



HAL
open science

Vers une étude intégrée des interactions des bactéries et des bactériophages entre eux et avec leurs environnements

Xavier Bellanger

► To cite this version:

Xavier Bellanger. Vers une étude intégrée des interactions des bactéries et des bactériophages entre eux et avec leurs environnements. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lorraine; École doctorale BioSE - Biologie, Santé, Environnement, 2019. tel-02366106

HAL Id: tel-02366106

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02366106>

Submitted on 18 Nov 2019

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

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



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

BioSE



ECOLE DOCTORALE BioSE
BIOLOGIE, SANTÉ et son ENVIRONNEMENT
ED 266

Ecole Doctorale BioSE
(Biologie, Santé, Environnement)

Mémoire

Présenté pour la candidature au diplôme

D'HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

par

Xavier BELLANGER

**VERS UNE ETUDE INTEGREE DES INTERACTIONS DES
BACTERIES ET DES BACTERIOPHAGES
ENTRE EUX ET AVEC LEURS ENVIRONNEMENTS**

Section CNU n°87

Parrain scientifique : Christophe MERLIN
Maître de Conférences HC – HDR
LCPME UMR 7564 Université de Lorraine - CNRS
Vandoeuvre-lès-Nancy

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement
UMR 7564 Université de Lorraine – CNRS

Table des matières

1. Curriculum vitae	7
1.1 Cours Universitaire	7
1.2 Expérience professionnelle	7
1.2.1 Expérience en Enseignement	7
1.2.2 Expérience en Recherche	8
1.3 Formation continue	9
2. Détail de mes Activités Pédagogiques	11
2.1 Volume horaire par année	11
2.2 Volume horaire par Unité d'Enseignement	12
2.1.1 A la Faculté de Pharmacie	12
2.1.2 A la Faculté des Sciences et Technologies.....	12
2.1.3 A la Faculté de Médecine	13
2.1.4 A l'IUT Nancy-Brabois et l'école d'ingénieur Polytech Nancy	13
2.3 Mise en place de nouveaux enseignements	13
2.4 Responsabilités pédagogiques	14
3. Détail de mes Activités de Recherche	15
3.1 Activités de Recherche avant septembre 2014	16
3.1.1 Mécanismes d'évolution et de transfert d'îlots génomiques bactériens.....	16
3.1.2 Nouveaux outils moléculaires dédiés à la thérapie génique.....	18
3.1.3 Transfert du plasmide conjugatif pB10 dans l'environnement.....	20
3.1.4 Stabilité et toxicité de nanoparticules métalliques sur des systèmes bactériens.....	24
3.2 Activités de Recherche depuis septembre 2014	26
3.2.1 De l'intérêt d'étudier l'antibiorésistance et les éléments génétiques mobiles dans l'environnement.....	26
3.2.2 Effet des antibiotiques en doses sub-inhibitrices sur l'activité d'éléments génétiques mobiles.....	27
3.2.3 Compartimentation des intégrons de classe 1 et des plasmides IncP-1 dans un écosystème anthropisé, la rivière Orne	31
3.2.4 Rôle des ICE SXT/R391 dans la dissémination des gènes d'antibiorésistance en milieux aquatiques	37
3.2.5 Implication des bactériophages environnementaux dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques.....	40
4. Perspectives de Recherche	49
4.1 Compartimentation des EGM/GRA et interactions des bactéries qui les portent avec leurs environnements	49
4.1.1 Contexte et Problématiques	49
4.1.2 Travaux en prévisions.....	50
4.2 Une vision globale et intégrée de la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement	52
4.2.1 Contexte et Problématiques	52
4.2.2 Travaux en prévisions.....	53
5. Détail de mes Activités d'Encadrement	57
5.1 Encadrements avant mon arrivée au LCPME (2005-2011)	57
5.2 Encadrements au LCPME avant ma nomination comme MCF (2011-2014)	57
5.3 Encadrement au LCPME depuis ma nomination comme MCF (depuis 2014)	58
5.3.1 Personnels Techniques.....	58
5.3.2 Post-Doctorante et ATER.....	58

5.3.3 Doctorantes d'Université	59
5.3.4 Doctorants d'Exercice en Pharmacie.....	59
5.3.5 Etudiants en Master de Sciences et BTS	59
6. Participation à des Jurys.....	61
6.1 Participation à des Jurys de Doctorat d'Université.....	61
6.2 Participation à des Jurys de Doctorat d'Exercice en Pharmacie	61
6.3 Participation à un Jury de Diplôme d'Ingénieur	62
6.4 Participation à des Jurys de Master et de Diplôme de Formation Générale en Sciences Pharmaceutiques.....	62
6.5 Participation à des Jurys de Baccalauréat	62
7. Production Scientifique	63
7.1 Articles et Revue parus dans des Journaux Internationaux à Comité de Lecture	64
7.2 Articles Soumis à des Journaux Internationaux à Comité de Lecture ou en Préparation	65
7.4 Communications Orales dans des Congrès Nationaux.....	66
7.5 Communications par Poster dans des Congrès Internationaux.....	67
7.6 Communications par Poster dans des Congrès Nationaux.....	68
7.7 Valorisation.....	68
8. Rayonnement Scientifique	69
8.1 Cours et Conférences invités	69
8.2 Expertises Scientifiques.....	69
8.3 Implication dans des Réseaux Scientifiques	70
8.3.1 Zone Atelier Moselle (ZAM)	70
8.3.2 RTP « Phages.fr ».....	70
8.3.3 Action COST NEREUS ES1403	71
8.4 Collaborations Scientifiques	71
8.5 Bourses de Mobilité et Prime Scientifique	72
9. Responsabilités Scientifiques et Administratives.	73
9.1 Rédaction, Coordination et Participation à des Projets Scientifiques	73
9.2 Participation à l'Obtention de Bourse et Contrat Doctoraux	75
9.3 Autres Responsabilités Scientifiques	75
9.4 Comités de Recrutements de Personnels en CDD	75
9.5 Autres Responsabilités Administratives.....	76
10. Bibliographie	77

1. Curriculum vitae

Xavier Bellanger

Maître de Conférences en Parasitologie et Mycologie Médicale

LCPME - UMR 7564 CNRS-Université de Lorraine
Microbiologie Environnementale
Extension Pôle de l'Eau
15, avenue du Charmois
F-54500 Vandoeuvre

Email : xavier.bellanger@univ-lorraine.fr
Tel: +33 (0)3 72 74 72 45
Fax: +33 (0)3 72 74 72 42

1.1 Cours Universitaire

L'ensemble de mon cursus universitaire a été réalisé à l'Université Henri Poincaré (Nancy 1), devenue en 2012 l'Université de Lorraine.

- 2005-2009 : **Doctorat en Génomique**
- 2004-2005 : **DEA en Microbiologie** (mention Bien)
- 2003-2004 : **Maîtrise en Génétique Moléculaire et Cellulaire** (mention Bien)
- 2002-2003 : **Licence en Biologie Cellulaire et Physiologie** (mention Assez-Bien)
- 2000-2002 : **DEUG en Sciences de la Vie** (mention Assez-Bien)

1.2 Expérience professionnelle

1.2.1 Expérience en Enseignement

- Depuis septembre 2014 : **Maître de Conférences** au sein de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine (**CNU n°87**). Enseignements – Disciplines : CM, TD et TP – Parasitologie médicale ; Mycologie médicale ; Bactériologie ; Biotechnologie
- Octobre 2013 à août 2014 : **ATER** au sein de l'Université de Lorraine (**CNU n°87**). Enseignements – Disciplines : CM, TD et TP – Parasitologie médicale ; Mycologie médicale ; Bactériologie ; Biotechnologie
- Septembre 2005 à août 2009 : **Moniteur** (3 ans) puis **ATER** (1 an) au sein de Nancy-Université (**CNU n°65**). Enseignements – Disciplines : TD et TP – Biologie Evolutive ; Evolution et Phylogénie Moléculaire ; Génétique Formelle et Moléculaire

1.2.2 Expérience en Recherche

- Depuis septembre 2014 : **Maître de Conférences** au Laboratoire de Chimie-Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement (LCPME), UMR 7564 CNRS-Université de Lorraine.
Sujet : Rôle des éléments génétiques mobiles et des bactériophages environnementaux dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques
- Février 2011 à août 2014 : **Post-Doctorant** puis **ATER** au LCPME, UMR 7564 Université de Lorraine-CNRS (Responsable : Dr. C. Merlin).
Sujets : Stabilité et transfert de gènes de résistance aux antibiotiques en milieux anthropisés et Bioperception, toxicité et stabilité de quantum dots d'oxyde de zinc
- Octobre 2009 à janvier 2011 : **Post-Doctorant** à l'Unité des Agents Antibactériens, Institut Pasteur (Responsables : Pr. P. Courvalin et Dr. C. Grillot-Courvalin).
Sujet : Développement d'un vecteur intégratif site-spécifique pour la thérapie génique
- Septembre 2005 à octobre 2009 : **Doctorant en Génomique** dans le Laboratoire de Génétique et Microbiologie, UMR 1128 Nancy Université-INRA (Directeurs de thèse : Dr. G. Guédon et Pr. B. Decaris).
Titre : Transfert, accretion et mobilisation des éléments intégratifs conjugatifs et des îlots génomiques apparentés de *Streptococcus thermophilus* : un mécanisme clef de l'évolution bactérienne ?
- Janvier à mars 2007 : **Stagiaire de recherche EMBO** (European Molecular Biology Organization) à l'Eastman Dental Institute, University College London (Responsables : Dr. A.P. Roberts et Pr. P. Mullany).
Sujet : Caractérisation du transfert conjugatif d'ICESt3 vers diverses *Firmicutes* telles *Streptococcus pyogenes* et *Enterococcus faecalis*.
- Septembre 2004 à août 2005 : **Stagiaire en DEA de Microbiologie** dans le Laboratoire de Génétique et Microbiologie, UMR 1128 Nancy Université-INRA (Encadrants : Dr. G. Guédon et Pr. B. Decaris)
Sujet : Implication de gènes du module de régulation dans l'excision des éléments intégratifs potentiellement conjugatifs ICESt1 et ICESt3.
- Janvier 2004 à mars 2004 : **Stagiaire en Maîtrise en Génétique Moléculaire et Cellulaire** dans le Laboratoire de Génétique et Microbiologie, UMR 1128 Nancy Université-INRA (Encadrante : F. Charron-Bourgoin)
Sujet : Etude de mutants du locus *eps* (exopolysaccharides) chez différentes souches de *Streptococcus thermophilus*.
- Juillet 2003 à août 2003 : **Stagiaire en mycologie** (stage hors cursus) au Laboratoire National de Protection des Végétaux (désormais Anses, Laboratoire de la santé des végétaux) (Encadrant : P. Loevenbruck)
Sujet : Participation à la campagne annuelle de surveillance des contaminations par *Fusarium spp.* des grains de maïs et de blé récoltés en France.

1.3 Formation continue

J'ai participé en juin 2018 à la formation « Encadrer un Doctorant » organisée par l'Université de Lorraine sur deux journées complètes successives. Cette formation a consisté en (i) une conférence de sensibilisation aux enjeux de l'encadrement, dans le contexte français et européen et à l'Université de Lorraine, (ii) des ateliers de partage de pratiques, et (iii) une journée de formation liminaire abordant les fondamentaux de l'encadrement doctoral.

2. Détail de mes Activités Pédagogiques

J'ai été recruté en 2014 en tant que Maître de Conférences en Mycologie et Parasitologie Médicale à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine après avoir effectué un monitorat et assuré une charge de demi-ATER pendant mon doctorat, puis assuré un service plein d'ATER en 2013-2014. Les disciplines que j'enseigne sont, par ordre décroissant de volume horaire, la mycologie médicale, la parasitologie, la bactériologie, la biotechnologie et la virologie (phages). J'interviens principalement en Faculté de Pharmacie mais aussi en Faculté des Sciences et Technologies et en Faculté de Médecine. Durant l'année universitaire 2017-2018, j'ai également dispensé des enseignements en biotechnologie à l'IUT Nancy-Brabois et à l'école d'ingénieur Polytech Nancy à l'occasion du remplacement d'un collègue en congé pour recherches et conversions thématiques (CRCT).

Je suis parfaitement intégré à l'équipe pédagogique avec laquelle j'interagis fortement et prends toute mes responsabilités en termes de charge d'enseignement, de mise à jour de ceux-ci et de propositions de nouveaux thèmes à aborder ou à développer. Associés à ces enseignements, j'ai naturellement participé à la préparation de nombreux sujets d'examen ainsi qu'aux corrections inhérentes, assuré des surveillances d'épreuves ou des examens oraux et participé à différents jurys. Je suis ou ai été responsable de deux unités d'enseignement (UE) en Faculté de Pharmacie.

2.1 Volume horaire par année

Le tableau suivant présente de façon succincte de mes services d'enseignement depuis mon recrutement à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine en tant que Maître de Conférences. Ces services comportent plus de 200 heures équivalent travaux dirigés (HETD) par an en moyenne.

Tableau 1 : Résumé de mes services d'enseignements depuis septembre 2014

Année universitaire	Cours magistraux	Travaux dirigés	Travaux pratiques	Référentiel #	Total
2018-2019 *	38,5 h	44,5 h	142 h	-	244 HETD
2017-2018	44,5 h	34,5 h	147,5 h	7 h	256 HETD
2016-2017	33,5 h	48,5 h	103 h	1,5 h	197 HETD
2015-2016	32 h	23 h	133 h	2 h	206 HETD
2014-2015	21,5 h	21 h	150,5 h	1 h	205 HETD

: les heures de référentiel sont accordées en fin d'année pour avoir participé à des jurys, encadré des stages ou dirigé des thèses d'exercices.

* : service prévisionnel au 1^{er} avril 2019.

2.2 Volume horaire par Unité d'Enseignement

2.1.1 A la Faculté de Pharmacie

- **Diplôme de Formation Approfondie en Sciences Pharmaceutique (DFA-SP)**

Dans ce diplôme, j'enseigne environ **20 HETD/an** en parasitologie, biotechnologie et bactériologie :

- UE Médicaments vétérinaires (DFA-SP2, filière officine) : cours magistraux (CM) et Travaux Dirigés (TD) ; environ 10 HETD/an
- UE Démarches expérimentales appliquées à la production de médicaments (DFA-SP1) : Travaux Pratiques (TP) ; environ 10 HETD/an
- UE Infectiologie 2 (DFA-SP1) : CM ; environ 1,5 HETD/an

- **Diplôme de Formation Générale en Sciences Pharmaceutique (DFG-SP)**

Dans ce diplôme, j'enseigne environ **130 HETD/an** en mycologie, parasitologie, biotechnologie et bactériologie :

- UE Microbiologie médicale (DFG-SP3) : CM et TP ; environ 50 HETD/an
- UE Zoopharmacie : (DFG-SP2) : CM et TP ; environ 25 HETD/an
- UE Apprentissage des techniques et gestes de base (DFG-SP2) : TP ; environ 15 HETD/an
- UE Analyse critique de documents (DFG-SP3) : TD et TP ; environ 15 HETD/an
- UE Biotechnologies végétales et fongiques (DFG-SP3) : CM et TP ; environ 11 HETD/an
- UE Biodiversité et bio-évolution des règnes végétal, animal et fongique : (DFG-SP2) : CM ; environ 5 HETD/an
- UE Microbiologie et immunologie générales : (DFG-SP2) : TP ; environ 5 HETD/an
- UE Biotechnologie dans l'industrie pharmaceutique (DFG-SP3) : CM ; environ 3 HETD/an (2017-2018 uniquement en remplacement d'un collègue en CRCT)
- UE Biofilms microbiens et santé (DFG-SP3) : CM ; environ 3 HETD/an
- UE Infectiologie 1 (DFG-SP3) : CM ; environ 1,5 HETD/an

- **Master Ingénierie de la Santé**

Dans ce diplôme, j'enseigne environ **9 HETD/an** en biotechnologie et bactériologie (CM ; Master 1).

2.1.2 A la Faculté des Sciences et Technologies

- **Cursus Master en Ingénierie en Biologie – Santé – Environnement (CMI-BSE)**

Dans ce diplôme, j'enseigne environ **35 HETD/an** dans l'UE Projet expérimental de 4^{ème} année. Cet enseignement consiste en la gestion étroite d'un groupe de 3 à 4 étudiants préparant puis réalisant un projet expérimental en laboratoire.

- **Master Microbiologie**

Dans ce diplôme, j'enseigne environ **28 HETD/an** en mycologie, biotechnologie, virologie et bactériologie. On m'accorde également régulièrement des HETD de référentiel pour avoir encadré des stagiaires de Master 1 et Master 2 ou avoir participé à des jurys de soutenance de stages.

- UE Virologie, bactériologie et mycologie fondamentale (Master 1) : CM et TD ; environ 9 HETD/an
- UE Outils de la Microbiologie (Master 2) : TP ; environ 8 HETD/an
- UE Nettoyage et désinfection des surfaces (Master 1) : CM et TD ; environ 4 HETD/an
- UE Contrôle des microorganismes : du fondamental à l'appliqué (Master 2) : CM et TD ; environ 4 HETD/an
- UE Mécanismes de flux gènes (Master 1) : CM ; environ 3,5 HETD/an

2.1.3 A la Faculté de Médecine

J'enseigne les bases de la mycologie médicale et de la parasitologie en 2^{ème} année de Licence de Sciences pour la Santé (CM et TD ; environ **11 HETD/an**).

2.1.4 A l'IUT Nancy-Brabois et l'école d'ingénieur Polytech Nancy

Le CRCT d'un collègue m'a permis en 2017-2018 d'enseigner les bases de la bactériologie et de la biotechnologie aux étudiants en 5^{ème} année du diplôme d'ingénieur en « Chimie-physique et microbiologie pour l'environnement » et aux étudiants en Licence Professionnelle « Eau : mesures et procédés » (CM et TD ; environ **23 HETD**).

2.3 Mise en place de nouveaux enseignements

Depuis 2014, j'ai développé ou co-développé plusieurs enseignements dispensés en Faculté de Pharmacie ou en Faculté des Sciences et qui représentent un volume annuel récurrent d'environ **70 HETD**.

