

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse¹ (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR :

Nom : MARTIN

Prénom : Fabrice

Section CNU : 67

Grade : DR1

HDR : Date de soutenance : 15/05/2007 Discipline : Ecologie microbienne

l'HDR devra être soutenue, ou sa soutenance autorisée, au moment du dépôt du présent projet.

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : INRAE, 17 rue sully, BP86510, 21065 Dijon Cedex, fabrice.martin@inrae.fr, 0380693406

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : Agroécologie, UMR, n°147, MARTIN Fabrice

2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :

- nom et label de l'unité de recherche (ainsi que l'équipe interne s'il y a lieu) : UMR Agroécologie
- localisation : Centre INRAE Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
- nom du directeur de thèse et du co-directeur s'il y a lieu : Fabrice MARTIN-LAURENT (Directeur de thèse).
- adresse courriel du contact scientifique : fabrice.martin@inrae.fr

- **titre du projet** : caractérisation de l'impact de l'irrigation de cultures maraichères avec des eaux usées issues de station d'épuration sur le microbiome du sol et de la rhizosphère.

- description du projet:

Contexte et état de l'art

La résistance aux antibiotiques des bactéries est devenue une crise mondiale de santé publique très préoccupante qui, avec le changement climatique, le stress hydrique et les dommages causés à l'environnement, est considérée comme un des grands défis causés par l'anthropocène auquel l'humanité est confrontée [1]. Pour faire face à cette crise majeure, le concept holistique « One Health » est désormais reconnu comme un cadre essentiel lutter contre la dispersion de la résistance aux antibiotiques chez l'homme, l'animal et l'environnement. Avec leur grand nombre et leur importante diversité, le microbiome environnemental est considéré comme le plus grand réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques (GRA).

Les stations d'épuration (STEP) des eaux usées ont été identifiées comme un 'hot-spot' d'enrichissement et de transfert des GRA [2] qui rejoignent les cours d'eau avec le relargage des effluents de STEP dans le milieu. En effet, bien que les STEP contribuent à abattre la charge en matières organiques et, de certains polluants, tels que les antibiotiques,

¹ ATTENTION : selon l'article 16 de l'arrêté du 25 mai 2016, le total d'encadrants ne peut pas dépasser 2, sauf si l'un des encadrants appartient au monde socio-économique, qui peut venir en sus, ou en cas de co-tutelle; Le décompte des co-encadrements se fera au prorata du nombre d'encadrants : 1 pour 1 encadrant, ½ pour deux encadrants.

le niveau de contamination des eaux de STEP en GRA et en bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) est significativement que dans les eaux de surface [3, 4]. Outre le fait que la plupart des antibiotiques sont des composés récalcitrants à la biodégradation [5] et que la plupart des GRA sont associés à un potentiel de mobilité génétique élevé [6], la réutilisation des eaux usées en agriculture est devenue une solution pour faire face au changement climatique avec l'adoption récente d'une loi par la commission européenne sur la réutilisation (REUT) des eaux usées en agriculture. La mise en place de cette nouvelle pratique agronomique présente le risque de la dispersion de GRA et de BRA dans l'environnement récepteur (sol, plante) et le long de la chaîne alimentaire (animal, homme).

Cependant, l'impact de ces pratiques d'irrigation sur l'introduction de contaminants émergents - tels que les antibiotiques, les BRA et les GRA - à travers le continuum eau usée-sol-culture-homme reste mal compris, empêchant ainsi l'évaluation et la gestion des risques pour lutter contre la résistance aux antibiotiques au niveau du lien entre l'homme et l'environnement. Dans cette perspective, le projet ANR CONTRA vise à tester l'hypothèse globale suivante : l'irrigation par des eaux usées traitées peut accroître la charge d'éléments génétiques mobiles (EGM), de GRA et de BRA dans les systèmes agricoles, créant ainsi une voie d'exposition humaine à la résistance aux antibiotiques par le biais de la consommation d'aliments d'origine végétale (figure 1).

