudiée car elle permet une compréhension de l'état écologique des milieux étudiés. Cependant, bien que la diversité dans certaines zones comme les zones intertidales sont grandes, les études génétiques démontrent des divergences chez certains genres répandus comme les Ammonia ou les Elphidium. Pour faciliter l'étude de diversité des milieux et l'observation des nombreuses espèces dans ces milieux, la génétique peut être une solution adéquate. De nouvelles techniques font leur apparition comme l'étude de l'ADN environnemental. Cette technique favoriserait l'inventorisation des milieux de vie des foraminifères. Cependant, beaucoup de facteurs sont à prendre en compte qui pourrait corrompre les données obtenues avec l'ADN environnemental. C'est pourquoi, une comparaison avec la morphologie observée à la loupe binoculaire permettrait de vérifier les données obtenues avec ces deux techniques différentes.

Abstract

The diversity of foraminifera is widely studied because it allows an understanding of the ecological state of the environments studied. However, although the diversity in certain areas such as the intertidal zones is great, genetic studies show divergences in certain widespread genera such as Ammonia or Elphidium. To facilitate the study of the diversity of environments and the observation of the many species in these environments, genetics can be an adequate solution. New techniques are emerging, such as the study of environmental DNA. This technique would promote the inventorying of the living environments of foraminifera. However, there are many factors to consider that could corrupt the data obtained with environmental DNA. This is why a comparison with the morphology observed with a binocular magnifying glass would make it possible to verify the data obtained with these two different techniques.

Remerciements

Je voudrais avant tout remercier Magali Schweizer pour sa présence, son aide et sa patience tout au long du stage qui m'a permis de pouvoir avancer sereinement et de travailler en toute confiance. Je voudrais aussi remercier Sophie Sanchez et Damien Le Moigne pour l'apprentissage qu'ils ont fourni à tous les stagiaires et moi-même sur les différentes techniques et appareils utilisées et à leur disponibilité pendant toute la durée du stage. Enfin, j'aimerai remercier le LPG (Laboratoire de Planétologie et Géosciences) pour son accueil et l'INRAE (Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement) pour la visite guidée de leurs laboratoires.

Sommaire

INTRODUCTION.....	p.1
MATERIELS ET METHODES.....	p.2
RESULTATS.....	p.3
INTERPRETATION.....	p.5

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Carte de la localisation des sites de prélèvement (p. 2)

Figure 2 : Histogramme groupé du nombre d'individus par cm³ regroupés par ordre pour chaque site (p. 4)

Figure 3 : Histogramme groupé du nombre de séquences ADNe regroupées par ordre pour chaque site (p. 4)

Figure 4 : Tableau des indices de Simpson calculés pour chaque site (p. 5)

Préambule

Le Laboratoire de Planétologie et Géosciences (LPG) est une unité mixte de recherche du CNRS qui se découpe sur plusieurs sites dont la faculté des sciences d'Angers. Bien que plusieurs thèmes soient traités par le LPG, seuls deux sont abordés par le LPG sur Angers : les systèmes marins en transition et la planète Terre. Ce stage s'inscrit dans l'ancien projet de FORESTAT. Ce projet a pour but d'étudier les milieux intertidaux et de recenser la diversité de ces milieux chez les foraminifères. Les échantillons ont été prélevés par Vincent Bouchet en 2015.

Ce stage utilise une technique toujours en développement actuellement. Cette technique de l'ADNe reste toute nouvelle et doit être améliorée pour faciliter le travail de recensement d'individu dans un milieu donné par exemple. Le problème de cette technique reste comme pour beaucoup le manque de moyens matériels et financiers. La visite des laboratoires de l'INRAE d'Angers l'a très bien démontrée. Le coût des machines et des kits d'extraction ne permet pas une utilisation abondante. L'amélioration et le développement de cette technique est donc très intéressante pour le futur.