Enseignements mis en place :

- UE Projet expérimental (Faculté des Sciences ; CMI-BSE) :
 - Mise en place (2014) : montage et suivi d'un projet tutoré destiné à représenter un total de 90 HETD pour les étudiants suivant cette UE.
 - Objectifs pédagogiques : développement de plans expérimentaux, stage pratique de 10 jours au laboratoire et management de projet (Gantt, ...).
- UE Analyse critique de documents (Faculté de Pharmacie ; DFG-SP3) :
 - Mise en place (2013) : développement d'un TP et d'un TD d'analyse de documents sur support informatique.
 - Objectifs pédagogiques : recherche d'informations sur les sites scientifiques et médicaux de référence (PubMed, INVS, CNR, ANSM, Anses, ...) et utilisation de ces informations pour informer sur une pathologie sous forme de diaporama.

- UE Zoopharmacie (Faculté de Pharmacie ; DFG-SP2) :
 - Mise en place (2013) : développement d'un TP de microbiologie.
 - Objectifs pédagogiques : suivi de l'action de prédation de protozoaires sur des bactéries cultivées en biofilm (numérations).
- UE Biotechnologie végétale et fongique (Faculté de Pharmacie ; DFG-SP3) :
 - Mise en place (2013) : développement d'un TP de microbiologie.
 - Objectifs pédagogiques : suivis microbiologique (numération) et biochimique (dosages sucres et alcool) lors de la fermentation d'une bière.
- UE Démarches expérimentales appliquées à la production de médicaments (Faculté de Pharmacie ; DFA-SP1) :
 - Mise en place (2014) : développement d'un TP de biologie moléculaire.
 - Objectifs pédagogiques : amplification et clonage d'un gène d'intérêt dans un vecteur d'expression.

2.4 Responsabilités pédagogiques

Mes responsabilités pédagogiques sont présentées ci-dessous :

- **Responsable d'UE** : UE « Biotechnologie dans l'industrie pharmaceutique » (2017-2018, remplacement d'un collègue en CRCT) et UE « Biotechnologie végétale et fongique » (depuis 2016) à la Faculté de Pharmacie.
- **Responsable des TP de Microbiologie** (Bactériologie, Virologie, Parasitologie et Mycologie Médicale) à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine (depuis la rentrée 2018-2019). A ce titre, je suis le responsable de la préparatrice affiliée aux différentes UE se déroulant dans ces TP et m'assure de la bonne gestion des salles, du budget et des commandes.
- **Responsable du double cursus « Pharma + ENSAIA »** (École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires) à la Faculté de Pharmacie (depuis la rentrée 2018-2019). Ce double cursus permet, après sélection sur dossier, à certains étudiants en 5^{ème} année de Pharmacie de suivre en parallèle des études leur permettant de devenir également Ingénieur de l'ENSAIA en Agronomie ou Industries alimentaires.

3. Détail de mes Activités de Recherche

Alors que les microorganismes peuvent apparaître comme des organismes simples au regard de cellules ou d'organismes eucaryotes, c'est au contraire la complexité et la finesse des modes de vie, mécanismes et « stratégies » mises en place par les microorganismes qui attirent encore et toujours ma curiosité. Très intéressé par les approches de biologie moléculaire et de génétique depuis mes premiers pas à l'université, mais aussi par le goût de l'expérimentation, de l'innovation et l'amélioration des connaissances, mes aspirations m'ont naturellement conduit à devenir chercheur en génétique et génomique microbiennes.

Mon travail de recherche se focalise depuis mon DEA et ma thèse au Laboratoire de Génétique et Microbiologie (UMR1128 INRA-Nancy Université) sur les mécanismes d'adaptation des bactéries à leur environnement. Ces premiers travaux et ceux que j'ai entrepris au LCPME lors de mon second Post-Doctorat portent sur l'adaptation des bactéries grâce à divers mécanismes et acteurs du transfert horizontal de gènes. J'ai également eut l'occasion, lors de mon premier Post-Doctorat à l'Institut Pasteur (Unité des Agents Antibactériens), de développer un outil/preuve de concept dédié à la thérapie génique puis, lors de mon troisième Post-Doctorat au LCPME, d'étudier la réponse physiologique de bactéries vis-à-vis d'un stress d'origine anthropique récent, celui provoqué par des nanoparticules métalliques.

Depuis mon recrutement en tant que Maître de Conférences (MCF) au LCPME en 2014, je poursuis les thématiques de recherche que j'avais déjà abordées en Post-Doctorat et en ATER avec Christophe Merlin. Ces thématiques visent globalement à étudier l'impact des pollutions humaines sur la dissémination des gènes de résistances aux antibiotiques chez les bactéries *via* des fragments de génome particuliers appelés éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides, les transposons ou les éléments intégratifs conjugatifs. Ces travaux sont fortement axés sur les transferts horizontaux de gènes par conjugaison. Je développe en parallèle de manière autonome l'étude des transferts de gènes d'antibiorésistance dans l'environnement *via* les virus bactériens, appelés bactériophages ou phages, et le mécanisme associé de transduction. Le but global de mes travaux est de tendre à obtenir une vision la plus globale et la plus complète possible des transferts de gènes d'antibiorésistance dans l'environnement en précisant les acteurs, en étudiant les mécanismes impliqués et en identifiant les niches environnementales les plus propices aux transferts. La dissémination des gènes de résistances aux antibiotiques dans l'environnement et les éléments génétiques mobiles d'une part, ainsi que le comportement des phages dans l'environnement d'autre part, sont 2 thématiques de recherche centrales de l'équipe de Microbiologie Environnementale (MIC) du LCPME. Le projet de recherche que je développe se situe donc au centre de ces thématiques et vise à développer une approche innovante d'étude de la réponse et de l'adaptation des systèmes microbiens aux stress environnementaux.

Dans ce chapitre, je vais succinctement aborder les différents postes de recherche que j'ai occupés depuis mon DEA jusqu'à mon recrutement comme MCF. Je détaillerai ensuite mes collaborations actuelles avec Christophe Merlin et, finalement, le projet de recherche que je développe en autonomie.

3.1 Activités de Recherche avant septembre 2014

3.1.1 Mécanismes d'évolution et de transfert d'îlots génomiques bactériens

DEA (07/2004-07/2005) **et Doctorat** (09/2005-10/2009) (**dont demi-ATER** (10/2008-08/2009)), Nancy-Université, Nancy.

Sujet : Transfert, accréation et mobilisation des éléments intégratifs conjugatifs et des îlots génomiques apparentés de *Streptococcus thermophilus*.

Résultats : Caractérisation du transfert de deux éléments intégratifs conjugatifs (ICE) – Etude de la régulation de ces ICE par le système SOS – Etude des mécanismes d'accréation site-spécifique, mobilisation en *cis* et rétro-mobilisation impliquant les îlots de *S. thermophilus*.

Domaines de compétences : génétique bactérienne, biologie moléculaire, mise au point du protocole de conjugaison des ICE de *Streptococcus spp.*

Des analyses de génomes réalisées peu avant mon stage de DEA effectué au Laboratoire de Génétique et Microbiologie (UMR1128 INRA-Nancy Université) en 2004-2005 avaient suggéré que de nombreux îlots génomiques bactériens seraient des éléments intégratifs conjugatifs (ICE) ou des éléments en dérivant (Burrus et al., 2002). Les ICE sont des éléments génétiques mobiles (EGM) qui s'excisent sous forme circulaire par recombinaison site-spécifique entre les sites *attR* et *attL* qui les flanquent, se transfèrent de manière autonome par conjugaison puis s'intègrent dans le génome d'une cellule réceptrice. Il est désormais reconnu que les éléments de ce type sont très abondants aux seins des génomes de bactéries et d'archées (Guglielmini et al., 2011).

Divers îlots génomiques apparentés avaient été identifiés chez plusieurs souches de la bactérie lactique *Streptococcus thermophilus* (Pavlovic et al., 2004). Cette famille incluait 2 éléments intégratifs potentiellement conjugatifs, ICEst1 et ICEst3, et quatre éléments génomiques dérivant d'ICE par délétion de fragments internes et incapables de coder leur propre mobilité, les CIME (*cis* mobilizable elements). Les comparaisons de séquences avaient suggéré que cette famille d'îlots génomiques évoluait selon le modèle original suivant. Un ICE acquis par conjugaison s'intégrerait par recombinaison site-spécifique dans l'un des deux sites *att* flanquant le CIME, conduisant à l'accréation des 2 îlots apparentés. Ce tandem d'îlots nouvellement formé serait un ICE composite capable de s'exciser sous forme circulaire et de se transférer par conjugaison (Figure 1).

Durant mon travail de thèse, j'ai pu démontrer qu'ICEst1 et ICEst3 sont bien des éléments intégratifs et conjugatifs fonctionnels capable de se transférer entre souches de *S. thermophilus* et entre espèces proches (*Streptococcus pyogenes* et *Enterococcus faecalis*) (Bellanger et al., 2009). L'étude du spectre de transfert des ICE de *S. thermophilus* a été notamment permise grâce à un stage de 3 mois que j'ai pu réalisé à ma demande dans un laboratoire de l'Eastman Dental Insitute (University College London) sous la responsabilité d'Adam P. Roberts et Peter Mullany, grâce à un financement obtenu de l'EMBO (European Molecular Biology Organization). Je souhaitais en effet bénéficier de leur expérience de l'étude des ICE de Firmicutes. J'ai également pu montrer que le transfert et l'excision des ICE de *S. thermophilus* sont inductibles par la mitomycine C et, de ce fait, que leur régulation est sensible à la perception des dommages à l'ADN (Bellanger et al., 2007, 2008).

J'ai pu démontrer que le transfert d'ICEst3 vers une cellule portant un CIME conduit systématiquement à leur accréation site-spécifique. A partir de cellules portant un tandem CIME-ICE, le co-transfert du CIME et de l'ICE ont été obtenus, ainsi que de manière surprenante le transfert du CIME seul. De plus, j'ai pu montrer qu'une souche porteuse d'ICEst3 peut capturer un CIME présent dans une souche réceptrice par rétro-mobilisation conjugative (Bellanger et al., 2011). Ainsi, le modèle d'évolution des îlots génomiques de *S. thermophilus* par accréation site-spécifique et

mobilisation conjugative mais également deux autres phénomènes de transfert d'îlots génomiques ont été caractérisés pendant ma thèse.

Une revue bibliographique a été réalisée sur la base de mes travaux de thèse pendant mon premier post-doctorat au LCPME. Elle m'a permis de montrer que les mécanismes d'évolution des îlots génomiques par accrétion site-spécifique et mobilisation conjugative sont des phénomènes fréquemment rencontrés chez les bactéries (Bellanger et al., 2014c). Ils concernent notamment les îlots SCCmec conférant la résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus*, les loci d'effacement entérocytaire (LEE) des *Escherichia coli* entéropathogènes ou les îlots de pathogénicité PAPI de *Pseudomonas aeruginosa*.

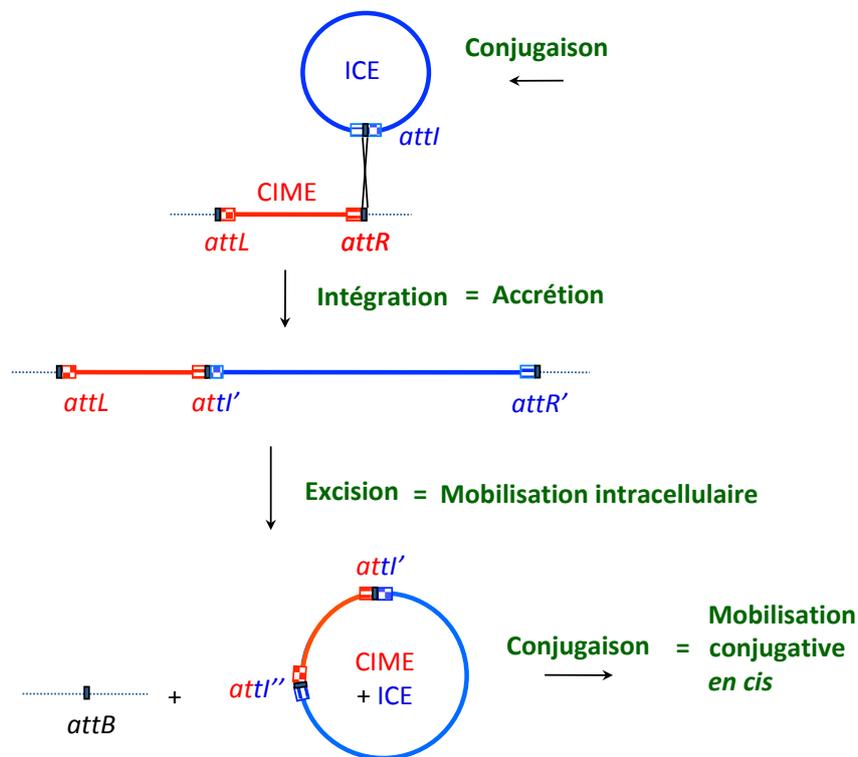


Figure 1 : Transfert horizontal d'un îlot génomique non-autonome (CIME) par un ICE apparenté *via* les mécanismes d'accrétion site-spécifique et de mobilisation conjugative *en cis* (d'après Bellanger et al., 2011).

Les séquences de l'ICE (integrative conjugative element) et de l'îlot génomique ne codant pas ses propres excision/intégration et transfert conjugatif (CIME ; *cis*-mobilizable element) sont respectivement représentées en bleu et en rouge. Les séquences spécifiques aux sites d'attachement *attR* et *attL* sont représentées par des hachures et des damiers. Une cellule porteuse d'un CIME peut acquérir la forme circulaire d'un ICE apparenté par conjugaison. Celle-ci s'intègre par recombinaison site-spécifique dans un site *att* flanquant le CIME (ici *attR*). Les deux éléments intégrés en tandem sont séparés par un site *attI'* de structure similaire à celle présente dans la forme circulaire d'un ICE. L'ensemble ainsi formé constitue un nouvel élément composite qui peut s'exciser par recombinaison site-spécifique entre *attR'* et *attL* et former une molécule circulaire portant un site *attI''*, tandis que le site chromosomique *attB* reste vide. Cet élément peut alors se transférer par conjugaison. Ainsi, le CIME est mobilisé *en cis* par l'ICE.

3.1.2 Nouveaux outils moléculaires dédiés à la thérapie génique

Post-Doctorat (10/2009-01/2011), Unité des Agents Antibactériens, Institut Pasteur, Paris.

Sujet : Développement d'un vecteur intégratif site-spécifique pour la thérapie génique.

Résultats : Construction d'outils moléculaires pour démontrer la faisabilité de nouvelles approches de thérapie génique – Obtention de résultats préliminaires prometteurs.

Domaines de compétences : génétique bactérienne, biologie moléculaire, culture cellulaire.

Lors de la dernière année de ma thèse, j'ai candidaté de manière spontanée dans l'Unité des Agents Antibactériens afin d'y effectuer un Post-Doctorat du fait de leur travaux passés sur l'antibiorésistance et les EGM comme les plasmides ou l'ICE Tn916 (Storrs et al., 1991; Courvalin, 2008). Patrice et Catherine Courvalin m'ont proposé de développer un projet en lien avec les activités de recombinaison site-spécifique de la relaxase du plasmide conjugatif R388 (Agúndez et al., 2011) en collaboration avec l'équipe de Fernando de la Cruz (Universidad de Cantabria & Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria; Santander, Espagne). Ce projet, que j'ai fortement participé à concevoir, a été présenté à un appel à projet de l'association Vaincre la Mucoviscidose. Il a été retenu et a bénéficié d'un financement qui m'a permis d'être recruté en Post-Doctorat immédiatement après ma soutenance de thèse et de financer une partie de mes travaux.

Dans le cadre du développement de nouvelles stratégies de thérapie génique, les efforts pour augmenter l'efficacité du transfert de l'ADN doivent s'accompagner de la mise au point de moyens pour la rendre plus sûre en prévenant l'intégration au hasard de l'ADN transféré dans le génome de la cellule cible. Il avait été montré, notamment à l'Unité des Agents Antibactériens, que des vecteurs bactériens peuvent être utilisés pour la thérapie génique (Grillot-Courvalin et al., 2002). Ainsi, une souche d'*Escherichia coli*, modifiée pour être invasive, est capable de délivrer avec une efficacité élevée de l'ADN plasmidique à une grande variété de cellules de mammifères. L'objectif final de ce projet était de développer un système d'intégration site-spécifique sûr qui ne requière pas de modification préalable du génome cible grâce à l'utilisation du système bactérien constitué de la relaxase TrwC et de l'origine de transfert (*oriT*_{R388}) du plasmide conjugatif R388. Dans un premier temps, nous avons utilisé ce système bactérien natif dans une preuve de concept. Après avoir intégré une copie d'*oriT*_{R388} en amont d'une ORF *egfp* (enhanced green fluorescent protein) dans le génome d'une cellule réceptrice, nous avons testé la faisabilité de l'utilisation d'un vecteur codant la relaxase TrwC pour catalyser l'intégration site-spécifique d'un plasmide, tous deux apportés par une *E. coli* invasive (Figure 2). Nous avons testé en parallèle la relaxase TrwC sauvage et une relaxase TrwC couplée à un signal de localisation nucléaire (NLS) pour essayer d'augmenter son efficacité. Nous avons aussi utiliser une recombinaison Cre et son site de recombinaison loxP comme témoin dans nos expériences. Malgré l'obtention de premiers résultats encourageant avec l'isolement de cellules devenues fluorescentes après avoir été infectées par des souches d'*E. coli* invasives portant les différents outils construits, mon travail n'a pas été poursuivi dans l'Unité des Agents Antibactériens après la fin de mon post-doctorat.