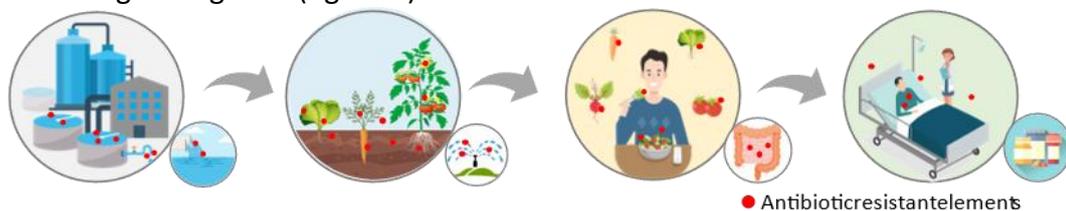


Figure 1. Hypothesis - wastewater irrigation in agriculture increases transmission of antibiotic resistance elements across wastewater-soil-crop-human continuum

Objectifs de la thèse : les objectifs de la thèse visent à caractériser l'impact de l'irrigation de cultures maraichères avec des eaux usées issues de station d'épuration sur le microbiome du sol et de la rhizosphère. Ce travail de thèse comportera trois parties : (i) l'isolement et la caractérisation génomique de BRA isolées du sol et de la rhizosphère de plantes arrosées avec des eaux usées, (ii) l'évaluation de l'impact de l'irrigation de plantes avec des eaux usées sur la structure et la diversité du microbiome du sol et de la rhizosphère et (iii) l'étude de potentiels transfert de GRA par la conjugaison bactérienne dans le contexte de la REUT.

Partie 1 : cette partie de la thèse reposera sur la mise en place d'un essai bloc (3 réplicas par traitement) qui sera conduit en conditions contrôlées (mésosomes). Il qui consistera à cultiver des cultures maraichères (laitues, radis) sur deux sols aux propriétés contrastées, irriguées avec des eaux de STEP ou avec des eaux de forage (non contaminées). A des pas de temps réguliers (à définir) le sol et le rhizosphérique seront prélevés pour isoler des BRA par des techniques pasteuriennes. Après un criblage phénotypique (résistance aux antibiotiques) et taxinomique (16S rRNA), le génome complet des représentants des BRA sera obtenu par le partenaire du projet CONTRA. Les génomes complets des BRA seront analysés par le doctorant. L'exposition du microbiome du sol et de la rhizosphère sera évaluée par l'analyse des concentrations des antibiotiques dans les eaux usées apportées aux cultures.

Partie 2 : une partie des échantillons de sols collectés dans l'expérimentation de la partie 1 sera conservée à -20°C jusqu'à l'extraction directe des acides nucléiques. Les extraits d'ADN de sol et de rhizosphère seront utilisés comme matrice pour amplifier par réaction de polymérisation en chaînes des amplicons l'ADNr 16S et l'ITS des communautés bactériennes et fongiques. Les amplicons seront séquencés et ils seront analysés avec des outils de bioinformatique pour évaluer l'impact de l'irrigation de plantes avec des eaux usées sur la structure et la diversité du microbiome du sol et de la rhizosphère. Ces résultats seront

comparés aux résultats obtenus par le partenaire de l'université de Hong-Kong qui utilisera une approche de métagénomique (séquençage direct de l'ADN extrait du sol).

Partie 3 : le potentiel transfert de GRA des BRA apportées par les eaux usées par conjugaison bactérienne au microbiome du sol et de la rhizosphère sera évalué par plusieurs approches allant de système expérimental simple à des systèmes plus complexes. L'éventualité du transfert horizontal de GRA sera testée in vitro par conjugaison sur filtre dans un système contrôlé comprenant une bactérie donneuse porteuse de GRA (pouvant être contre sélectionnée) et une bactérie receveuse mise en contact d'eaux de STEP (filtrée ou non à 0.2µm) ou d'eau de forage. Cette première expérimentation permettra d'évaluer des fréquences de transfert de GRA par conjugaison bactérienne. Si cette fréquence est suffisamment élevée alors il sera envisagé une expérimentation en microcosme de sol inoculée avec la bactérie receveuse et arrosée avec des eaux de STEP (filtrée ou non à 0.2µm) ou d'eau de forage.