1. INTRODUCTION

Les foraminifères sont des micro-organismes très utilisés aujourd’hui pour l’étude de leur milieu de vie. Ces micro-organismes permettent de connaître l’état écologique ancien mais aussi actuel de ces milieux. La diversité et les connaissances écologiques pour chaque espèce connue sont très importantes et permettent un apport de connaissance spécifique qui peut être utilisé comme marqueur écologique de pollution par exemple. Les zones étudiées dans ce rapport sont les zones intertidales qui sont très connues grâce à de nombreuses études ces dernières années sur le sujet (Fouet et al., 2022 et Murray, J.W., 2006 et Marie, F., 2022). La difficulté actuelle est la reconnaissance des espèces d’un point de vue morphologique. L’ADN environnemental (ADNe) est une technique novatrice qui permet de détecter un grand nombre de séquences ADN dans les sédiments récoltés d’un milieu. Bien que beaucoup de difficultés sont rencontrées lors des différentes étapes de manipulation, cette technique peut permettre une grande avancé dans l’inventaire des milieux de vie des foraminifères.

La Manche et la façade Atlantique française comme l’île de Ré et l’île d’Oléron, sont très étudiées. Leur diversité est considérée comme plutôt complète (Bouchet et al., 2021). Ces deux zones en France sont donc favorables à l’utilisation et à l’expérimentation de l’ADNe car il est plus facile de déterminer et d’interpréter les résultats de cette technique nouvelle. A l’aide de l’ADNe, il peut être plus facile de découvrir de nouvelles espèces chez certains genres censés être connu comme les Ammonia. Certaines études ont présenté la diversité chez les Ammonia ou les Elphidium et la difficulté de déterminer chaque espèce morphologiquement mais aussi génétiquement parlant (Bird et al., 2020 et Darling et al., 2016). L’ADNe est un grand outil pour observer les diversités de zones connues ou non. Il reste cependant important de garder une comparaison morphologique pour assimiler si possible des séquences ADNe nouvelles à des individus observés dans ces milieux (Brinkmann et al., 2023).

Le but de ce stage est d’expérimenter cette technique novatrice, en comparant la morphologie des foraminifères retrouvés dans un milieu intertidal avec les séquences ADNe retrouvées dans ce même milieu. Les différences observées entre ces deux techniques d’inventaire et d’observation de la diversité du milieu, peuvent permettre une amélioration de la technique d’ADNe mais aussi de découvrir des espèces non-observées à la loupe binoculaire qui sont pourtant présentes dans le milieu. Les défauts possibles lors des différentes étapes de manipulation pourront eux aussi être déterminés et améliorés. Pour faciliter la comparaison, les milieux étudiés seront des milieux dont la diversité est connue comme la Manche et la façade Atlantique avec l’île de Ré et l’île d’Oléron. Il sera plus facile d’expliquer la présence ou non de certaines espèces de foraminifères lors de la détection de séquences ADNe.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Sites d'échantillonnage

Quatorze échantillons ont été prélevés sur différents sites près de la Manche et près de l'île de Ré et l'île d'Oléron (Fig. 1). Ces échantillons ont été colorés au rose bengal (Schönenfeld et al., 2012) qui permet de marquer les cellules vivantes et donc de différencier plus tard les foraminifères vivants des morts. La plupart des sites échantillonnés sont des milieux intertidaux de type vasière à l'exception du site Rivedoux sable qui est un milieu sableux. Certains échantillons ont été préservés en milieu humide mais d'autres ont été asséchés lors de la conservation en laboratoire. L'observation à la loupe binoculaire se fait en milieu humide ; tous les échantillons ont donc été réhumidifiés. Pour les sites de la Manche, deux réplicats ont été réalisés ont été examinés, alors qu'un seul l'a été pour la façade Atlantique.

