

Ecole doctorale Environnements-Santé
Dossier de projet de thèse « Contrat doctoral Etablissements »
ANNEE 2026

TITRE DU PROJET (limité chacun à 255 caractères) Etude de la survie des bactéries résistantes aux antibiotiques et du transfert des gènes de résistance dans un continuum eau-sol dans un contexte de changement climatique.

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

Co-directeur de thèse éventuel :

Nom : THIOUR-MAUPRIVEZ

Prénom : Clémence

Section CNU : 65

Grade : Maître de conférences UBE

HDR : non ☒; oui ☐ Date de soutenance..... Discipline :

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : INRAE, 17 rue sully, BP86510, 21065 Dijon Cedex, clemence.thiour-mauprivez@u-bourgogne.fr ; +33666208964

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), Clémence THIOUR-MAUPRIVEZ et Elodie BARBIER (Co-directrice de thèse).
- adresse courriel du contact scientifique : fabrice.martin@inrae.fr

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.

- **titre du projet** : Etude de la survie des bactéries résistantes aux antibiotiques et du transfert des gènes de résistance dans un continuum eau-sol dans un contexte de changement climatique.

- **description du projet (2 pages maximum)** :

Contexte et état de l'art :

La résistance aux antibiotiques des bactéries représente une menace mondiale très préoccupante pour la santé publique et est considérée comme un des grands défis de l'anthropocène¹. Pour faire face à cette crise majeure, le concept holistique « One Health » est désormais reconnu comme un cadre essentiel pour lutter contre la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez l'homme, l'animal et l'environnement². Avec leur grand nombre et leur importante diversité, les microorganismes environnementaux sont considérés comme le plus grand réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques (GRA). Les transferts horizontaux de GRA sont le plus souvent appréhendés par des méthodes visant à séquencer les éléments génétiques mobiles dans l'environnement mais les preuves expérimentales démontrant le transfert effectif des GRA dans les sols ne sont pas légion et apparaissent pourtant essentielles dans un contexte de résistances aux antibiotiques grandissantes³. De plus, dans un contexte de changement climatique, l'augmentation des températures, les épisodes de sécheresse et les événements extrêmes pourraient promouvoir la survie des bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) en modifiant la structure des communautés microbiennes du sol ou influencer la fréquence de transfert horizontal des GRA⁴. Par ailleurs, la pression accrue sur les ressources en eau favorise dans les zones arides ou semi-arides le recours à la réutilisation des eaux usées pour l'irrigation, amplifiant potentiellement l'exposition des sols agricoles aux GRA et aux BRA ; les eaux usées traitées par les stations d'épuration ayant été identifiées comme des 'hotspots' d'enrichissement et de transfert des GRA⁵. L'irrigation de cultures destinées à la consommation humaine ou animale avec ce type d'eau pose également la question du transfert des BRA et GRA sur les plantes et du risque pour le consommateur. Malgré ces enjeux, peu d'études intègrent explicitement les scénarios climatiques dans l'évaluation du risque de dissémination de l'antibiorésistance. Dans ce contexte, le développement de souches bactériennes antibiorésistantes et de plasmides traçables et l'utilisation de systèmes expérimentaux contrôlés, de type sol irrigué par des eaux usées, constituent une approche pertinente pour passer d'une approche descriptive à une démonstration mécanistique du risque de transfert.

Objectifs de la thèse : les objectifs de la thèse visent à étudier, d'une part, la survie des bactéries résistantes aux antibiotiques et, d'autre part, le transfert des GRA dans un continuum eau usées-sol dans un contexte de changement climatique. Ce travail de thèse comportera trois parties : (i) la construction de souches bactériennes antibiorésistantes et de plasmides traçables dans un système complexe du type sol, (ii) l'étude du potentiel de transfert horizontal des GRA dans un système sol irrigué avec des eaux usées et (iii) l'étude de la persistance et de l'impact de souches microbiennes antibiorésistantes sur les microbiotes d'un système sol irrigué avec des eaux usées.