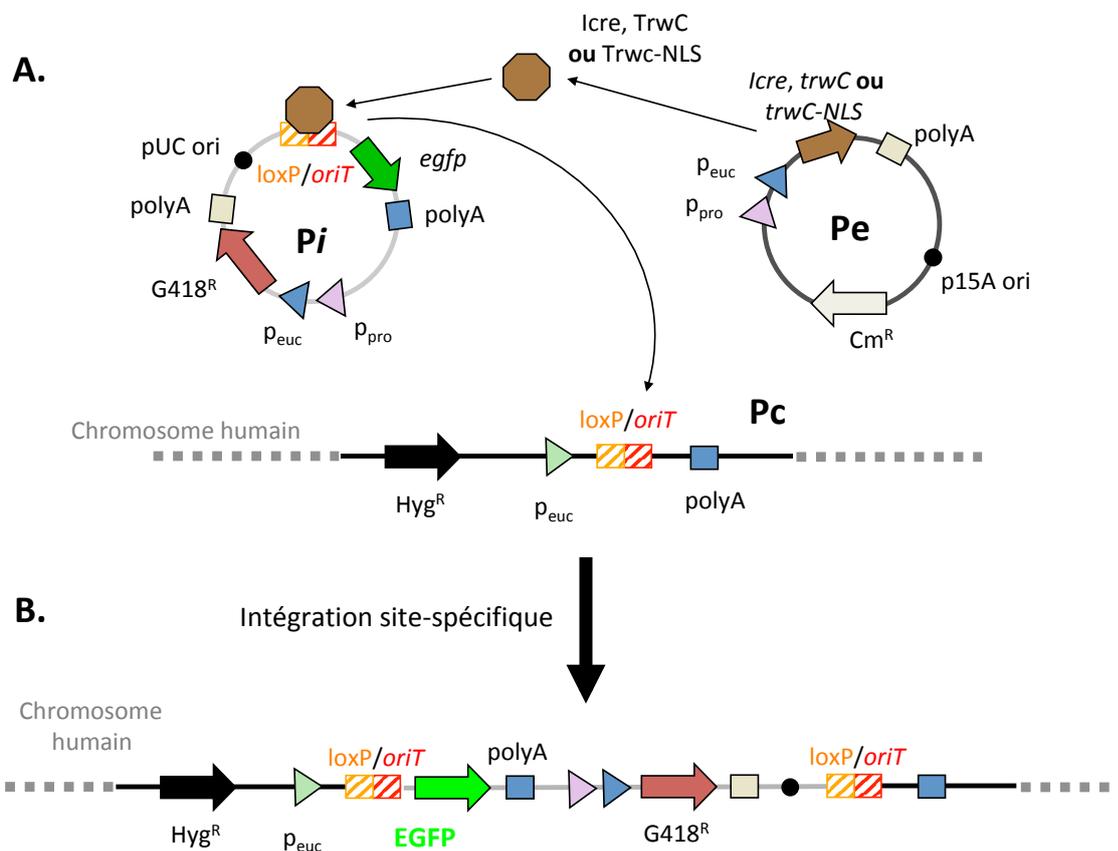


Figure 2 : Principe de l'étude de faisabilité sur l'usage de la relaxase TrwC comme recombinaison site-spécifique en thérapie génique.

A. Tout d'abord, l'insertion aléatoire d'un plasmide P_c portant les séquences cibles $oriT$, pour la relaxase native TrwC ou modifiée TrwC-NLS (nuclear localization sequence), et $loxP$, pour la recombinaison Icre (improved Cre recombinaison), a été sélectionnée après transfection grâce à l'acquisition de la résistance à l'hygromycine (Hyg^R). Les divers plasmides d'expression hétérologue (P_e) et plasmides intégratifs (P_i) sont ensuite introduits dans les cellules humaines modifiées par une *Escherichia coli* invasive subissant une lyse après son entrée. Les relaxases TrwC ou TrwC-NLS ou la recombinaison Icre sont alors exprimées et doivent permettre l'intégration du plasmide P_i . **B.** Les cellules dans lesquelles un plasmide P_i a été intégré deviennent fluorescentes (expression de $egfp$) et résistantes à la gentamicine, également appelée G418 ($G418^R$). Les promoteurs sont représentés par des triangles (P_{euc} : promoteurs eucaryotes ; P_{pro} : promoteurs procaryotes). Les séquences de poly-adénylation (polyA) sont indiquées par des rectangles. Les origines de répliation des plasmides pUC ou p15A sont représentées par des disques noirs. Les gènes Cm^R et $G418^R$ symbolisés par des flèches confèrent respectivement une résistance au chloramphénicol et à la gentamicine chez *E. coli*.

3.1.3 Transfert du plasmide conjugatif pB10 dans l'environnement

Post-Doctorat (02/2011-07/2012) et **ATER** (09/2013-08/2014), LCPME, Université de Lorraine, Nancy.

Sujet : Stabilité et transfert de gènes de résistance aux antibiotiques en milieux anthropisés.

Résultats : Mise en évidence du transfert ou de l'absence de transfert du plasmide conjugatif de type IncP-1 β pB10 dans différents environnements – Détermination de paramètres/facteurs régissant la perméabilité d'un environnement au transfert de gènes par conjugaison.

Domaines de compétences : microbiologie environnementale, biologie moléculaire.

J'ai été recruté en Post-Doctorat au LCPME par Christophe Merlin peu après la fin de mon précédent poste. Ce recrutement se plaçait dans le cadre d'un projet ANR « Ecotech » dont l'acronyme était « DéfiViande » et qui était intitulé « Meat production: towards a reduction of the impacts on health and environment ». L'objectif de mon travail au sein de ce projet était de caractériser le transfert du plasmide conjugatif pB10 au moyen d'une méthode moléculaire qui avait peu auparavant été développée au LCPME, dans différents échantillons environnementaux maintenus en microcosmes. Brièvement, cette méthode basée sur la PCR quantitative (qPCR) permet de suivre spécifiquement au cours du temps le nombre de copies d'une bactérie donneuse, ici *E. coli* DH5 α , et d'un EGM, ici le plasmide conjugatif de type IncP-1 β pB10, après leur inoculation dans un microréacteur dédié à l'étude de micro-organismes confinés (Figure 3). La conjugaison étant un mécanisme répliatif, lorsque le plasmide se dissémine son nombre de copies relatif par rapport à la donneuse augmente. Si le plasmide ne se transfère pas, ou ne se transfère que dans de très faibles proportions, ce rapport relatif restera constant.

Lors de ce Post-Doctorat, près de 50 matrices environnementales différentes, telles que des boues de recirculation et effluents de stations d'épuration et d'abattoirs, ou encore des lisiers bovins, ont été utilisées afin de réaliser des expériences de dissémination de pB10 en microcosmes. Nous avons non seulement pu étudier une grande variété de matrices mais aussi pu faire varier les conditions expérimentales. Nous avons notamment pu tester les effets d'un amendement régulier en nutriment, de l'oxygénation ou non des matrices par bullage ou de l'inhibition de la prédation par les protozoaires brouteurs/chasseurs par ajout de cycloheximide, et ainsi tenter de mettre en lumière les paramètres/facteurs pouvant influencer la dissémination du plasmide pB10 dans l'environnement.

Bien que sur LB gélosé, le plasmide pB10 se transfère entre souches d'*E. coli* à une fréquence proche de 100% après 16h d'incubation à 30°C, son transfert n'a été démontré que dans moins de 15% des microcosmes réalisés. Une première observation intéressante a donc été que les transferts de gènes dans l'environnement surviennent probablement plus rarement qu'*in vitro* entre souches pures. Ils y sont quoiqu'il en soit beaucoup plus délicats à démontrer et quantifier. Nous avons également montré que de nombreux paramètres déterminaient la survenue ou la propension du transfert de pB10. Ainsi, lorsque la bactérie donneuse DH5 α (pB10) se maintenaient assez longtemps dans certains milieux, quand sa présence était favorisée par une inhibition des protozoaires notamment, les chances de détection d'un événement de transfert étaient plus importantes (Figure 4A). Paradoxalement, lorsque certaines communautés microbiennes étaient trop stables car nous y avons ajouté du cycloheximide, le transfert de pB10 pouvait être masqué ou limité, ce qui suggère qu'une certaine dynamique des communautés puisse favoriser le transfert de gènes (Figure 4B) (Bellanger et al., 2014a).

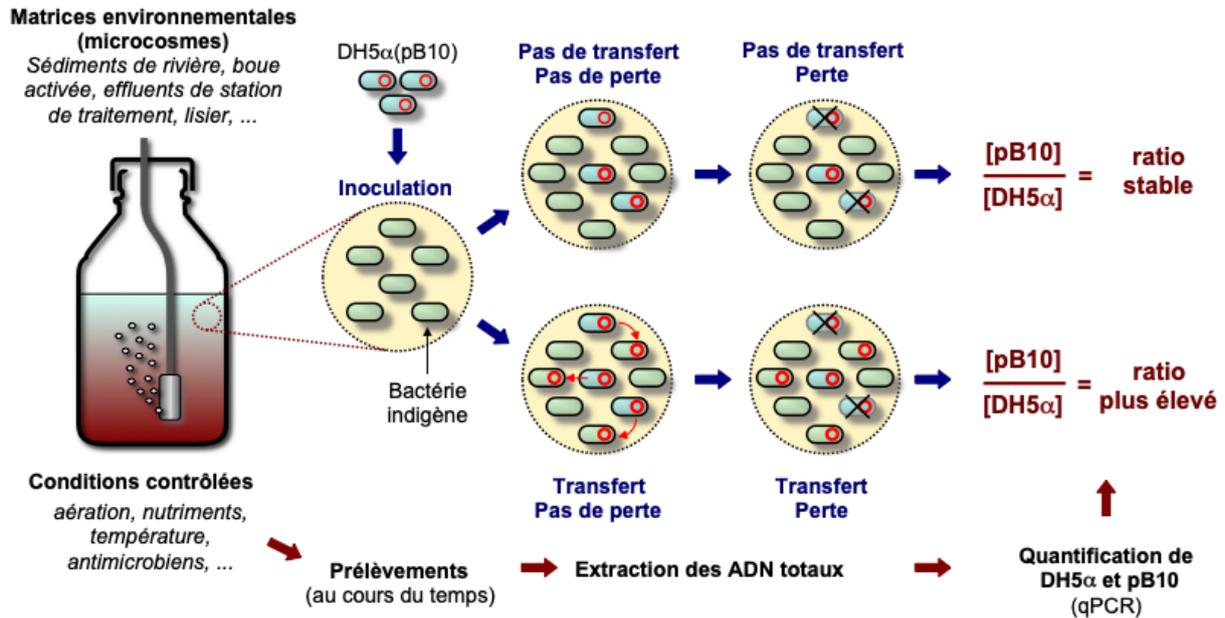


Figure 3 : Principe de l'évaluation du transfert du plasmide conjugatif pB10 après inoculation d'un échantillon environnemental maintenu en microcosme avec une bactérie DH5α donneuse (adapté de Bonot and Merlin, 2010 et Merlin et al., 2011).

Les microcosmes sont suivis au cours du temps par extractions régulières des ADN totaux. Ensuite, le nombre de copies d'*E. coli* DH5α et du plasmide pB10 sont déterminés par qPCR. La conjugaison étant un mécanisme répliatif, si le rapport des nombre de copies de pB10/DH5α reste constant, cela signifie que le plasmide ne s'est pas transféré (ou alors de manière imperceptible), par contre si ce rapport augmente, une dissémination de pB10 a été mise en évidence.

Nous avons analysé diverses communautés microbiennes échantillonnées à proximité l'une de l'autre lors d'une même campagne et qui s'étaient avérées permissives ou non au transfert de pB10 pour tenter de mettre en évidence le paramètre déterminant cette permissivité. Si une étude de la composition des communautés bactériennes par électrophorèse sur gel en gradient de température (TTGE) d'un fragment du gène de codant l'ARNr 16S ne nous a pas permis de mettre en évidence de ressemblances entre communautés permissives (Figure 5), nous avons pu montrer que les communautés microbiennes initialement riches en plasmides de type IncP étaient significativement plus permissives au transfert de pB10 (Figure 6) (Bellanger et al., 2014b). Cette observation peut paraître à première vue surprenante au regard du phénomène d'immunité à la surinfection, connu pour limiter l'acquisition de plasmides apparentés à celui déjà porté par une bactérie, et qui a été largement décrit *in vitro*. Cela suggère en réalité que, dans les conditions environnementales, la préadaptation d'une bactérie au portage de plasmides d'une certaine famille, en terme réduction du coût de ce portage (fitness), prévaut sur la baisse d'efficacité de transfert due à l'immunité à la surinfection.

Au total, la liste des paramètres/facteurs influençant le transfert de pB10 mis en évidence est relativement diverse. La détection du transfert de pB10 s'est avérée matrice-dépendante, échantillon-dépendante ou encore prédateurs-dépendante. Nous avons donc progressé dans notre compréhension de la dissémination des éléments conjugatifs dans le contexte environnemental. Il nous est également apparu fort hasardeux d'estimer à priori des fréquences de transfert dans un environnement donné ou d'extrapoler des phénomènes caractérisés *in vitro*, le plus souvent avec des bactéries modèles, à la complexe réalité des phénomènes environnementaux. Les méthodes

culturelles ou d'acquisition d'un phénotype de fluorescence utilisées pour étudier les transferts de gènes dans l'environnement font face à de nombreux biais techniques et méthodologiques (Bellanger et al., 2014a). Bien que dépourvue de ces biais, l'approche par qPCR que nous avons développée nous est aussi apparue de mise en œuvre fastidieuse. Nous avons donc développé une approche complémentaire utilisable en amont des études de microcosmes par qPCR, ce qui sera développé plus loin dans le paragraphe §3.2.1. Brièvement, cette approche permet de chercher des conditions permissives ou stimulatrices du transfert conjugatif *in vitro* avant de les tester par la suite en microcosmes.

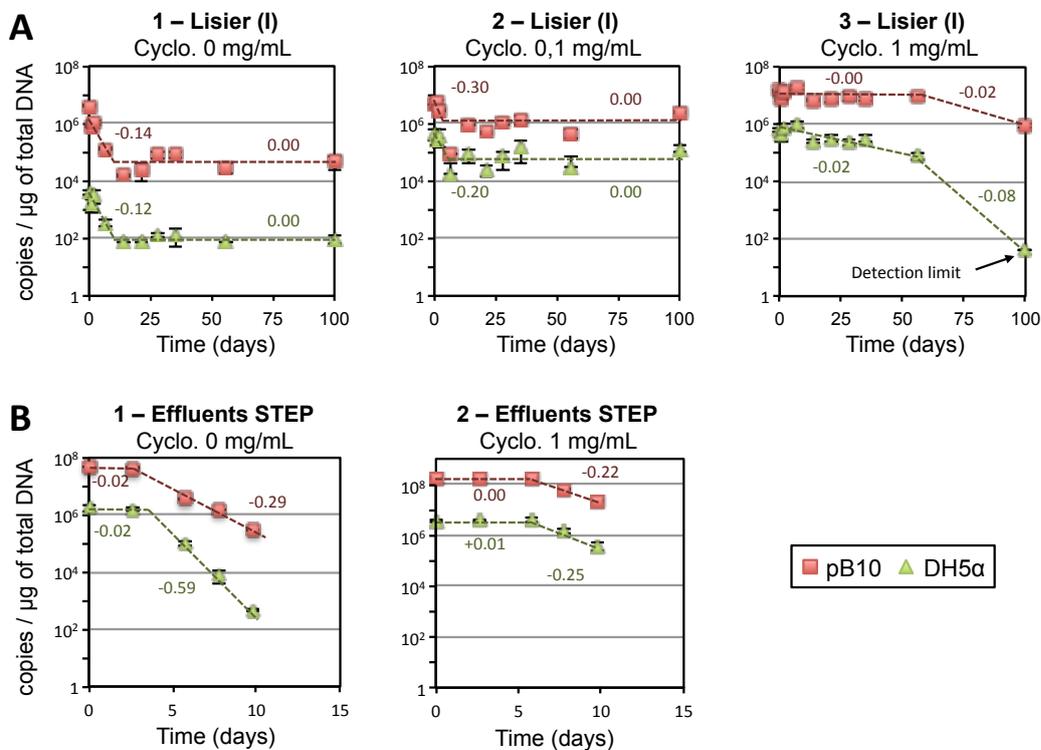


Figure 4 : Suivi du transfert de pB10 en matrices environnementales (adapté de Bellanger et al, 2014a).

La stabilité de pB10 (carrés) et d'*E. coli* DH5α (triangles) a été déterminée au cours du temps après inoculation de microcosmes de lisier (A) ou d'effluents de station d'épuration (STEP) (B), traités ou non avec du cycloheximide (0, 0,1 ou 1 mg/mL). Chaque symbole représente la moyenne des valeurs issues de qPCR réalisées en triplica sur des extraits d'ADN communautaires totaux. Les barres d'erreur représentent les écarts-types à ces moyennes. Les chiffres représentent les pentes des droites en pointillées (taux de disparition en log du nombre de copies/jour), soient les vitesses de disparition des marqueurs.

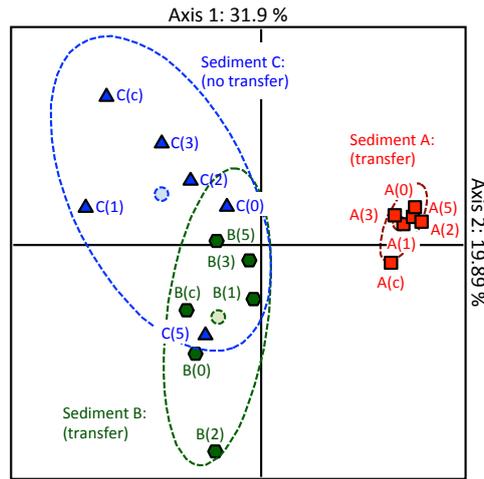


Figure 5 : Tentative de mise en lumière du caractère permissif de diverses communautés microbiennes environnementales vis-à-vis du transfert de pB10 par TTGE (adapté de Bellanger et al, 2014b).

Analyse en composantes principales des données d'intensité de bande issues de profils TTGE effectués sur des fragments du gène ADNr 16S amplifiés à partir des ADN totaux de microcosmes de sédiments. Les microcosmes A, B ou C ont été échantillonnés avant (c) ou 0, 1, 2, 3 et 5 jours après l'inoculation avec *E. coli* DH5 α (pB10). Le transfert du plasmide pB10 n'a été détecté que dans les microcosmes A et B alors que les communautés de B et de C semblent les plus proches.