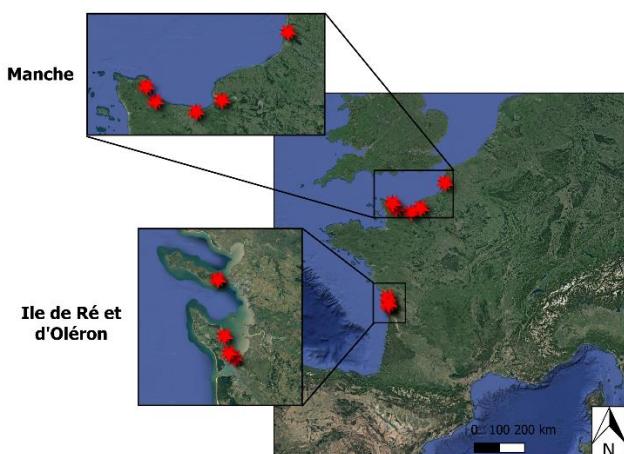


Figure 1 : Localisation des sites de prélèvement

2.2 Préparation des échantillons et piquage

Les échantillons subissent plusieurs étapes de préparation avant d'être observés à la loupe binoculaire. Ils sont d'abord lavés et séparés en plusieurs piluliers pour ne garder que les sédiments et matière organique d'une taille de 315µm, 100µm et 63µm (le pilulier de 63µm ne sera pas observé dans notre étude). Le tamis de 100µm permet de récupérer plus d'individus détectés par l'ADNe au contraire du tamis de 125µm. Pour certains échantillons dont le sédiment et la matière organique sont en nombre, la technique du split est utilisée. Elle consiste à séparer en fractions notre échantillon. En se basant sur les statistiques, et après avoir obtenu suffisamment d'individus, il est possible d'estimer la population totale de l'échantillon étudié. Pour d'autres échantillons où il a été rapidement observé qu'il y avait une faible présence de matière organique, la technique du SPT, sodium polytungstate (Parent et al., 2018), permet de séparer ce peu de matière organique du surplus de sédiment. Après avoir préparé tous les échantillons, les tailles 315µm et 100µm sont observées et piquées. Pour les piluliers obtenus après le split, la fraction où il a été estimé à la loupe binoculaire qu'il y avait 300 individus au minimum, sera la seule observée et piquée. Si ce nombre de 300 n'est pas atteint, les fractions en dessous sont elles aussi observées et piquées. Le piquage consiste à ne récupérer que les foraminifères vivants, donc roses, du reste de l'échantillon. Ces

foraminifères sont triés, identifiés et comptés pour pouvoir les comparer aux résultats de l'ADNe.

2.3 ADN environnemental (ADNe) et traitements des séquences

Du sédiment est prélevé sur les différents sites de la Manche et des îles de Ré et d'Oléron. Ce sédiment est traité de façon à récupérer le maximum d'ADNe. Après des étapes d'extraction de l'ADN et de PCR, les fragments d'ADN sont séquencés. Après avoir obtenu des séquences d'ADNe pour chaque site, ces dernières sont triées et traitées sur le logiciel Rstudio v4.2.2 puis sont comparées à la base de données génétiques Silva (Silva_SSU_r138_2019) (Murali et al., 2018) pour obtenir nos ASVs (Amplicon sequence variant). Un dernier traitement est réalisé sur excel v2304 pour éliminer les ASV contaminés au-dessus de 10%, dont la séquence est trop courte c'est-à-dire moins de 10 reads, ou qui n'ont pas de résultat d'identification pour le phylum des foraminifères. Pour vérifier l'identification des taxons qui ne sont pas attribués, il est possible de passer l'ASV correspondant sur le site BLAST pour comparer avec la base de données GenBank et vérifier la non-correspondance avec un foraminifère.