Partie 1 : Biotechnologie microbienne : cette partie de la thèse reposera sur la **construction de souche donneuses rapportrices** qui permettront le suivi des événements de transfert des GRA le long du continuum eaux usées-sol

Différents plasmides conjuguatifs porteurs de GRA seront modifiés par ajout d'un gène codant pour une résistance à la kanamycine, ainsi que pour une protéine fluorescente (par ex. GFP) qui sera sous le contrôle du promoteur du gène de résistance à l'antibiotique d'intérêt. Ces

modifications permettront de suivre les transconjugants grâce à leur fluorescence et à leur résistance acquise à la kanamycine.

Les bactéries donneuses, choisies dans la liste de bactéries de « priorité critique » de l'OMS et dans la liste ESKAPEE, seront transformées avec les plasmides conjugatifs pour devenir des souches donneuses rapportrices. Elles seront contre-sélectionnées par l'ajout d'un contre-marqueur (par ex. *sacB*).

En parallèle, nous utiliserons des plasmides construits par nos partenaires de l'Université de Hong-Kong (projet « CONTRA » ANR PRCI France-Hong-Kong coordonné par Fabrice Martin) qui disposent déjà de cinq BRA représentatives.

Une fois ces constructions mises au point, la traçabilité des transconjugants sera validée *in vitro*, dans l'eau et dans le sol. Des approches culturales et moléculaires permettront de quantifier les transconjugants obtenus, proxy des événements de transferts horizontaux de gène ayant eu lieu.

Partie 2 : Ecologie microbienne : dans un premier temps, **l'étude du potentiel de transfert horizontal des GRA** sera mise au point dans l'eau. Des eaux usées synthétiques contenant des quantités connues d'antibiotiques, des souches donneuses rapportrices construites en partie 1 et de souches receveuses issues d'un sol agricole. Les transconjugants seront quantifiés par des approches culturales et par PCR quantitative (qPCR) et/ou digital PCR (dPCR) afin de sélectionner différents scénarios de contamination des eaux pour l'arrosage des microcosmes de sol.

Puis, un essai en microcosmes de sol sera mis en place afin d'étudier le potentiel de transfert horizontal des GRA dans un système eaux usées-sol agricole dans un contexte d'événements climatiques extrêmes en faisant varier température et humidité. Des microcosmes de sol seront soumis, durant 28 jours, à un stress thermique (35°C ; 60% de la capacité de rétention en eau (CRE)) ; à un stress hydrique (20°C ; 100% CRE) ; aux deux stress combinés (35°C ; 100% CRE) ou à aucun stress pour les microcosmes témoins (20°C ; 60% CRE). Ces microcosmes de sol seront irrigués à intervalles réguliers et avec la même quantité d'eaux usées synthétiques sélectionnées précédemment. Ainsi, l'impact de l'irrigation avec les eaux usées synthétiques pourra être isolé de celui de la différence en CRE. Différentes doses environnementales d'antibiotiques seront testées dans les eaux usées synthétiques. A 0, 3, 7, 14 et 28 jours post-traitement, 5 répliques par condition seront sacrifiées. Lors des différents temps de prélèvements, les transconjugants seront quantifiés par des approches culturales et par qPCR et/ou dPCR afin d'estimer les événements de transferts horizontaux de GRA ayant eu lieu dans nos conditions expérimentales.

Partie 3 : Ecotoxicologie microbienne : cette partie consistera à étudier l'impact écotoxicologique de l'irrigation des sols avec des eaux usées en évaluant l'effet des BRA sur la communauté microbienne indigène du sol. Elle s'appuiera sur l'expérience en microcosmes réalisée en partie 2 pour mesurer la survie des BRA et leurs effets sur l'abondance et la diversité des communautés microbiennes. L'impact écotoxicologique de l'irrigation des sols avec des eaux usées sera évalué en fonction de composantes du changement climatique (température et humidité). Les acides nucléiques seront extraits des échantillons de sols collectés à différents temps d'exposition et soumis à un séquençage Illumina d'amplicons de l'ADNr 16S et de l'ITS, ce qui permettra de mesurer l'impact écotoxicologique de ces BRA sur la communauté microbienne indigène dans un contexte de changement climatique. D'autre part, la persistance des BRA sera mesurée par qPCR ou dPCR à partir des extraits d'ADN de sols.

M1-M6 Bibliographie, synthèse des données de la dynamique de GRA et BRA dans les eaux usées et les sols

M6-M12 : Partie 1. Biotechnologie microbienne : construction des souches donneuses rapportrices.

M12-M15 : Rédaction de l'article partie 1.