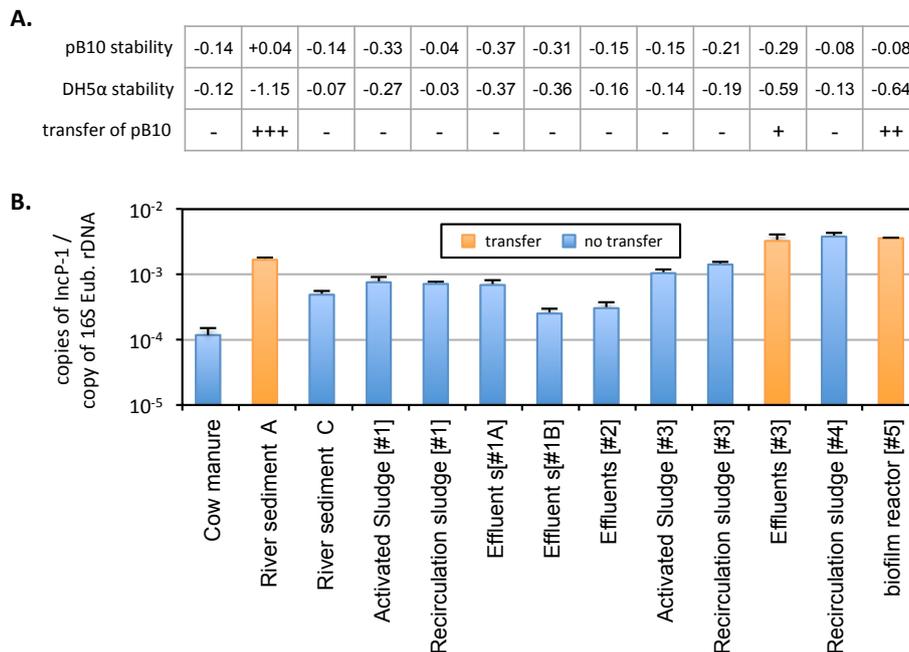


Figure 6 : Mise en lumière du caractère permissif de diverses communautés microbiennes environnementales vis-à-vis du transfert de pB10 par analyse de l'abondance relative en plasmides IncP-1 (adapté de Bellanger et al, 2014b).

A. La permissivité de chaque matrice environnementale à soutenir la diffusion du plasmide pB10 a été déduite de la comparaison des stabilités relatives du plasmide pB10 et de la bactérie donneuse *E. coli* DH5 α dans les microcosmes au cours de la période étudiée (taux de disparition en log/jour). B. Abondances relatives en plasmides IncP-1 dans les communautés échantillonnées à t=0. Chaque histogramme représente une moyenne de 3 valeurs obtenues à partir de qPCR en triplica et les barres d'erreur en représentent les écarts-types. Les communautés permissives sont initialement plus riches en plasmides IncP-1 ($p=0,02$; test T de Student)

3.1.4 Stabilité et toxicité de nanoparticules métalliques sur des systèmes bactériens

Post-Doctorat (11/2012-08/2013), co-tutelle LCPME et LIEC (Laboratoire des Interdisciplinaires des Environnements Continentaux UMR7360 CNRS-UL), Université de Lorraine, Nancy.

Sujet : Bioperception, toxicité et stabilité de quantum dots d'oxyde de zinc

Résultats : Démonstration de la relation entre dissolution de nanoparticules et stress métallique – Impact de la nature et de l'état physiologique des bactéries sur la stabilité des nanoparticules – Mise au point d'une approche moléculaire de quantification des stress oxydants provoqués par les nanoparticules illuminées.

Domaines de compétences : microbiologie, physiologie bactérienne, biologie moléculaire.

Après un premier Post-Doctorat au LCPME, j'ai été recruté par Christophe Merlin pour un second CDD afin de travailler sur le projet ANR NanoZnOTox qui visait à étudier la toxicité et la stabilité d'un nouveau type de nanoparticules métalliques, les Quantum Dots (QD). En effet, les grands progrès réalisés récemment en nanotechnologie et en science des matériaux ont conduit à la synthèse et l'utilisation de nombreux QD métalliques photoactifs dans les LED ou les panneaux photovoltaïques sans que l'ensemble des propriétés et risques associés à leur taille nanométrique et leur réactivité ne soient réellement identifiés. Malgré les apparences, ce projet se place dans une thématique relativement proche de mes travaux sur les transferts de gènes car il se penche également sur les mécanismes mis en jeu par les bactéries pour s'adapter ou réagir à leur environnement.

Durant ce travail, la stabilité de différents QD à cœur d'oxyde de zinc (ZnO) a été analysée en l'absence et en présence de matériel biologique, à savoir l'entérobactérie *E. coli* MG1655 ou la bactérie tellurique résistante aux métaux *Cupriavidus metallidurans* CH34. Nous avons montré, par l'utilisation de spectrométrie de masse et de biosenseurs sensibles aux ions Zn^{2+} , qu'une co-incubation avec des bactéries mortes ou vivantes pouvait déstabiliser des QD ZnO, augmenter leur dissolution et donc la libération d'ions métalliques toxiques (Figure 7) (Bellanger et al., 2015). L'état physiologique des bactéries est également apparu comme un facteur impactant la stabilité des QD, soulignant les relations étroites et complexes entre nanoparticules métalliques et cellules vivantes. Ce travail a aussi permis le développement d'un nouveau test permettant la mise en évidence et la quantification des dommages provoqués sur des molécules biologiques par les espèces réactives de l'oxygène émises par des QD lorsqu'ils sont illuminés (Bellanger et al., 2019). En effet, cette mise en évidence est loin d'être triviale et aucun test biologique standard et robuste n'avait jusque là été proposé. Le test développé est basé sur une détermination de l'intégrité de molécules d'ADN co-incubées avec des QD illuminés ou non grâce à la mesure de l'amplificabilité de ces ADN par qPCR. Nous avons pu déterminer que la nature des fonctions chimiques à la surface des QD, qui leur permet d'être mis en suspension en milieux aqueux, impacte le type et la quantité des espèces réactives de l'oxygène produites (Figure 8). De plus, la nature de ces fonctions chimiques de surface peut permettre des interactions plus ou moins étroites avec les biomolécules et donc provoquer plus ou moins de dommages à celles-ci.

Ces travaux pluridisciplinaires mêlant microbiologie et physicochimie sont délicats dans le sens où ils nécessitent de comprendre les enjeux et problématiques de disciplines qui ne sont pas les nôtres. Cependant, les résultats qu'ils permettent d'obtenir sont d'autant plus riches et peuvent être analysés grâce à des méthodologies et sous des points de vues différents et complémentaires qui enrichissent fortement la compréhension de phénomènes propres à notre discipline. Ce type d'approches pluridisciplinaires a été de plus en plus mis en œuvre dans mes travaux après cette étude portant sur la toxicité des QD à cœur de ZnO.

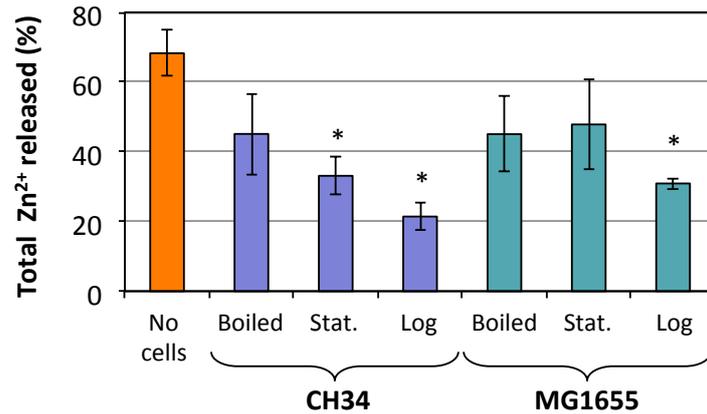


Figure 7 : Quantification du Zn²⁺ libéré par des quantum dots d'oxyde de zinc co-incubés 24h dans un dispositif de dialyse avec des cellules bactériennes (adapté de Bellanger et al, 2015).

Les expériences ont été effectuées à trois concentrations initiales de QD : 3×10^{-3} (a), 3×10^{-4} (b) et 3×10^{-5} M équivalent Zn (c). Des suspensions de cellules en phase de croissance logarithmique (Log) ou stationnaire tardive (Stat.) ont été ajoutées à une DO₆₀₀ finale = 0,3. Les cellules bouillies (Boiled) ont été préparées à partir de bactéries en phase stationnaire tardive. Chaque valeur est la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes et les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard à la moyenne. Les étoiles noires indiquent des valeurs statistiquement différentes des témoins (QD sans cellules ; No cells) à $p \leq 0,01$ (test T de Student).

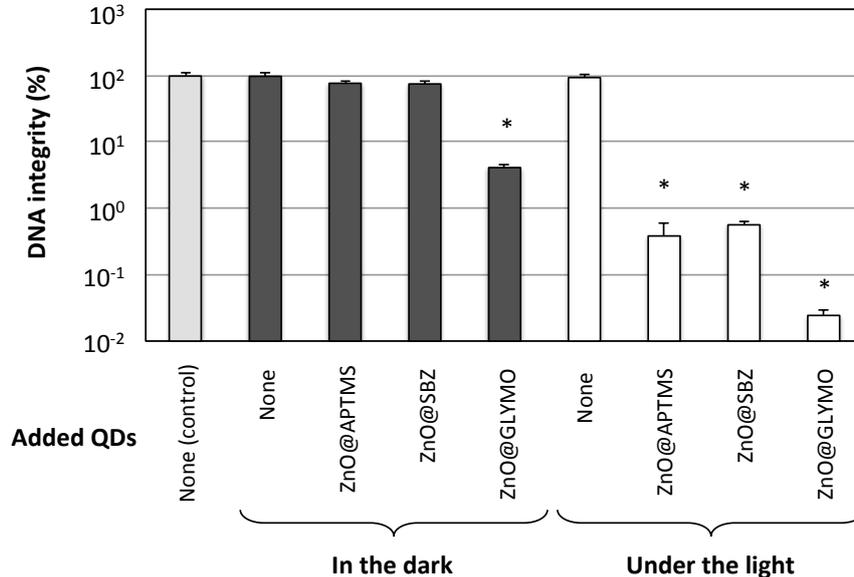


Figure 8 : Endommagement photo-induits d'un ADN par des quantum dots d'oxyde de zinc (adapté de Bellanger et al, 2019a).

Quantification de l'intégrité de l'ADN plasmidique pBELX (3169 pb, Bellanger et al, 2014b) après une exposition de 10 minutes à des quantum dots ZnO@APTMS, ZnO@SBZ et ZnO@GLYMO à $1,6 \times 10^{-3}$, $1,5 \times 10^{-3}$ et $1,8 \times 10^{-3}$ MZnEq respectivement, avec ou sans irradiation lumineuse (spectre blanc, éclairage de 9 klux). L'intégrité de l'ADN a été estimée par qPCR et est donnée sous forme de pourcentage de ce qui a été obtenu pour les contrôles avec ADN non traité. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 6 valeurs (2 expériences indépendantes avec quantification en triplica). Les étoiles représentent les valeurs significativement différentes des contrôles réalisés dans l'obscurité ou sans illumination en absence de QD ($p < 0,05$; test T de Student).

3.2 Activités de Recherche depuis septembre 2014

Lors de mon ATER au LCPME durant l'année 2013-2014, j'ai participé à la rédaction avec Christophe Merlin du projet ANR « RéguloMobile » que nous avons soumis avec succès et qui portait sur l'effet des antibiotiques en doses sub-inhibitrices sur l'activité de promoteurs contrôlant la mobilité de plusieurs EGM. Le projet ANR « MobiSed » et le travail de thèse de Magali de la Cruz-Barrón (2015-2018) nous ont également permis de débiter un travail de recherche pluridisciplinaire sur la compartimentation de deux types d'EGM, les intégrons de classe 1 et les plasmides conjugatifs de type IncP-1, dans la rivière Orne. Enfin, ces deux projets ANR nous ont conduit à développer une thématique associée à l'occurrence et au comportement dans les environnements aquatiques d'un autre élément mobile, l'ICE SXT. Ce dernier EGM est la base du sujet de thèse de Véronica Roman (2017-2020) et du projet SQUARESIST financé par l'Anses.

L'ensemble de ces projets de recherche ainsi que mon premier Post-Doctorat au LCPME ont pour points communs de se focaliser sur l'étude des EGM et de l'antibiorésistance. Avant de présenter plus en détail ces projets, je commencerai ce chapitre en évoquant le contexte global de mes travaux au LCPME depuis 2014 avec un rappel du problème de la résistance aux antibiotiques auquel nous faisons face et du rôle des EGM dans l'émergence et l'expansion de ce problème.

3.2.1 De l'intérêt d'étudier l'antibiorésistance et les éléments génétiques mobiles dans l'environnement

L'antibiorésistance chez certaines bactéries pathogènes et les échecs thérapeutiques qu'elles entraînent atteignent désormais de tels niveaux que certains auteurs anticipent un quasi-retour à l'ère pré-antibiotique (Levy and Marshall, 2004; Roberts and Simpson, 2008). D'autres auteurs prévoient que les infections par bactéries résistantes aux antibiotiques (BRA) constitueront la principale cause de mortalité mondiale d'ici 2050 (Kraker et al., 2016; O'Neill, 2014). L'antibiorésistance et son expansion représentent donc un défi sociétal majeur.

Devant l'accumulation des démonstrations d'échanges de bactéries antibiorésistantes entre Humains et animaux, l'intensification des échanges de marchandises et de personnes au niveau mondial ou la pollution croissante des écosystèmes, il est apparu évident de considérer le problème de l'antibiorésistance d'un point de vue global tenant compte à la fois des médecines humaine et vétérinaire et de notre environnement (Laxminarayan et al., 2013; Stokes and Gillings, 2011). Cette prise de conscience a conduit six grandes organisations internationales - l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE), le Fonds des Nations Unies pour l'Enfance (UNICEF), le Bureau du Coordonnateur des Nations Unies pour la Grippe (UNSC) et la Banque Mondiale - à proposer le cadre d'une stratégie mondiale pour le développement de collaborations et de communications interdisciplinaires : le concept « One Health ». Cette nouvelle approche du problème de l'antibiorésistance a également mise en lumière le rôle central qu'y joue l'environnement. En effet, l'environnement et ses diverses communautés microbiennes sont à la fois les récepteurs de nombreuses pollutions d'origines anthropiques, comme les effluents hospitaliers, urbains, agricoles ou industriels, mais aussi un réservoir probable de gènes de résistance aux antibiotiques (GRA) et de BRA (Berendonk et al., 2015; Finley et al., 2013). De part les effluents qu'ils collectent et leur densité en microorganismes, les stations d'épuration, les réservoirs de lisier ou fumier, et les milieux dans lesquels sont rejetés les eaux traitées sont suspectés d'être des lieux clés de la dissémination des BRA/GRA et sont donc particulièrement étudiés (Ezzariai et al., 2018; Guo et al., 2017; Michael et al., 2013; Rizzo et al., 2013).

Par ailleurs, les GRA ne sont pas distribués de manière homogène dans les génomes mais sont très fréquemment regroupés physiquement au sein d'EGM tels que les transposons, les

plasmides, les intégrons ou les îlots génomiques (Frost et al., 2005; Partridge et al., 2018). Ces EGM peuvent être conjugatifs, mobilisables par un élément conjugatif, transférés passivement par transformation ou même spécifiquement transduits en présence de certains phages (Frost et al., 2005; Novick et al., 2010; Partridge et al., 2018). De nombreux EGM étant riches en GRA, leur transfert s'est révélé prépondérant dans l'émergence de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques (Partridge et al., 2018; Stokes and Gillings, 2011). En conséquences, certains GRA/EGM ont été recherchés dans diverses analyses métagénomiques environnementales pour tenter de mettre en évidence de possible niches particulièrement riches en antibiorésistance et permissives aux transferts horizontaux (Bengtsson-Palme et al., 2017; Guo et al., 2017). Cependant, ces approches de métagénomiques « haut débit » souffrent de limitations techniques telles que la taille réduite des séquences d'ADN habituellement obtenues, les biais/erreurs dans les bases de données de GRA/EGM disponibles, ou l'impossibilité d'identifier la bactérie hébergeant les GRA/EGM (Bengtsson-Palme et al., 2017; Larsson et al., 2018). Ces limitations peuvent être partiellement surmontées à l'aide d'approches plus focalisées telles que celle que nous avons développée par qPCR lors de notre étude de pB10 (cf §3.1.3) (Bonot and Merlin, 2010; Larsson et al., 2018). Certains EGM semblant fortement impliqués dans l'accumulation puis la dissémination de GRA d'intérêt clinique, tels que les intégrons de classe 1 et les plasmides conjugatifs IncP-1, ont aussi été surveillés par des approches basées sur la qPCR dans divers environnements en tant qu'indicateurs globaux ou proxys des nombreux GRA qu'ils sont connus pour habituellement véhiculer (Jechalke et al., 2015; Stalder et al., 2014).

3.2.2 Effet des antibiotiques en doses sub-inhibitrices sur l'activité d'éléments génétiques mobiles

Il a été montré pour de rares EGM que ceux-ci peuvent répondre à une certaine diversité de stimuli. La nature de ces signaux inducteurs varie pour chaque EGM, mais il existe des stimuli communs à plusieurs EGM. Ces stimuli incluent l'induction de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (réponse SOS RecA-dépendante), des molécules secrétées par de potentiels bactéries receveuses (phéromones sexuelles) ou par les bactéries donneuses lors de certaines phases de croissance (quorum sensing), ou enfin des mécanismes liés aux avantages sélectifs conférés par les gènes portés par les EGM (Johnson and Grossman, 2015 et références incluses). Certains EGM sont connus pour répondre à plusieurs de ces types de stimuli. Ainsi, ICEBs1 de *Bacillus subtilis* est inductible à la fois par la réponse SOS et le quorum sensing (Johnson and Grossman, 2015). Parmi les inducteurs d'EGM, les antibiotiques et les agents chimiques ou physiques induisant la réponse SOS comme les fluoroquinolones ou les ultra-violets tiennent une place prépondérante (Tableau 1). La littérature rapporte aussi que l'ICE Tn916, portant le gène *tet(M)* de résistance à la tétracycline, voit ses fréquences d'excision et de transfert augmentées d'un facteur 10 à 100 en présence de cet antibiotique (Celli et al., 1997; Manganelli et al., 1995). Les intégrons de classe 1 sont quant à eux régulés par la réponse SOS qui augmente la fréquence de remaniement et d'acquisition de cassettes de gène (Cambray et al., 2011; Guerin et al., 2009). Ainsi, au delà de leurs propriétés bactériostatique ou bactéricide, les antibiotiques utilisés en thérapeutique, prophylaxie ou à des fins de promotions de croissance animale, peuvent aussi paradoxalement apparaître comme des stimulateurs de la dissémination des GRA. Les effets et étendues réels de ces stimulations de la dissémination des GRA en conditions naturelles d'utilisation des antibiotiques restent encore à explorer.

Par ailleurs, le bilan de nos travaux sur l'étude du transfert du plasmide conjugatif IncP-1β pB10 dans différentes matrices environnementales maintenues en microcosmes (cf §3.1.3) nous ont montré les limites de notre approche par qPCR. En effet, en voulant nous approcher au plus près d'une condition naturelle pour les communautés microbiennes grâce à l'utilisation de faibles inocula de bactéries donneuses, la grande variabilité des paramètres biologiques régnant au sein d'un microcosme (prédation par les protozoaires, stabilité/dynamique des communautés, ...) est apparue un frein à une compréhension claire d'événements dont la survenue devenait imprévisible.