2.4 Comparaison morphologique et traitement statistique

Les données traitées d'ADNe et les résultats obtenus avec le piquage sont comparés entre eux en réunissant les individus par ordre. Etant difficile de réaliser une étude quantitative sur les données d'ADNe, une comparaison semi-quantitative et une comparaison qualitative seront réalisées entre les données d'ADNe et celles obtenues avec l'observation à la loupe binoculaire. En effet, les PCR favorisant les amplifications du plus grand nombre de séquences, les individus peu présents ou aux séquences trop courtes, ne seront pas amplifiés et ne seront donc pas détectés par cette technique. Le nombre des ASVs obtenus au final n'est donc pas représentatif quantitativement parlant. Il est quand même possible de réaliser une étude semi-quantitative bien que cela ne sera pas la base principale de la conclusion. En outre, il est tout à fait possible de comparer les deux techniques avec des données qualitatives. En plus de ces deux comparaisons, un indice de diversité de Simpson (Simpson, E.H., 1949) est calculé pour les résultats obtenus avec le piquage uniquement, pour chaque site. En effet, les données NA obtenues avec l'ADNe donneront un résultat inexploitable pour l'indice de Simpson, car ces données peuvent être n'importe quel individu. Cet indice permettra pour les données du piquage de connaître la dominance ou non d'une espèce, ou si toutes les espèces sont réparties équitablement.

3. RESULTATS

Lors de la récupération et la coloration des échantillons pour l'étude à la loupe binoculaire deux répliques sur deux sites différents, Authie et Estuaire Seine, ont eu un problème de coloration. Ces deux répliques ne seront pas utilisés pour les résultats de cette étude.

3.1 Comparaison semi-quantitative

Les résultats d'ADNe et de morphologie observée à la loupe binoculaire sont très différents. Trois groupes ressortent pour la morphologie de la loupe binoculaire tandis que quatre sont observés pour l'ADNe. Le groupe des « Tubothalamea » n'est pas présent dans l'analyse d'ADNe. La comparaison des séquences obtenues avec celles connues dans la base de données n'est pas encore parfaite ce qui explique l'apparition du groupe « NA » (fig. 3) qui rassemble toutes les données inconnues. Le groupe le plus présent dans les deux techniques est celui des « Globothalamea ». A 100% pour 6 sites sur 9 avec la morphologie et proche de

50% ou supérieur pour presque tous les sites avec l'ADNe à l'exception de Baie des Veys. L'ordre des Monothalamides est très présent sur la plupart des sites avec l'ADNe au contraire de la morphologie où il n'apparaît quasiment pas si ce n'est sur le site Baie des Veys. Enfin le dernier ordre connu, les Tubothalamea, sont présents dans 3 sites sur 9 pour la morphologie et n'ont pas été détectés avec l'ADNe. Pour le dernier groupe spécifique à l'ADNe, les données « NA » prennent une place importante dans le total des ASVs pour chaque site sauf pour Estuaire Seine et St Vaast. La comparaison quantitative est complexe car elle favorise les séquences ADN les plus en nombre lors des PCR ou qui ont plus facilement des affinités avec les amorces. Les résultats au niveau quantitatif sont donc à utiliser avec prudence.