Calendrier prévisionnel

M1-M6 Bibliographie, synthèse des données de la dynamique de GRA et BRA dans la REUT

M6-M12 : Mise en place de l'expérimentation en microcosmes, isolement et caractérisation des BRA, extraction de l'ADN des BRA et envoi de l'ADN au partenaire à Hong-Kong pour séquençage complet

M12-M18: Extraction des acides nucléiques et analyse de la structure et de la diversité des communautés microbiennes

M18-M30 : Etude de la mobilité des GRA par conjugaison bactérienne

M24-M30 Rédaction des articles parties 1 et 2

M30-36 : Rédaction article partie 3 et manuscrit de thèse

Références citées

[1]. Murray, C. J. L., et al., Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* **2022**, *399*, (10325), 629-655; [2]. Pärnänen, K. M. M., et al., Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci Adv* **2019**, *5*, (3); [3]. Sabri, N. A., et al., Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *J Environ Chem Eng* **2020**, *8*, (1); [4]. Cacace, D., et al., Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Res* **2019**, *162*, 320-330; [5]. Martin-Laurent, F., et al., Environmental risk assessment of antibiotics in agroecosystems: ecotoxicological effects on aquatic microbial communities and dissemination of antimicrobial resistances and antibiotic biodegradation potential along the soil-water continuum. *Environ Sci Pollut R* **2019**, *26*, (18), 18930-18937; [6]. Larsson, D. G. J., et al., Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol* **2022**, *20*, (5), 257-269

- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat) :

ANR CONTRA – Conjugative transfer of plasmid-borne antibiotic resistance genes to environmental bacteria in crop production systems irrigated with municipal wastewater effluents (coordinateur Fabrice MARTIN-LAURENT), AAP Générique 2024, PRCI France-Hong-Kong, Axe H.02 Contaminants, ecosystems and health (CE 34), du 1^{er} avril 2025 au 31 octobre 2028, financement accordé par l'ANR pour l'UMR Agroécologie : 299 834€ (acquis).

- connaissances et compétences requises : Le/la candidat.e devra avoir des connaissances en microbiologie, écotoxicologie microbienne et sciences de l'environnement. Il/elle devra avoir des compétences en microbiologie pasteurienne, microbiologie moléculaire, bioinformatique et biostatistique. Il/elle devra avoir un bon niveau d'anglais pour être en mesure d'échanger avec le partenaire scientifique à Hong-Kong. Il/elle devra être ouvert à la mobilité internationale, une ou plusieurs visites du partenaire scientifique à Hong-Kong étant prévue durant la thèse.

Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)

En Europe, la réutilisation (REUT) des eaux usées issues des stations d'épuration (STEP) pour l'irrigation des cultures est maintenant possible. L'impact de cette pratique d'irrigation sur l'introduction de contaminants émergents - tels que les antibiotiques, les bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) et les gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) - à

travers le continuum eau usée-sol-culture-homme reste mal compris, empêchant ainsi l'évaluation et la gestion des risques pour lutter contre la résistance aux antibiotiques au niveau du lien entre l'homme et l'environnement. En effet, l'irrigation par des eaux usées pourrait accroître la charge d'éléments génétiques mobiles (EGM), de GRA et de BRA dans les systèmes agricoles, créant ainsi une voie d'exposition humaine à la résistance aux antibiotiques par le biais de la consommation d'aliments d'origine végétale. Dans cette perspective, le sujet de thèse proposé vise à (i) isoler et caractériser le génome de BRA isolées du sol et de la rhizosphère de plantes arrosées avec des eaux usées, (ii) évaluer l'impact de l'irrigation de plantes avec des eaux usées sur la structure et la diversité du microbiome du sol et de la rhizosphère des plantes cultivées et (iii) étudier de potentiels transfert de GRA par la conjugaison bactérienne dans le contexte de la REUT. Ce projet de thèse sera réalisé dans le cadre du projet CONTRA 'Transfert par conjugaison bactérienne de gènes d'antibiorésistance portés par des plasmides à des bactéries de l'environnement dans des systèmes de production agricoles irrigués par des eaux' financé par l'Agence Nationale de la Recherche, coordonné par le Directeur de la Thèse et réalisé en partenariat avec l'Université de Hong-Kong.

Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum – ne pas modifier les intitulés : ils sont imposés par certains sites web) :

Ecologie, Environnement

Mots clés : antibiotique, gène de résistance aux antibiotiques, bactérie résistante aux antibiotiques, microbiome