Reproduire un tel type d'étude avec d'autres EGM paraissait aléatoire en terme de résultats et très fastidieux. Nous avons donc imaginé une approche se plaçant plus en amont en nous focalisant sur les stimuli qui peuvent déclencher l'expression des promoteurs des gènes de mobilité d'un panel d'EGM, et nous sommes dans un premier temps concentrés sur les activités stimulatrices des antibiotiques en doses sub-inhibitrices (Figure 9). Cette approche s'est concrétisée au travers du projet ANR « RéguloMobile », porté par C. Merlin, qui s'est déroulé de janvier 2014 à juillet 2018.

Dans le projet « RéguloMobile », nous avons choisi d'étudier les promoteurs de 5 EGM : l'ICE Tn916 d'*Enterococcus faecalis*, l'ICE SXT de *Vibrio cholerae*, les îlots SSCmec de *Staphylococcus aureus*, le plasmide conjugatif pB10 et l'îlot génomique mobilisable SGI1 de *Salmonella spp.* Au début de ce projet, seuls les 2 premiers de ces EGM étaient connus comme inductibles par les antibiotiques en doses sub-inhibitrices (Tableau 2). Au total, quatre-vingt promoteurs ont été isolés et clonés, ce qui a conduit à la création de 235 bactéries rapportrices (contrôles inclus). Ces bactéries ont été exposées à 50 à 60 antibiotiques en triplica, ce qui a généré près de 11500 combinaisons antibiotique/bactérie. Cette masse de données nous a amené à développer une collaboration avec le Pr. Cédric Pradalier (Georgia Tech Lorraine), spécialiste de l'analyse d'images. Il a conçu puis amélioré un logiciel dédié nous permettant d'extraire de manière automatique les données contenues pour chaque pixel afin de déterminer de manière robuste les facteurs d'induction des promoteurs par les antibiotiques. Cette méthode et le logiciel *ad hoc* ont fait l'objet d'un dépôt de déclaration d'invention auprès de la société SAYENS (précédemment « Sociétés d'Accélération du Transfert de Technologies du Grand Est »).

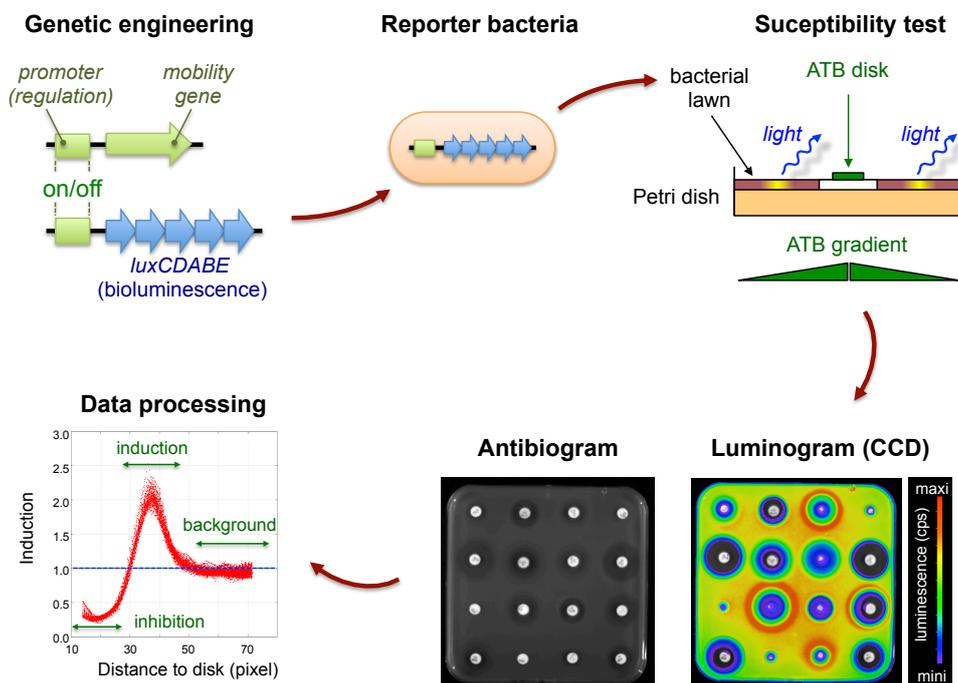


Figure 9 : Stratégie expérimentale d'étude de l'effet des antibiotiques en doses sub-inhibitrices sur des promoteurs d'éléments génétiques mobiles.

Les promoteurs identifiés *in silico* sont clonés dans un système rapporteur portant l'opéron *lux* de bioluminescence afin de créer des biosenseurs bactériens. Ces biosenseurs sont exposés à des gradients de diffusion d'antibiotiques sur gélose à la manière d'un antibiogramme tandis que l'émission de bioluminescence est enregistrée par une caméra CCD de haute sensibilité. Les données obtenues sont alors analysées par un logiciel développé spécifiquement par C. Pradalier (Georgia Tech-Lorraine) pour extraire les facteurs d'induction des promoteurs par les antibiotiques.

Tableau 2 : Liste quasi-exhaustive des éléments génétiques mobiles vecteurs d'antibiorésistance connus comme inductibles par les antibiotiques ou les ultra-violets (UV).

EGM (nature)	Stimulateurs	Effets / Mécanismes	Références
CTnDOT (ICE)	Tétracycline	Transfert x 1000 / Atténuation	Wang et al., 2005; Whittle et al., 2002
Tn917 (transposon)	Erythromycine	Transposition x 6 / Atténuation	Clewell et al., 1982
Tn916/Tn1545 (ICE)	Tétracycline	Excision et Transfert x 100 / Atténuation	Celli et al., 1997; Manganelli et al., 1995
SXT/R391 (ICE)	Quinolones, UV, Mitomycine C	Excision et Transfert x 300 / Atténuation	Beaber et al., 2004; McGrath et al., 2005
Intégrons	Quinolones, UV, Mitomycine C	Excision et Intégration de cassettes de gènes x 5 à 40 / Réponse SOS	Cambray et al., 2011; Guerin et al., 2009
SCCmec (îlots génomiques)	β -lactames, Quinolones Sulfaméthoxazole, Triméthoprime, UV	Excision et Intégration de l'îlot x 10 à 10 ⁵ / Réponse SOS	Liu et al., 2017

L'utilisation des souches rapportrices construites à partir de *S. aureus* (SCCmec) a été très délicate car, bien que le vecteur de clonage utilisé soit basé sur un réplicon de *S. aureus*, les constructions génétiques utilisées se sont avérées instables. Ainsi, les souches rapportrices de *S. aureus* n'ont pas pu donner de résultats satisfaisants, comme l'auraient été ceux de mettre en lumière les inductions déterminées récemment des îlots SCCmec par les β -lactames et les antibiotiques inducteurs de la réponse SOS (Liu et al., 2017) (Tableau 2). Le projet a donc été poursuivi avec l'analyse des seuls profils de réponse obtenus avec des souches rapportrices dérivées de Tn916, SXT, pB10 et SG11.

Les effets de modulation des promoteurs ont majoritairement été observés avec des molécules ciblant des processus cellulaires tels que le métabolisme de l'ADN ou la traduction. Jusqu'à présent, les résultats les plus aboutis ont été ceux obtenus avec Tn916. Si nous avons bien retrouvé l'effet connu des tétracycline sur cet EGM, nous avons également pu déterminer que les antibiotiques appartenant aux groupes des MLS (macrolides-lincosamides-streptogramines) et la spectinomycine induisaient également le promoteur central de la région régulatrice de cet élément (Scornec et al., 2017). Après avoir déterminé leurs concentrations d'induction optimales en microplaques, nous avons confirmés que ces antibiotiques induisaient effectivement le transfert conjugatif de Tn916 d'un facteur 40 à 2300, et que les concentrations inductrices pour un même antibiotique pouvaient s'étaler sur une gamme de plus de 3 ordres de grandeur en deçà de leur concentration minimale inhibitrice (CMI) (Figure 10).

Nous avons également déterminé que, si l'induction du promoteur central de Tn916 par les tétracyclines était dépendante de la présence de cet EGM, celle provoquée par les MLS et la spectinomycine est indépendante. Cela nous a tout d'abord conduit à proposer un nouveau modèle de régulation pour Tn916 (Scornec et al., 2017). Mis à part les mécanismes d'induction d'EGM par la réponse SOS qui sont déjà bien caractérisés, nos résultats surprenant avec les MLS et la spectinomycine ont ensuite démontré, pour la première fois à notre connaissance, l'existence d'un phénomène de dissémination induite d'antibiorésistance sans aucun lien avec le GRA transféré. Enfin, les concentrations d'antibiotiques inductrices optimales se sont avérées toutes proches de leurs CMI respectives. Elles seront donc probablement le plus fréquemment rencontrées lors d'une antibiothérapie, dans des eaux usées très chargées ou dans certains environnements fortement impactés par des industries pharmaceutiques négligentes (Brown et al., 2006; Chang et al., 2010; Fick et al., 2009; Kuchta and Cessna, 2008; Osono and Umezawa, 1985; Zhou et al., 2013). Ces observations soulèvent la question des conséquences collatérales méconnues à ce jour que pourraient avoir l'utilisation d'une molécule sur la dissémination de la résistance envers un autre antibiotique.

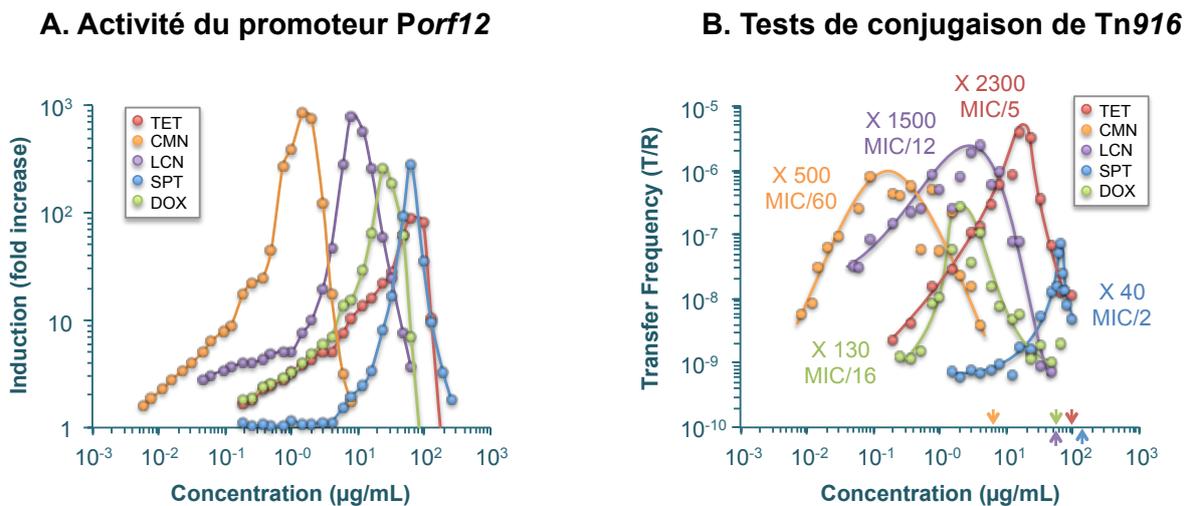


Figure 10 : Effet d'antibiotiques en doses sub-inhibitrices sur l'activité du régulateur central de Tn916, *orf12*, et son transfert conjugatif (d'après Scornec et al., 2017).

A. Bioluminescence produite par la souche *E. faecalis* JH2-2::Tn916 (pSHlux::*Porf12*) cultivée 7h en microplaque 96 puits en présence d'antibiotiques. B. Effet d'une culture de 16h de la souche *E. faecalis* JH2-2::Tn916 en présence d'antibiotiques sur la fréquence de transfert de Tn916 (fréquence exprimée en Transconjugant/Receveuse). Les valeurs de CMI sont indiquées sur la figure B par de petites flèches sur l'axe des abscisses. Les valeurs des concentrations les plus actives pour chaque antibiotique sont exprimées en fractions de leur CMI respectives, et les facteurs d'induction précisés en multiples de la fréquence de transfert conjugatif sans induction.

Notre protocole d'analyse des données de luminescence de bactéries rapportrices a aussi été utilisé pour identifier les antibiotiques actifs et les promoteurs inductibles de pB10, SXT et SGI1. Tout d'abord, pour pB10, la plupart des promoteurs se sont révélés régulés par le plasmide lui-même, qui exerce notamment un effet inhibiteur sur les fonctions de transfert, et pour lequel aucun des antibiotiques ne semblent interférer. Ensuite, pour SGI1, l'activité des promoteurs testés jusqu'à présent est apparue profondément liée à la nature de la souche rapportrice et seuls 3 promoteurs produisant une luminescence supérieure à la limite de quantification chez toutes les souches testées ont été mis en évidence. L'activité stimulatrice des plasmides IncA/C sur les promoteurs de SGI1 qu'ils mobilisent spécifiquement ont été observés, comme le laissait supposer les données de la littérature (Carraro et al., 2015, 2014; Kiss et al., 2015; Poulin-Laprade et al., 2015). Un approfondissement de ces observations et la poursuite de l'étude de cet élément sont encore en cours. Enfin, pour SXT, les premiers résultats ont également confirmés les données de la littérature sur la sensibilité de cet EGM vis-à-vis de la réponse SOS (Beaber et al., 2004). L'étude de cet élément est également toujours en cours et constitue le cœur du projet de thèse de Véronica Roman (voir §3.2.4).

3.2.3 Compartimentation des intégrons de classe 1 et des plasmides IncP-1 dans un écosystème anthropisé, la rivière Orne

Si plusieurs sources anthropogéniques de BRA, GRA et EGM comme les stations d'épuration ont bien été identifiées (Berendonk et al., 2015; Finley et al., 2013) et que certains travaux rapportent leur accumulation dans des écosystèmes tels que les sols et les rivières (Allen et al., 2010; Knapp et al., 2010; Pruden et al., 2006), le devenir ou le transport de ces polluants biologiques dans l'environnement reste encore méconnus. Comprendre ces phénomènes est pourtant de première importance pour préserver les environnements récepteurs et limiter le risque de dissémination des GRA, EGM et BRA. Parce qu'ils accumulent fréquemment de nombreux GRA, quelques EGM comme les intégrons de classe 1 et, dans une moindre mesure, les plasmides conjugatifs IncP-1, ont été recherchés et quantifiés par qPCR dans divers environnements (Jechalke et al., 2015; Stalder et al., 2014). D'autres travaux montrent également que les GRA/EGM sont plus abondants dans des écosystèmes riches en métaux ou d'autres polluants chimiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Chen et al., 2017; Pal et al., 2017). Ces observations ont conduit à l'émergence de la notion de co-sélection dans laquelle la présence d'un composé favorise la persistance/sélection de BRA/GRA. Toutefois, l'effet que ces pollutions métalliques ou chimiques pourraient avoir sur la dissémination des GRA/EGM reste à déterminer (Chen et al., 2017; Pal et al., 2017; Wang et al., 2017).

Le projet ANR « MobiSed » et l'arrivée de Magali de la Cruz-Barrón en thèse dans notre équipe, ont été l'occasion pour nous d'étudier l'origine, l'abondance et le devenir des intégrons de classe 1 et des plasmides IncP-1 dans les compartiments physiques (eau, matières en suspension et sédiments) de la rivière Orne. Cette rivière Lorraine de 85 km de long est un affluent de la Moselle fortement impacté dans le passé par les industries sidérurgique et métallurgique (chenalisation, création de barrages, rejet de cendres de hauts fourneaux, ...) et qui reste soumis aux rejets urbains et agricoles (Figure 11). MobiSed était un projet pluridisciplinaire (minéralogie, hydrologie, microbiologie, ...) basé sur des campagnes d'échantillonnage mutualisées. Ces campagnes nous ont permis d'étudier les possibles zones d'accumulation d'intégrons de classe 1 et de plasmides IncP-1, tout en pouvant comparer les données obtenues avec près d'une centaine de paramètres physico-chimiques mesurés dans nos échantillons (pH, turbidité, contenu en zinc, plomb, hydrocarbures aromatiques polycycliques, ...) et ainsi déterminer les influences des pressions anthropogéniques locales (station d'épuration, industries, ...).

Tout d'abord, la symétrie de notre schéma d'échantillonnage (3 extractions d'ADN génomique total / échantillon ; 3 qPCR / ADN total, ...) nous a permis de réaliser une analyse statistique robuste de la démarche expérimentale mise en œuvre grâce à une collaboration avec le Pr. Armand Maul, biostatisticien au LIEC (UMR7360 CNRS-UL). Nous avons ainsi pu déterminer que les fluctuations observées des abondances absolues (copies d'EGM/mL d'eau) ou des abondances relatives (copies d'EGM/copies de gène ARNr 16S) des intégrons de classe 1 et des plasmides IncP-1 ne sont pas influencées par des biais méthodologiques, mais très majoritairement par la date de prélèvement. Ces abondances sont également corrélées à l'hydrodynamique de la rivière (température, débit, électro-conductivité, concentration en oxygène dissous, ...) ce qui démontre une certaine saisonnalité de ces abondances en EGM dans l'Orne.