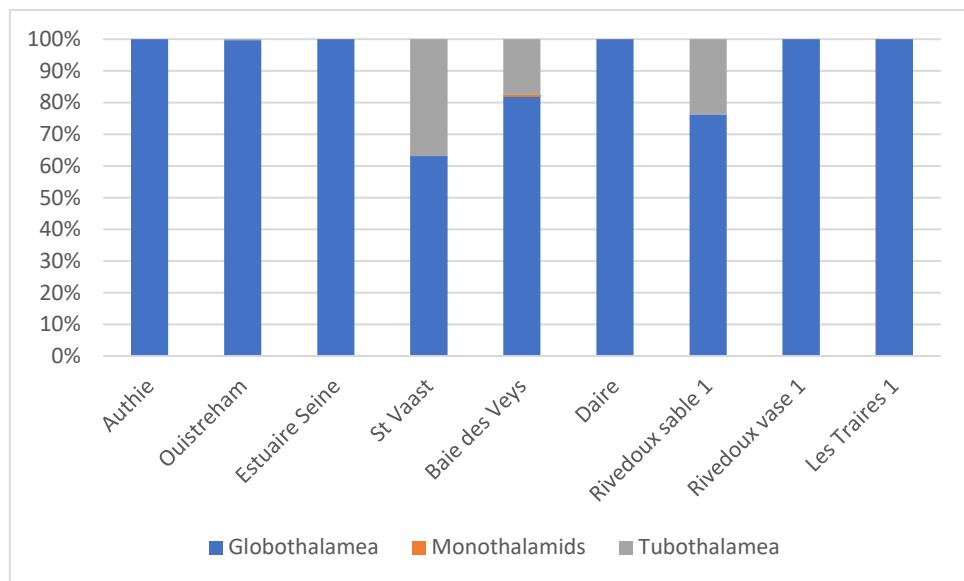


Figure 2 : Nombre d'individus par cm³ regroupés par ordre pour chaque site

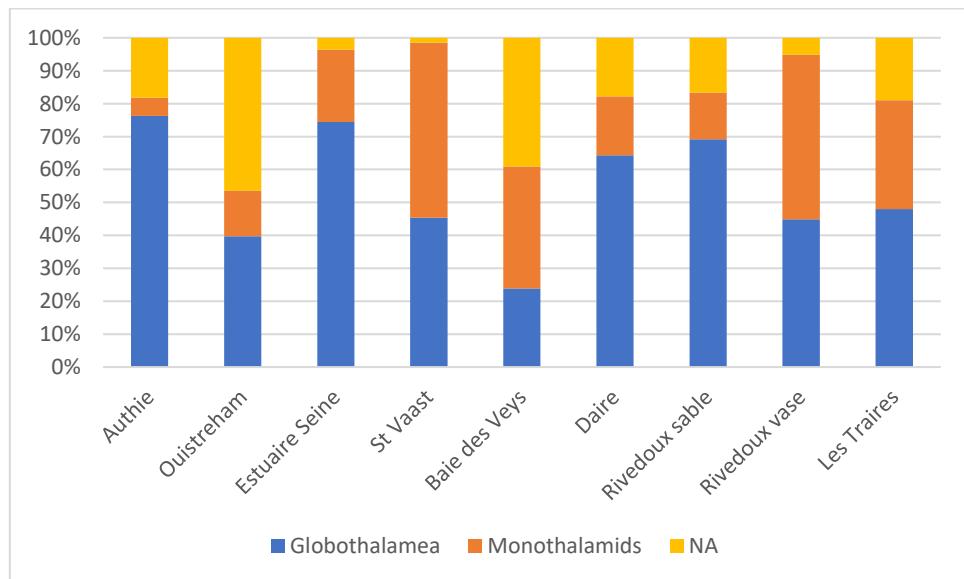


Figure 3 : Nombre de séquences ADNe avec des reads supérieur à 99 regroupées par ordre pour chaque site

3.2 Comparaison qualitative

Une comparaison est réalisée entre les espèces similaires entre les données d'ADNe et celles obtenues à la loupe binoculaire. Seules 5 espèces ressortent pour les deux techniques réunies. A titre de comparaison, il y a en tout 28 espèces différentes observées à la loupe binoculaire et bien plus détecté par l'ADNe. *Haynesina germanica* a été détectée sur les mêmes sites pour les deux techniques sauf pour la loupe binoculaire où cette espèce a été observée en plus sur le site Estuaire Seine en Manche. Pour *Haynesina depressula*, le seul site où elle a été vue à la loupe binoculaire n'a pas montré de détection d'une séquence ADN pour l'ADNe. Ensuite, les espèces d'*Ammonia* ont été détectées dans 4 sites sur 9 pour l'ADNe mais ont été observées sur chaque site pour la morphologie. L'espèce *Elphidium williamsoni* présente une présence similaire pour les deux techniques à l'exception du site Ouistreham sur lequel aucune séquence ADNe n'a été détectée. La dernière espèce, *Bolivina variabilis*, a été beaucoup détectée par l'ADNe dans 6 sites sur 9. Cependant, elle n'a été observée que sur 2 sites : Ouistreham et Baie des Veys, à la loupe binoculaire (Annexe 1 et 2).