M15-M18 : Mise au point des conditions optimales de transfert des GRA dans les eaux usées synthétiques.

M18-M24 : Partie 2 : Ecologie microbienne : transfert des GRA dans les eaux. Suivi des événements de transfert horizontaux de gènes. Rédaction article 2

M24-M30 : Parties 3. Ecotoxicologie microbienne : persistance et impact des BRA sur les communautés microbiennes des sols. Rédaction article 3.

M30-M36 : Rédaction du manuscrit de thèse

-Références citées

1. Murray, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* **399**, 629–655 (2022).
2. Li, L. *et al.* Assessing antimicrobial resistance connectivity across One Health sectors. *Nat. Water* 1–14 (2025) doi:10.1038/s44221-025-00514-8.
3. Pinilla-Redondo, R., Cyriaque, V., Jacquiod, S., Sørensen, S. J. & Riber, L. Monitoring plasmid-mediated horizontal gene transfer in microbiomes: recent advances and future perspectives. *Plasmid* **99**, 56–67 (2018).
4. Kalanxhi, E. & Laxminarayan, R. Climate change and antimicrobial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 1–12 (2026) doi:10.1038/s41579-026-01285-z.
5. Pärnänen, K. M. M. *et al.* Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci. Adv.* **5**, eaau9124 (2019).

- 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 génétique, en microbiologie et en écotoxicologie microbienne. 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 visite du partenaire scientifique à Hong-Kong étant prévue durant la thèse.

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

La résistance aux antibiotiques constitue une crise majeure de santé publique et un défi central de l'anthropocène. Dans une approche « One Health », les sols agricoles sont considérés comme un réservoir majeur de gènes de résistance aux antibiotiques (GRA), susceptibles d'être disséminés via les eaux usées utilisées pour l'irrigation. Dans un contexte de changement climatique, la survie des bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) et la fréquence des transferts horizontaux de GRA pourraient être modifiées, mais les preuves expérimentales en conditions réalistes restent limitées. Cette thèse vise à étudier la survie des BRA et le transfert des GRA dans un continuum eaux usées-sol dans un contexte de

changement climatique. La première partie consistera à construire des souches donneuses rapporteurs et des plasmides traçables, permettant de suivre les événements de transfert de GRA. Des BRA d'intérêt seront génétiquement modifiées pour permettre la détection des transconjugants par fluorescence et résistance antibiotique. La traçabilité sera validée *in vitro*, dans l'eau et dans le sol, par des approches culturelles et moléculaires. La deuxième partie reposera sur la mise en place des microcosmes de sol soumis à différents stress climatiques et irrigués avec des eaux usées synthétiques contenant ou non des antibiotiques et les souches construites. La survie des BRA et l'impact sur les communautés microbiennes indigènes seront évalués par séquençage Illumina. La troisième partie quantifiera les transconjugants par culture et qPCR/dPCR afin d'estimer les événements de transfert horizontal de GRA dans les différents scénarios testés.

Antibiotic resistance is a major public health crisis and a central challenge of the Anthropocene. Within a "One Health" framework, agricultural soils are considered major reservoirs of antibiotic resistance genes (ARGs), which may be disseminated through the reuse of wastewater for irrigation. In the context of climate change, the survival of antibiotic-resistant bacteria (ARB) and the frequency of horizontal ARG transfer may be altered; however, experimental evidence under realistic environmental conditions remains limited. This PhD project aims to investigate ARB survival and ARG transfer along a wastewater-soil continuum under climate change scenarios. The first part will focus on constructing traceable reporter donor strains and plasmids to monitor ARG transfer events. Selected ARB will be genetically engineered to enable detection of transconjugants through fluorescence and antibiotic resistance markers. Traceability will be validated *in vitro*, in water, and in soil using culture-based and molecular approaches. The second part will involve the establishment of soil microcosms subjected to different climate-related stresses and irrigated with synthetic wastewater containing or not antibiotics and the constructed donor strains. ARB survival and their impact on indigenous soil microbial communities will be assessed using Illumina sequencing. The third part will quantify transconjugants using culture-based methods and qPCR/dPCR in order to estimate horizontal ARG transfer events under the different experimental scenarios tested.

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 : eau, sol, antibiotique, gène de résistance aux antibiotiques, bactérie résistante aux antibiotiques, microbiome