3.3 Analyse statistique

L'indice de Simpson a été calculé avec les espèces observées à la loupe binoculaire. Cet indice est calculé pour chaque site (Fig. 4). On observe une dominance claire d'une espèce pour les sites d'Authie et de Rivedoux vase au vu de leur valeur proche de 0. Pour Les Triares, la dominance se fait moins forte pour une seule espèce. Pour les six autres sites, il n'y a ni dominance, ni répartition égale des espèces dans ces milieux car les valeurs de leurs indices sont proches de 0,5.

Figure 4 : Indices de Simpson calculés pour chaque site

Authie	Ouistreham	Estuaire Seine	St Vaast	Baie des Veys	Daire	Rivedoux sable	Rivedoux vase	Les Triares
0,0906	0,3536	0,6025	0,647	0,7647	0,6585	0,6484	0	0,2816

4. INTERPRETATION

Les espèces des *Tubothalamea* sont observables en nombre à la loupe binoculaire mais ne sont pas du tout détectées par l'ADNe. Cela peut être lié à l'affinité qu'ont ces espèces avec les amorces PCR mais aussi leur nombre et la facilité ou non de retrouver de leur séquence ADN dans le milieu. En revanche, certaines espèces comme *Bolivina variabilis* sont beaucoup détectées par l'ADNe et ne sont pas observées à la loupe binoculaire. Bien qu'un tamis de 100µm ait été utilisé, les petits foraminifères peuvent passer dans les mailles du tamis comme les espèces fines. Il est donc difficile de pouvoir récupérer toutes les espèces même avec un tamis de 100µm. Pour la comparaison qualitative, les raisons de la difficulté à retrouver les espèces observées à la loupe binoculaire dans les données d'ADNe sont les mêmes que pour la comparaison quantitative. Cependant, il a été démontré qu'une espèce très présente dans un milieu en nombre pouvait plus facilement être détectée par l'ADNe et ainsi correspondre à ce qui peut être observé à la loupe binoculaire comme le montre la présence d'*Haynesina germanica* ou de l'*Elphidium williamsoni*. En revanche pour *Ammonia* sp., la détection s'avère être plus complexe bien qu'il aurait fallu comparer leur nombre sur chaque site observé à la loupe binoculaire et observé leur détection ou non par l'ADNe.

Bibliographie

- Bird, C., Schweizer, M., Roberts, A., Austin, W. E., Knudsen, K. L., Evans, K. M., ... & Darling, K. F., 2020, The genetic diversity, morphology, biogeography, and taxonomic designations of Ammonia (Foraminifera) in the Northeast Atlantic. *Marine Micropaleontology*, 155, 101726, doi: 10.1016/j.marmicro.2019.02.001.
- Brinkmann, I., Schweizer, M., Singer, D., Quinchard, S., Barras, C., Bernhard, J. M., & Filipsson, H. L., 2023, Through the eDNA looking glass: Responses of fjord benthic foraminiferal communities to contrasting environmental conditions. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, e12975, doi: 10.1111/jeu.12975.
- Darling, K. F., Schweizer, M., Knudsen, K. L., Evans, K. M., Bird, C., Roberts, A., ... & Austin, W. E., 2016, The genetic diversity, phylogeography and morphology of Elphidiidae (Foraminifera) in the Northeast Atlantic. *Marine Micropaleontology*, 129, 1-23, doi: 10.1016/j.marmicro.2016.09.001.
- Fouet, M., 2022, Répartition des communautés de foraminifères dans les estuaires de la façade atlantique. Thèse Doctorale, Université d'Angers France, 270 p.
- Fouet, M. P., Singer, D., Coynel, A., Héliot, S., Howa, H., Lalande, J., Mouret, A., Schweizer, M., Tcherkez, G., Jorissen, F. J., 2022, Foraminiferal Distribution in Two Estuarine Intertidal Mudflats of the French Atlantic Coast: Testing the Marine Influence Index. *Water*, 14(4), 645, doi: 10.3390/w14040645.
- Murali, A., Bhargava, A., & Wright, E. S., 2018, IDTAXA: a novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome*, 6(1), 1-14, doi: 10.1186/s40168-018-0521-5.
- Murray, J. W., 2006. Ecology and applications of benthic foraminifera, Cambridge university press, 438 p.
- Parent, B., Barras, C., and Jorissen, F., 2018, An optimised method to concentrate living (Rose Bengal-stained) benthic foraminifera from sandy sediments by high density liquids: *Marine Micropaleontology*, v. 144, p. 1–13, doi: 10.1016/j.marmicro.2018.07.003.
- Schönenfeld, J., Alve, E., Geslin, E., Jorissen, F., Korsun, S., & Spezzaferri, S., 2012, The FOBIMO (FOraminiferal Blo-Monitoring) initiative—Towards a standardised protocol for soft-bottom benthic foraminiferal monitoring studies. *Marine Micropaleontology*, 94, 1-13, doi : 10.1016/j.marmicro.2012.06.001.
- Simpson, E. H., 1949, Measurement of diversity. *nature*, 163(4148), 688-688, doi: /10.1038/163688a0.
- Vincent M.P. Bouchet, Fabrizio Frontalini, Fabio Francescangeli, Pierre-Guy Sauriau, Emmanuelle Geslin, Maria Virginia Alves Martins, Ahuva Almogi-Labin, Simona Avnaim-Katav, Letizia Di Bella, Alejandro Cearreta, Rodolfo Coccioni, Ashleigh Costelloe, Margarita D. Dimiza, Luciana Ferraro, Kristin Haynert, Michael Martínez-Colón, Romana Melis, Magali Schweizer, Maria V. Triantaphyllou, Akira Tsujimoto, Brent Wilson, Eric Armynot du Châtelet, 2021, Indicative value of benthic foraminifera for biomonitoring: Assignment to ecological groups of sensitivity to total organic carbon of species from European intertidal areas and transitional waters, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 164, 112071, ISSN 0025-326X, doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.112071.

ANNEXES

Annexe 1 : Espèces observées à la loupe binoculaire, présentes (1) ou non (0) sur chaque site (la coloration représente les espèces similaires avec l'ADNe)

	Authie	Ouistreham	Estuaire Seine	St Vaast	Baie des Veys	Daire	Rivedoux sable	Rivedoux vase	Les Triares
Haynesina sp.	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Haynesina germanica	1	1	1	1	1	0	1	0	0
Haynesina depressula	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Haynesina sp. siamoise	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Ammonia sp.	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ammonia sp. siamoise	1	0	0	1	0	0	0	0	1
Elphidium sp.	0	1	0	1	1	1	1	0	0
Elphidium sp. siamoise	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Elphidium accumatum	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Elphidium williamsoni	1	1	0	1	0	0	0	0	0
Elphidium lidoense	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Elphidium selseyense	0	1	1	1	1	0	1	0	0
Elphidium gerthi	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Elphidium magellanicum	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Elphidium margaritaceum	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Elphidium oceanense	0	0	0	1	1	1	0	0	0
Elphidium selseyense / oceanense	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Psammophaga	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Virgulinella fragilis	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Bolivina sp.	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Bolivina variabilis	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Bolivina dilatata	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Bolivina pseudoplicata	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Bulimina sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bulimina aculeata	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Textulariide	0	0	0	1	1	0	1	0	0
Ammoscalaria sp.	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Millioides	0	1	0	1	1	0	1	0	0
Quinqueloculina masselari	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Annexe 2 : Espèces détectées par l'ADNe avec des reads supérieurs à 99, présentes (1) ou non (0) sur chaque site

	Authie	Ouistreham	Estuaire Seine	St Vaast	Baie des Veys	Daire	Rivedoux sable	Rivedoux vase	Les Triares
Haynesina germanica	1	1	0	1	1	0	1	0	0
Haynesina depressula	1	1	0	1	0	1	0	0	0
Ammonia sp.	0	0	0	1	0	1	1	0	1
Elphidium williamsoni	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Bolivina variabilis	1	1	0	0	1	1	1	1	0

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Antoine THOMAS,
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un
document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation
des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer
toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :