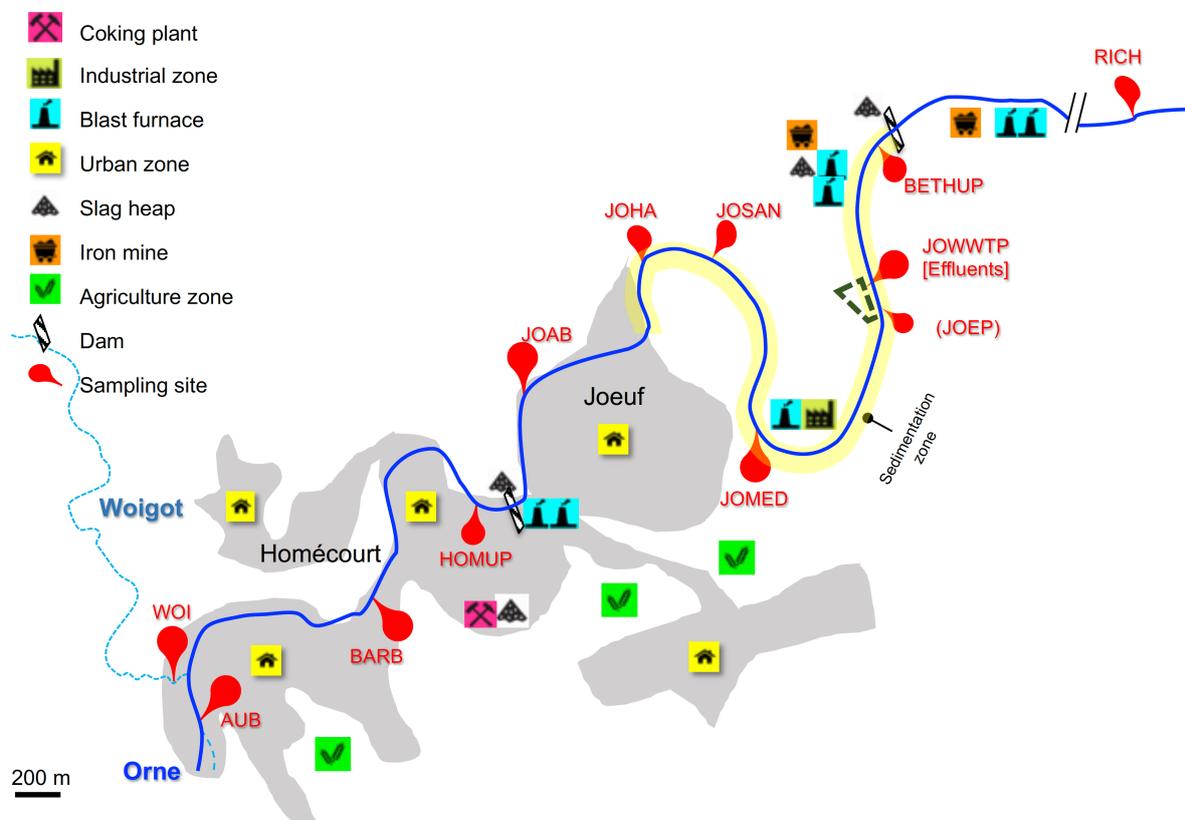


Figure 11 : Présentation de la section de la rivière Orne étudiée dans le cadre du projet « MobiSed » et de la thèse de Magali de la Cruz Barrón (2015-2018) (De la Cruz Barrón, 2018; Kanbar et al., 2017).

Les zones grises indiquent les agglomérations d'Homécourt et Joeuf. La zone jaune clair indique la portion de rivière où l'hydrodynamique est influencée par le barrage de Beth. Les sites échantillonnés durant le projet sont : Woigot (WOI), Auboué (AUB), Homécourt Barbusse, (BARB), Homécourt (amont du barrage ; HOMUP), Joeuf Abattoir (JOAB), Joeuf Haropré (JOHA), Joeuf Sainte Anne (JOSAN), Joeuf Médiathèque (JOMED), Joeuf Europepe, (JOEP), Joeuf wastewater treatment plant (JOWWTP), Beth (amont du barrage ; BETHUP) et Richemont (RICH).

Contrairement à ce à quoi nous nous attendions, cette étude a également établi l'absence d'impact visible de la station d'épuration des agglomérations de Joeuf et d'Homécourt sur le contenu en EGM dans l'eau de l'Orne. En effet, bien que les effluents de cette station d'épuration présentent la plupart du temps des abondances significativement plus élevées en intégrons de classe 1 et plasmides IncP-1 que l'eau de rivière prélevée immédiatement en amont, les effets de dilutions masquent toute différence avec les abondances relevées juste en aval. Ceci illustre que, dans une région où la ressource en eau n'est pas rare, démontrer de manière quantitative l'impact anthropogénique immédiat d'une station d'épuration sur l'abondance environnementale en EGM n'est pas si aisé. Néanmoins, en élargissant notre zone d'étude à un tronçon de 23-km de rivière (de Auboué à Richemont), nous avons pu démontrer une augmentation graduelle de l'abondance relative en intégrons alors que celle des plasmides IncP-1 a tendance à rester constante. Ces 2 EGM ont donc des sources différentes sur le tronçon étudié, les intégrons de classe 1 arrivant dans l'Orne par de multiples sources diffuses réparties tout au long de la rivière, et les plasmides Incp-1 étant plutôt intrinsèques à l'écosystème.

Ensuite, afin d'étudier la compartimentation physique des intégrons de classe 1 et des plasmides IncP-1 dans l'Orne, nous avons analysé 15 échantillons d'eau brute et les matières en suspension correspondantes prélevés sur une période de 11 mois. Nous avons pu déterminer que les abondances relatives en ces 2 EGM étaient significativement plus élevées dans les matières en suspension que dans l'eau brute avec des rapports de $2,2 \pm 0,4$ pour les intégrons et $13,3 \pm 4,0$ pour les plasmides IncP-1 (De la Cruz Barrón et al., 2018) (Figure 12). De plus, une étude de sédiments de surface (0-2 cm) a montré que ceux-ci présentent des abondances relatives en EGM similaires à celles des matières en suspension et une plus grande richesse en plasmides IncP-1 par rapport à l'eau brute.

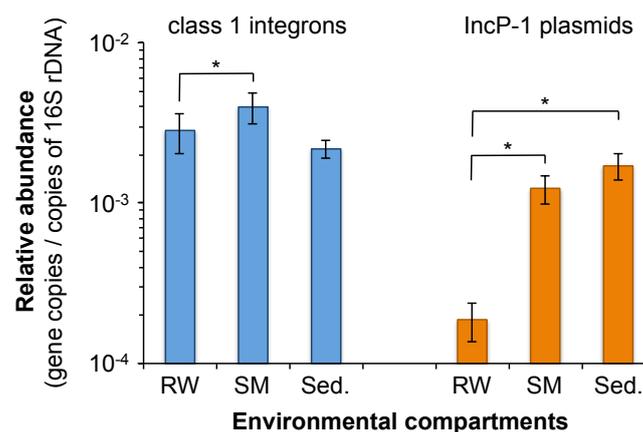


Figure 12 : Abondances relatives des intégrons de classe 1 et des plasmides IncP-1 dans les compartiments physiques de la rivière Orne (De la Cruz Barrón et al., 2018).

RW : Eaux brutes (Raw waters) ; SM : matières en suspension (Suspended materials) ; Sed. : sédiments (Sediments). Les barres d'erreur indiquent des erreurs standard à la moyenne (n = 15 pour les eaux brutes et les matières en suspension ; n = 8 pour les sédiments). Des étoiles indiquent les différences significatives entre abondances relatives ($p < 10^{-3}$; test T de Student).

Nous avons estimé que le fort enrichissement en plasmides IncP-1 dans les bactéries adhérant aux matières en suspension par rapport aux bactéries libres de l'eau brute pouvait être expliqué (i) par le fait que les plasmides IncP-1 codent pour un pilus conjugatif ayant des propriétés d'adhésine de surface, et/ou (ii) par une augmentation de la fréquence de transfert des plasmides entre les bactéries agrégées au sein des matières en suspension. Nous avons en fait démontré *in vitro* que le portage d'un plasmide IncP-1 par une bactérie tend à accroître son adhésion à une surface abiotique et que cet effet prévaut sur une augmentation de fréquence de transfert du plasmide entre bactéries se développant en biofilm (De la Cruz Barrón et al., 2018). Cela suggère un phénomène d'enrichissement sélectif dans lequel les bactéries portant un plasmide IncP-1 se fixerait préférentiellement sur les matières en suspension avant de tomber dans le lit de la rivière pour former les sédiments. Les bactéries porteuses d'intégrons ne subiraient pas un tel phénomène car, si ces EGM sont fréquemment portés par des plasmides, peu d'entre eux appartiennent au groupe d'incompatibilité IncP et présentent des pili conjugatifs ayant les mêmes propriétés d'adhésine (Ghigo, 2001). Ainsi, le portage de certains EGM pourrait non seulement influencer le devenir dans l'environnement des bactéries les hébergeant mais également impacter le devenir des GRA portés par ces même EGM.

Enfin, deux carottes de sédiments prélevées sur les sites de JOSAN et BETH, soit en amont et en aval de la station d'épuration de Joeuf-Homécourt (Figure 11), ont été analysées pour déterminer leur composition géochimique et l'abondance en nos 2 EGM, en métaux et en hydrocarbures aromatiques. L'abondance absolue des 2 EGM est globalement apparue décroissante avec la profondeur des sédiments. L'abondance en plasmides IncP-1 était relativement basse et souvent sous les limites de détection ou quantification par qPCR, ce qui rend toutes analyses de cet EGM délicate. L'abondance relative en intégrons de classe 1 s'est révélée quant à elle très intéressante. En effet, une attention particulière apportées aux protocoles expérimentaux a permis de démontrer que des analyses en triplica de 50 mg de sédiments révélaient parfois une forte hétérogénéité de l'abondance relative en intégrons de classe 1 au sein des communautés microbiennes de certains segments de carottes (Figure 13). Par opposition, des analyses en triplica de ces mêmes couches à partir de 250 mg de sédiments tendaient à donner des résultats bien plus homogènes. Nous avons déterminé par électrophorèse sur gel d'acrylamide en gradient dénaturant (DDGE) d'amplicons du gène de l'ARNr 16S que la diversité microbienne au sein de chaque aliquote de 50 mg extraite n'était pas liée à l'hétérogénéité des valeurs d'abondance relative en intégrons de classe 1. Ainsi, en fonction des couches sédimentaires et de la carotte considérés, les intégrons de classe 1 étaient donc tantôt répartis de manière homogènes dans les populations microbiennes, tantôt concentrés au sein de microréservoirs localisés.

Par ailleurs, différentes corrélations positives ou négatives ont été observées entre plusieurs paramètres mesurés dans les sédiments de la carotte de BETH (Tableau 3). Ainsi, des corrélations positives entre les éléments majeurs K, Na, Ti, les lanthanides légers (La, Ce, Nd et Pr) et les abondances absolues en ADNr 16S (biomasse bactérienne totale) ou en intégrons de classe 1 ont été trouvées. Ces éléments majeurs et les lanthanides légers sont les composants principaux des particules minérales présentes dans la carotte, et leur présence suggère que les particules minérales des sédiments proviennent de l'altération du sol dans le bassin versant et du ruissellement de matière vers la rivière (Kanbar et al., 2017). Une part des microorganismes de la carotte serait donc apportée par ces mêmes ruissellements. D'autre part, les éléments traces tels que le Pb, qui n'est pas un « élément trace » compte tenu de sa forte concentration dans la carotte de BETH, sont négativement corrélés à la fois avec les abondances absolues en ADNr 16S et en intégrons. Les corrélations négatives avec le plomb pourraient suggérer une toxicité globale de ce composé envers les bactéries, y compris les bactéries porteuses d'intégrons de classe 1. De plus, si une corrélation négative entre la concentration en benzoanthracènedione, un composé aromatique polycyclique oxygéné polaire, et les abondances absolue et relative en intégrons ont été mise en évidence, aucun lien n'a été établi entre ce composé et l'abondance absolue en ADNr 16S. Ceci semble donc démontrer une toxicité spécifique du benzoanthracènedione envers les bactéries porteuses

d'intégrons. Nous en avons notamment tiré l'hypothèse que les microréservoirs d'intégrons au sein des sédiments pouvaient apparaître au court du temps suite à une évolution/adaptation des communautés microbiennes aux conditions physico-chimiques et/ou pollutions locales. Evaluer si le transfert horizontal *in situ* peut également jouer un rôle dans l'apparition de tels microréservoirs reste à ce jour difficile. Quoiqu'il en soit, l'existence de tels microréservoirs est inquiétante dans le contexte de la modification des lits de rivières (utilisation des sols) ou du changement climatique (fréquence des crues en augmentation) qui peuvent tous deux engendrer une mobilisation de dépôts sédimentaires avec le risque d'exposer davantage les installations et populations plus en aval à des bactéries riches en EGM, et probablement en GRA.

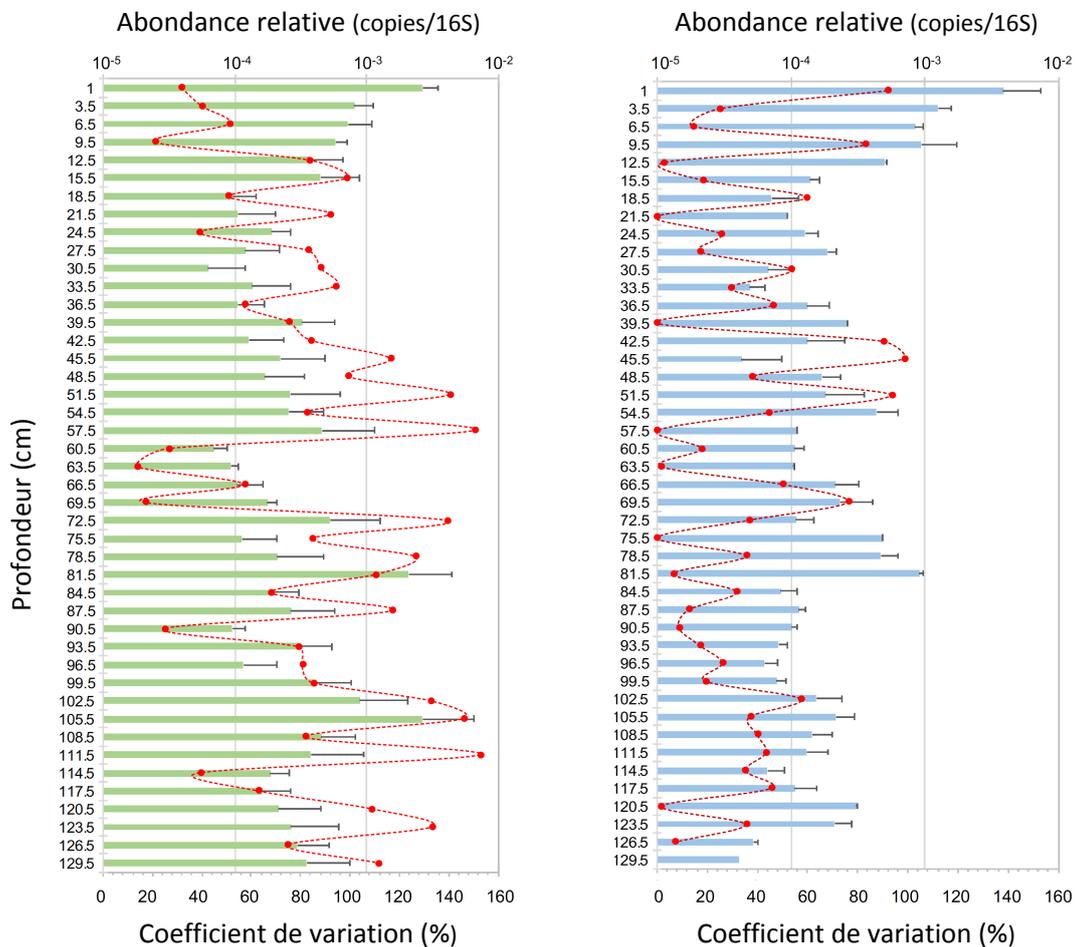


Figure 13 : Abondances relatives des intégrons de classe 1 dans la carotte de sédiments prélevée à BETH (De la Cruz Barrón, 2018).

A. Valeurs obtenues à partir de 50 mg d'échantillon extraits en triplica. B. Valeurs obtenues à partir de 250 mg d'échantillon extraits en triplica. Les histogrammes représentent la moyenne de 3 ratios (copies d'intégron/copies de 16S) tandis que les barres d'erreur indiquent les écarts-types correspondant. Les points et lignes pointillées rouges symbolisent les coefficients de variation (écarts-types exprimés en % de la moyenne).

En conclusion, ce travail nous a permis de démontrer que 2 EGM souvent utilisés comme indicateurs globaux de l'antibiorésistance dans un environnement, les intégrons de classe 1 et les plasmides IncP-1, ne se comportent pas du tout de la même manière. Cette observation met en lumière, au minimum, les précautions qu'il nous faudrait suivre dans l'utilisation de ces indicateurs et soulève la question de l'intérêt d'utiliser d'autres EGM comme « indicateurs complémentaires ». Nous avons également déterminé que le portage d'un EGM pouvait impacter *in vitro* les propriétés de surface d'une bactérie mais la question demeure de la réalité de ce phénomène lors d'interactions de bactéries avec des particules organo-minérales de natures variées en terme de compositions biologique (polysaccharides, ADN, protéines, ...) et minérale (argiles, acides humiques, ions métalliques, ...). Ces interactions bactéries porteuses d'EGM-particules pourraient produire différents phénomènes de « tri sélectif » de bactéries pouvant (i) conduire à l'apparition de compartiments enrichis en cellules porteuses d'EGM/GRA et, (ii) impacter le devenir physico-chimique des particules en sélectionnant à leur surface des bactéries aux métabolismes particuliers (ferro-oxydantes, sulfatoréductrices, ...).

Tableau 3 : Corrélations significatives entre certains marqueurs moléculaires étudiés et les paramètres globaux, la teneur en métaux et les composés aromatiques polycycliques dans les sédiments de la carotte de BETH (De la Cruz Barrón, 2018).

Marqueurs	Corrélations positives	Corrélations négatives ^A
ADNr 16S	Taille des particules (D ₅₀) ^{***} , Ba ^{**} , Ce [*] , Hf ^{***} , La ^{***} , Nb ^{***} , Nd ^{**} , Pr ^{**} , Rb ^{***} , Ta ^{***} , Zr, Si ^{***} , Al ^{**} , Na ^{***} , K ^{***} , Ti ^{***}	Profondeur ^{**} , As ^{**} , Be ^{***} , Cd ^{***} , Dy [*] , Er [*] , Eu ^{**} , Ga [*] , Ho [*] , Lu [*] , Pb ^{***} , Sc ^{**} , Sb [*] , Sm [*] , Sn ^{***} , Th [*] , Tm ^{**} , V ^{**} , W [*] , Yb ^{**} , Fe ^{**} , Mn ^{***} , Mg ^{**} , P ^{**}
Intégrons de classe 1	Taille des particules (D ₅₀) ^{***} , Ba [*] , Hf ^{**} , La [*] , Nb ^{**} , Nd [*] , Pr [*] , Rb ^{**} , Ta ^{**} , Zr [*] , Si ^{**} , Na ^{**} , K ^{**} , Ti [*]	Profondeur ^{**} , As ^{**} , Be ^{**} , Cd ^{**} , Eu [*] , Ga [*] , Lu [*] , Pb ^{**} , Sc ^{**} , Sn ^{**} , Tm ^{**} , V ^{**} , W [*] , Yb ^{**} , Fe [*] , Mn ^{**} , Mg [*] , P ^{**} , BAdione [*]
Intégrons de classe 1/ ADNr 16S	Hf [*] , Nb [*] , Zr [*] , Na [*] , K [*]	As [*] , V [*] , Mn [*] , P [*] , ^A Flt [*] , BbF [*] , BkF [*] , Bghi [*] , IP [*] , Flone [*] , Aone [*] , MAone [*] , BAdione [*] Ndione ^{**}

^A : abréviation des composés aromatiques polycycliques, Fluoranthène (Flt), Benzo[b]fluoranthène (BbF), Benzo[k]fluoranthène (BkF), Benzo[g, h, i]pelylène (Bghi), Indéno[1,2,3-c, d]pyrène (IP), 9H-fluorénone (Flone), Anthraquinone (Aone), méthylantracène-9,10-dione (MAone), Benzoanthracènedione (BAdione), naphtacène-5,12-dione (Ndione).

Significativité des corrélations déterminées à l'aide du test de Spearman : P ≤ 0,05, * ; P ≤ 0,01, ** ; P ≤ 1x10⁻³, ***

3.2.4 Rôle des ICE SXT/R391 dans la dissémination des gènes d'antibiorésistance en milieux aquatiques

La famille des ICE SXT/R391 compte à ce jour près de 90 éléments qui partagent une quarantaine de gènes conservés et qui codent fréquemment pour plusieurs gènes de résistance à des antibiotiques (*sul2*, *floR*, *strAB*, *tetA*, *dfrA1*, *acrAB-tolC*, *bla_{HMS-1}*, ...) ou des éléments traces métalliques (Cu, Zn, Co, Hg) (Bioteau et al., 2018; Liu et al., 2019). Les EGM de cette famille ont jusqu'à présent uniquement été identifiés chez 5 ordres de γ -protéobactéries, plus précisément dans diverses espèces de *Vibrio*, *Proteus*, *Shewanella*, *Escherichia* ou *Photobacterium*. Ils ont notamment été impliqués dans l'émergence de plusieurs clones épidémiques de *Vibrio cholerae*.

Le stage de Master 2 de Véronica Roman (2017) puis la poursuite de son travail en thèse de Doctorat (2017-2020) nous ont permis de développer l'étude des ICE de la famille SXT/R391 que nous avons initiée grâce au projet « RéguloMobile » (cf § 3.2.2). Depuis la fin 2018, ces travaux sont également supportés par l'Anses grâce au projet « SQUARESIST » et font l'objet d'une collaboration avec Sandrine Baron et Thierry Morin du laboratoire Anses de Ploufragan/Plouzané. L'objectif global de ce projet est d'étudier l'effet de molécules d'origine anthropique, comme les antibiotiques ou les pesticides, sur le transfert de GRA dans des environnements aquatiques *via* les ICE de la famille SXT/R391. Les trois tâches principales consistent en (i) une évaluation de la prévalence des ICE SXT/R391 dans les environnements aquatiques, (ii) une exploration de l'inductibilité des ICE SXT/R391 par des polluants anthropiques fréquemment rencontrés dans les environnements aquatiques (antibiotiques piscicoles, pesticides, ...) et, (iii) un suivi des transferts des ICE SXT/R391 en conditions environnementales soumises ou non à la présence de polluants.

L'étude de la prévalence des ICE SXT/R391 dans les environnements aquatiques est effectuée par trois approches complémentaires. La première est un criblage par PCR de banques de souches bactériennes du laboratoire Anses de Ploufragan (3000 souches isolées d'environnement piscicole et 500 souches de *Vibrio spp.*). La seconde approche est basée sur la quantification relative (copie d'EGM/copie de gène ARNr 16S) par qPCR des ICE SXT/R391 dans différents environnements aquatiques (piscicultures, étangs, rivière, station d'épuration, ...). La dernière approche de cette tâche consiste en une utilisation d'une méthode récente, l'epicPCR (Emulsion, Paired Isolation and Concatenation PCR), qui a pour but l'assignation taxonomique d'un marqueur moléculaire d'intérêt, ici les ICE SXT/R391, présent au sein d'une communauté microbienne complexe (Spencer et al., 2016) (Figure 14). La difficile mise au point de cette approche par epicPCR pour l'étude de SXT a été facilitée par le séjour d'un mois de Véronica R. chez l'inventeur de cette méthode, le Pr. Marko Virta de l'Université d'Helsinki, que nous avons connu grâce à notre implication dans l'Action COST Nereus ES1403. Au final, cette première tâche nous permettra de déterminer l'abondance globale des ICE SXT/R391, de corrélérer ou non leur présence avec diverses pressions anthropogéniques (antibiotiques, pesticides, ...) ou pratiques piscicoles, et enfin de déterminer le spectre d'hôte de cette famille d'EGM.

Nous avons d'ores et déjà dessiné des amorces et sondes spécifiques pour les différentes PCR, qPCR et epicPCR prévues d'après l'alignement des séquences des ICE SXT/R391 disponibles dans les bases de données. Le criblage des banques de souches est en cours et a donné des résultats préliminaires intéressants, notamment pour la banque de *Vibrio spp.* Les premières campagnes d'analyse de l'abondance relative des ICE SXT/R391 dans l'environnement nous ont permis de montrer que ces EGM sont présents dans des gammes de concentrations de 10^{-7} à 10^{-2} copie/copie de gène ARNr 16S, avec une moyenne proche de 10^{-3} ou 10^{-4} copie/copie de gène ARNr 16S. Cette gamme de concentrations est similaire à celle des intégrons de classe 1 ou des plasmides IncP mais la moyenne se rapproche davantage de celle de ces plasmides. Les chiffres les plus élevés obtenus, en station d'épuration et en rivière, suggèrent que ces EGM pourraient être répandus au sein des bactéries du microbiote intestinal et de certains environnements aquatiques. Les premières données issues de l'approche d'epicPCR que nous avons développée nous ont quant à eux permis d'identifier

de nouveaux genres de bactéries porteuses d'ICE SXT/R391 encore absents des bases de données tels que *Aeromonas* et *Nitricola*.

L'étude de l'inductibilité des ICE SXT/R391 par des polluants d'origine anthropiques est la poursuite directe d'une partie des travaux du projet « ReguloMobile ». Pour rappel, des biosenseurs bactériens ont été construits en isolant les promoteurs des gènes de mobilité (intégrase, relaxase, ...) de l'ICE SXT de *Vibrio cholerae* MO10 et en les clonant dans un vecteur en amont de l'opéron *luxCDABE* (Figure 9). Les premiers résultats obtenus en utilisant *E. coli* comme base de nos constructions génétiques ont confirmés les données de la littérature sur la sensibilité de SXT à la réponse SOS (Beaber et al., 2004) et aux antibiotiques connus classiquement pour déclencher cette réponse tels les quinolones (Figure 15). Nous sommes en train d'étendre nos analyses en construisant des rapporteurs à partir d'autres espèces bactériennes telles que *Vibrio cholerae* ou *Proteus mirabilis*. Ces constructions pourraient avoir un fort intérêt car il a été démontré, pour quelques espèces comme *V. cholerae* ou *Klebsiella pneumoniae*, que d'autres antibiotiques tels le chloramphénicol, la spectinomycine ou l'ampicilline pouvaient induire la réponse SOS et donc potentiellement SXT (Baharoglu and Mazel, 2014, 2011). Ce phénomène souligne la possibilité que certaines molécules ne puissent provoquer l'induction des ICE SXT/R391 dans l'environnement que dans une fraction des bactéries les hébergeant. Nous avons également démontré que, lorsqu'ils sont portés par des mutants spontanés résistants à de fortes concentrations de ciprofloxacine, les ICE SXT/R391 restent inductibles par la réponse SOS. Cela soulève la question de l'importance de ce type de mutants dans la dissémination des ICE SXT/R391 lorsque de tels antibiotiques sont utilisés à des fins thérapeutiques chez l'Homme ou l'animal. Globalement, la perspective d'identifier de la manière la plus exhaustive possible la nature des bactéries porteuses d'EGM de type SXT/R391 et la gamme des molécules inductrices de ces ICE apparaît donc avec un intérêt accru.

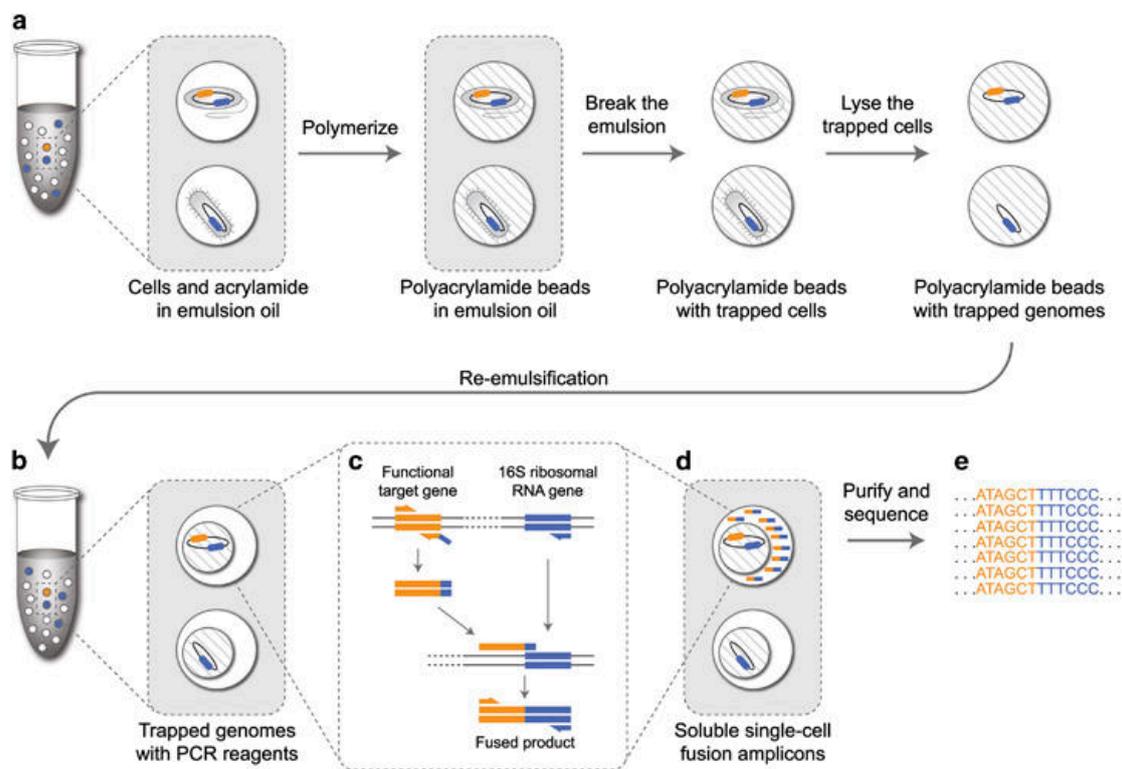


Figure 14 : Principe de l'epicPCR (Emulsion, Paired Isolation and Concatenation PCR) (Spencer et al., 2016).

Enfin, de premiers essais de suivi du transfert des ICE SXT/R391 en conditions environnementales ont été réalisés selon le protocole, présenté en Figure 3, qui est basé sur une détection par qPCR d'une bactérie donneuse et d'un EGM tous deux marqués. Des microcosmes de sédiments de la rivière Orne ont ainsi été inoculés avec une très faible quantité d'une souche d'*E. coli* porteuse d'un SXT et le transfert de l'EGM a pu être mis en évidence. Les conditions de mise en œuvre en terme d'inoculum sont volontairement aux limites de notre méthode de quantification. Elles permettent cependant de travailler en conditions réalistes avec des communautés microbiennes non-perturbées et maximisent nos chances de visualiser l'effet des molécules inductrices que nous aurons pu identifier. Ces études en microcosmes pourront également être le cadre d'une nouvelle utilisation de l'epicPCR qui pourrait nous permettre de déterminer la nature des bactéries environnementales ayant reçu l'ICE marqué. Au delà d'une preuve absolue du transfert de l'EGM marqué, l'epicPCR pourrait nous donner le moyen d'étudier *in situ* le spectre de transfert ou spectre d'hôtes receveurs des ICE SXT/R391. Des spectres de transfert pourraient être déterminés en présence de l'une des molécules inductrices identifiées et/ou en fonction de l'espèce de la bactérie donneuse.

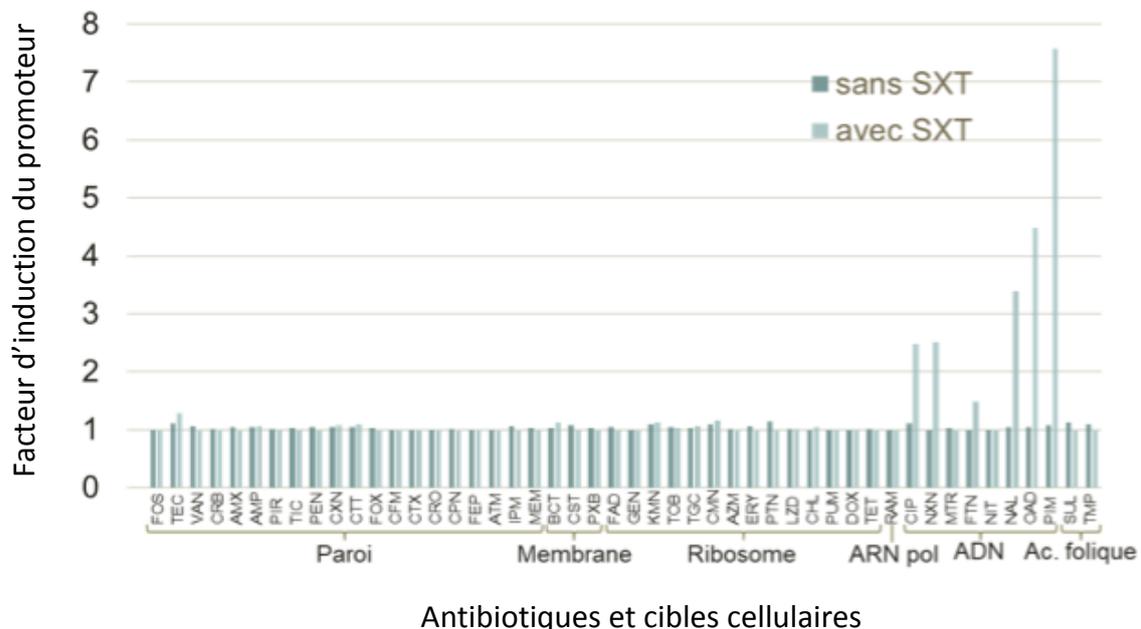


Figure 15 : Effet de 48 antibiotiques sur l'activité du promoteur du régulateur central de SXT Ps086 chez *E. coli* MG1656.

Le régulateur central de SXT est le gène *s086*. La souche MG1656 est une souche sauvage déléetée du gène *lacZ*. L'effet spécifique de la présence de SXT pour chaque antibiotique est montré par la comparaison des résultats obtenus pour les souches *E. coli* MG1656 (pSEVA236::Ps086) (sans SXT) et *E. coli* MG1656::SXT (pSEVA236::Ps086) (avec SXT). Liste des antibiotiques testés : fosfomycine (FOS), teicoplanine (TEC), vancomycine (VAN), carbénicilline (CRB), amoxicilline (AMX), ampicilline (AMP), pipéracilline (PIR), ticarcilline (TIC), pénicilline (PEN), céfalexine (CXN), céfotétan (CTT), céfoxitine (FOX), céfixime (CFM), céfotaxime (CTX), céftriaxone (CRO), céftaroline (CPN), céfépime (FEP), aztréoname (ATM), imipénème (IPM), méropénème (MEM), bacitracine (BCT), colistine (CST), polymyxine (PXB), acide fusidique (FAD), gentamicine (GEN), kanamycine (KMN), tobramycine (TOB), tigécycline (TGC), clindamycine (CMN), azithomycine (AZM), érythromycine (ERY), pristnamycine (PTN), linézolide (LZD), chloramphénicol (CHL), mupirocine (PUM), doxycycline (DOX), tétracycline (TET), rifampicine (RAM), ciprofloxacine (CIP), norfloxacine (NXN), métronidazole (MTR), nitrofurantoïne (NTR), nitroxoline (NIT), acide nalidixique (NAL), acide oxolinique (OXO), acide pipémidique (PIM), sulfamides (SUL), triméthoprime (TRM).

3.2.5 Implication des bactériophages environnementaux dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques

3.2.5.1 Etat de l'art sur la transduction dans l'environnement

Si les trois principaux mécanismes de transferts horizontaux – conjugaison, transformation et transduction – ont été largement étudiés *in vitro*, leur part respective dans les phénomènes survenant dans l'environnement reste mal connue. La grande majorité des travaux entrepris jusqu'à présent ont concerné la conjugaison et, à un degré moindre, la transformation (Elsas et al., 2002). La transduction est un mécanisme de transfert de gènes horizontal impliquant les bactériophages (ou phages), microorganismes probablement les plus abondants sur Terre (10^{30} - 10^{32} phages pour 10^{29} - 10^{31} bactéries) (Brabban et al., 2005; Chibani-Chennoufi et al., 2004). Après leur injection dans une cellule bactérienne, les génomes de phages peuvent soit entrer immédiatement dans un état réplcatif actif, conduisant à la production de nouveaux phages (cycle lytique), soit entrer dans un état de dormance (cycle lysogène). Ce second type de cycle n'est possible que pour les bactériophages tempérés qui s'intègrent dans le génome de l'hôte sous forme de prophage. Les prophages peuvent parfois sortir de leur état de dormance et ainsi entrer en cycle lytique.

Il existe deux grands mécanismes distincts de transduction. La « transduction généralisée », effectuée par des phages lytiques ou lysogènes, permet de transférer toute partie d'un génome bactérien d'une bactérie à une autre, en empaquetant/encapsidant accidentellement des fragments d'ADN bactérien à la place du génome du phage. La « transduction spécialisée », effectuée uniquement par des phages lysogènes, conduit au transfert horizontal des quelques gènes bactériens situés à proximité des sites d'insertion du prophage dans le génome bactérien. Lors de ce phénomène, l'excision imprécise d'un prophage conduit à la formation de molécules d'ADN chimériques bactérie/prophage qui sont encapsidées dans les virions nouvellement formés. Même lorsque les virions contiennent uniquement de l'ADN bactérien, ils conservent leur fonction de « seringue à acide nucléique » et permettent à l'ADN encapsidé d'être injecté dans une nouvelle bactérie réceptrice (Calendar, 2012). Un événement de transduction de gènes réussi nécessite que l'ADN injecté, ou au moins une partie de celui-ci, soit intégré dans le génome du nouvel hôte bactérien. Des fragments d'ADN bactériens transduits peuvent être intégrés dans le génome du nouvel hôte grâce à ses mécanismes de recombinaison homologue ou illégitime, tandis que des EGM transduits tels que les transposons ou les plasmides peuvent également assurer leur maintien par transposition ou réplcation autonome, respectivement (Berg et al., 1983; Calendar, 2012; Jiang and Paul, 1998). Le transfert de gènes par transduction peut également être assuré par des particules semblables à des phages, codées par les chromosomes de certaines bactéries et appelées agents de transfert de gènes ou ATG (Grüll et al., 2018).

Bien que les événements de transduction par phages infectieux ou ATG aient été bien étudiés *in vitro*, leur propension à survenir dans des environnements naturels reste encore à déterminer (Balcázar, 2018; Grill et al., 2018; von Wintersdorff et al., 2016). Des études métagénomiques ou basées sur une approche par qPCR ont montré que des GRA sont fréquemment contenus dans des capsides de phages/ATG purifiés d'environnements naturels impactés par les activités humaines (eaux de rivière, sédiments, sols) (Calero-Cáceres et al., 2017; Colombo et al., 2016; Larrañaga et al., 2018; Lekunberri et al., 2017; Muniesa et al., 2013; Ross and Topp, 2015). Les GRA sont également abondants dans les phages/ATG purifiés de matières fécales animales/humaines et de boues et effluents de stations d'épuration (Brown-Jaque et al., 2018; Calero-Cáceres et al., 2014; Modi et al., 2013; Muniesa et al., 2013; Wang et al., 2018). Cependant, un travail récent basé sur une analyse des séquences présentes dans les bases de données a montré que les génomes de phage codent rarement par eux-mêmes des GRA (Enault et al., 2017). Ceci suggère que le contenu en GRA détecté dans les phages/ATG environnementaux est principalement constitué de fragments d'ADN bactérien contenant eux-mêmes des GRA et qui ont été encapsidés. Bien que fondamentalement important pour le maintien de l'ADN entrant dans le nouvel hôte, l'association

des GRA contenus dans les phages/ATG environnementaux à des EGM n'a été explorée à ce jour que dans un travail récent dans lequel la présence d'intégrons de classe 1 a été rapportée (Yang et al., 2018).

De nombreux facteurs, d'origine anthropique ou non, peuvent stresser des communautés microbiennes environnementales et y induire la prolifération de phages, ou du tout du moins de la quantité d'ADN phagique. Ces facteurs de stress sont souvent de nature chimique : composés génotoxiques (dont certains antibiotiques), éléments traces métalliques (Cu^{2+} , Cd^{2+} ...), hydrocarbures aromatiques polycycliques (phénanthrène, pyrène, ...), biphényles polychlorés ou pesticides (Allen et al., 2010; Danovaro et al., 2003; Jończyk et al., 2011; Lee et al., 2006). Ils peuvent également être de nature physico-chimique lorsqu'une augmentation de la température, le rayonnement UV, une baisse de la concentration en ions Ca^{2+} ou un enrichissement en phosphate inorganique (eutrophisation) sont impliqués (Colomer-Lluch et al., 2014; Danovaro et al., 2003; Yue et al., 2012). Nombre de ces facteurs de stress sont couramment rencontrés dans les stations d'épuration, en tant que polluants ou en tant que procédés de désinfection, ainsi que dans les environnements dans lesquels des eaux usées traitées ou non sont rejetées. En conséquences, l'étude du contenu en GRA des phages/ATG anthropiques émis dans les effluents des stations d'épuration revêt un intérêt particulier car elle pourrait permettre l'identification de polluants et de processus favorisant la formation de particules transductrices, et participer à l'évaluation du rôle des phages/ATG dans la dissémination des GRA dans les environnements en aval (Calero-Cáceres et al., 2014).

Quelques études suggèrent que des événements de transduction se produisent dans l'environnement, en particulier lorsque celui-ci est impacté par des activités humaines (Kenzaka et al., 2007; Ross and Topp, 2015; Shousha et al., 2015). Malheureusement, comme discuté dans l'article de Ross et Topp (2015) ou la revue récente de Clara Torres-Barceló (Torres-Barceló, 2018), les approches utilisées n'ont jamais formellement permis la démonstration du transfert effectif d'un GRA dans le contexte environnemental. Très souvent, ce sont des phages isolés de l'environnement dont on étudie *in vitro* ou en microcosmes le potentiel transducteur, avec parfois même un isolement des bactéries transduites par culture (Jiang and Paul, 1998 ; Kenzaka et al., 2007). Par conséquent, les fréquences réelles de transduction des GRA dans l'environnement, à savoir leur intégration stable dans le génome d'une bactérie réceptrice après son injection dans la cellule, n'ont jamais été explorées et la propension globale du phénomène à se produire reste indéterminée.

3.2.5.2 *Projet de recherche en cours*

Ma préparation au concours de recrutement au LCPME en qualité de MCF a été l'occasion de jeter les bases d'une nouvelle thématique de recherche, l'étude du rôle des phages environnementaux dans la dissémination des GRA. L'idée d'explorer cette thématique a émergé de la volonté de tisser davantage de liens entre deux thèmes forts de l'équipe MIC. Le premier, mené par C. Merlin, concerne l'étude de la dissémination des GRA dans l'environnement *via* le mécanisme de conjugaison (plasmides, ICE). Le second pôle, mené par Christophe Ganzter, étudie notamment les phages à génome ARN F-spécifiques (ayant pour récepteurs les pili conjugatifs des plasmides de type IncF), leurs propriétés de surface et leur comportement dans les écosystèmes aquatiques. Ces phages d'*E. coli* sont à la fois des indicateurs de pollution fécale, dont la recherche et la détection font l'objet de normes de qualité ISO, et de très bons modèles d'étude de virus pathogènes humains non-cultivables tels que les norovirus. Le projet d'étude de la transduction dans l'environnement est ainsi né de ma volonté d'élargir nos connaissances de la dissémination environnementale des GRA en abordant un autre mécanisme que la conjugaison et en m'appuyant sur les connaissances et le savoir-faire présent au sein de notre équipe sur les phages.

L'état de l'art présenté dans le paragraphe précédent expose clairement les soupçons pesant sur le rôle probablement important des phages environnementaux dans la dissémination de

l'antibiorésistance. Cependant, les travaux menés jusqu'à présent font face à plusieurs difficultés techniques/méthodologiques et ne peuvent aller plus loin dans leurs conclusions. Tout d'abord, les quantités de phages que l'on peut purifier d'un environnement aquatique sont assez limitées du fait de leurs relativement basses concentrations initiales. Ces purifications nécessitent fréquemment des successions de centrifugations, ultracentrifugations, filtrations, ultrafiltrations et/ou filtrations tangentielles (Casas and Rohwer, 2007; Thurber et al., 2009). Ensuite, la vérification de la qualité des fractions phagiques obtenues est délicate en terme de contenu en vésicules membranaires et en ADN libres (Colomer-Lluch et al., 2011; Enault et al., 2017; Forterre et al., 2013; Ross and Topp, 2015). L'ADN libre peut être dégradé assez efficacement par l'utilisation de Dnase mais le contrôle de cette dégradation reste difficile. L'élimination des vésicules par l'emploi de chloroforme ou d'autres solvants semble assez efficace (Dugat-Bony et al., 2018) mais une part notable des phages est également sensible à ces traitements (Ackermann and DuBow, 1987). Enfin, concernant l'étude du rôle des phages dans la dissémination des GRA, la prévalence naturelle relativement forte des GRA habituellement recherchés dans les milieux récepteurs étudiés rends difficile la détection d'évènements de transduction qui restent rares (Ross and Topp, 2015) et les méthodes employées jusqu'à présent basée sur l'isolement de bactéries cultivables ou la qPCR ne sont guère probantes.

Le projet d'étude de la transduction dans l'environnement a réellement débuté en 2015 avec l'obtention d'un financement Université de Lorraine/Région Lorraine (fonds FEDER) puis s'est poursuivi fin 2017 avec le début du projet PHARG financé par l'Anses. Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur l'acquisition et le développement de méthodes de concentrations phagiques par ultrafiltration et filtration tangentielle adaptées à notre projet (Figure 16). La méthode d'extraction d'ADN phagique environnemental que nous avons développée est innovante par 2 aspects : (i) le traitement au chloroforme élimine, dans l'état des connaissances, la majorité des vésicules membranaires, et (ii) la vérification par qPCR de l'absence finale d'un ADN marqué initialement ajouté nous certifie que tout ADN libre extracellulaire a été éliminé par l'action de la Dnase avant extraction des ADN viraux. Cette méthode vise à obtenir des ADN viraux d'une grande pureté. Elle est actuellement mise en œuvre dans un des premiers objectifs du projet PHARG visant à réaliser le suivi du contenu en EGM et en GRA des phages et des bactéries de la rivière Orne sur une année. Cette étude vise à donner un premier aperçu de la compartimentation biologique (bactéries vs. phages) et physique (eaux vs. MES vs. sédiments) de l'antibiorésistance dans cette rivière. De premières données obtenues après une campagne d'échantillonnage menée en juillet 2018 ont montrée que les abondances absolues en intégrons de classe 1 et en plasmides IncP-1, tout comme celles en gènes de résistances *sul1*, *bla_{TEM}*, *aadB*, *aacA4*, *aadA* et *qnrS*, sont plus grande chez les bactéries que chez les phages dans de nombreux cas (Figure 17A et B). On peut toutefois noter que le gène de résistance *bla_{CTX-M}* n'est pas détecté dans le compartiment bactérien alors qu'il l'est chez les phages. De plus, aucun des compartiments physiques ne semble se démarquer dans ces premiers résultats. Les gènes codant les ARNr 16S ont également été quantifiés chez les bactéries pour obtenir une estimation de la biomasse bactérienne et calculer les abondances relatives en GRA/EGM (Figure 17C). Ces gènes sont également quantifiés dans les ADN extraits des fractions virales afin de d'estimer la quantité d'ADN chromosomique bactérien encapsidé dans les phages et aussi de calculer les abondances relatives en GRA/EGM encapsidées par rapport à l'ensemble de ces ADN chromosomiques (Figure 17D). La détermination de ces abondances relatives a permis de montrer qu'elles sont plus grandes d'environ 2 ordres de grandeur chez les phages par rapport aux bactéries, sous condition évidemment que le marqueur ait été quantifié chez les phages et les bactéries.

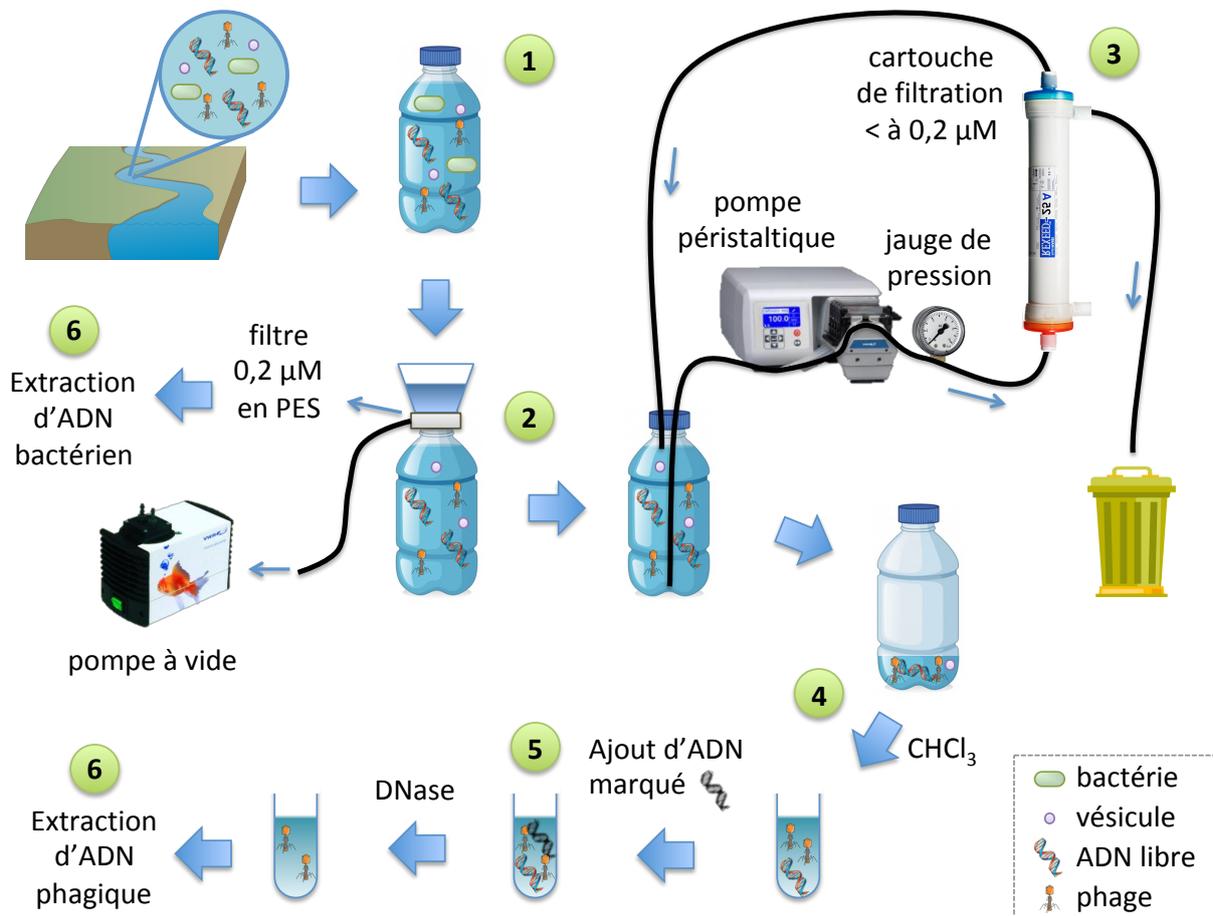


Figure 16 : Schématisation du protocole d'extraction d'ADN phagique environnemental développé.

Les étapes clés sont les suivantes : 1, échantillonnage ; 2, filtration sur filtres de polyéther sulfone (0,2 µm) pour enlever/recueillir les bactéries ; 3, concentration du filtrat par filtration tangentielle ; 4, traitement au chloroforme pour détruire les vésicules membranaires ; 5, élimination des ADN libres par traitement à la DNase après ajout d'un ADN marqué comme contrôle ; 6, extraction des ADN phagiques et bactériens.

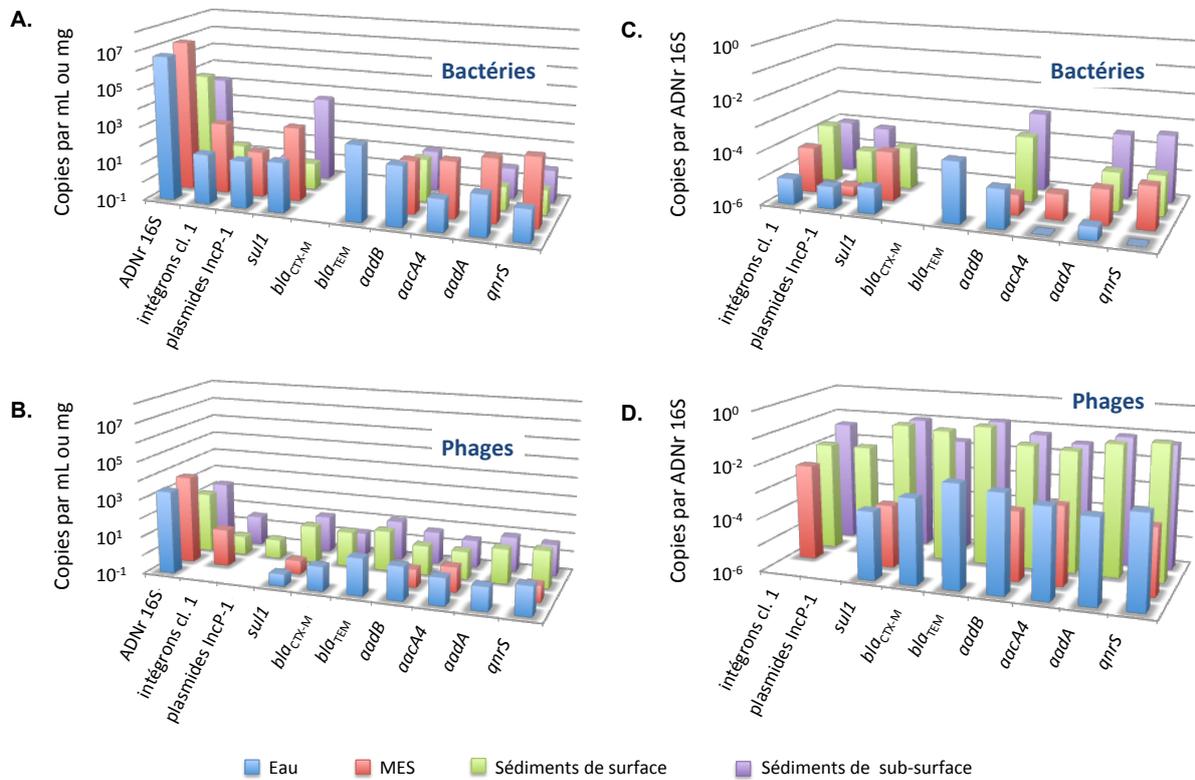


Figure 17 : Abondances absolues et relatives en différents marqueurs moléculaires bactériens indicateurs d'antibiorésistance dans les compartiments physiques de la rivière Orne.

Les échantillons ont été prélevés sur l'Orne au niveau du barrage de Beth en juillet 2018. Chaque valeur a été obtenue à partir d'ADN extraits en triplica puis eux-mêmes analysés par qPCR en triplica. Les ADN bactériens et phagiques correspondent à ceux dont l'origine est explicitée Figure 16. Les abondances absolues sont exprimées en copies d'EGM/GRA par mL d'eau de rivière ou mg de matière en suspension (MES) ou sédiments. Les sédiments de surface correspondent à l'échantillonnage d'une couche fraîche de sédiments de moins de 1 cm d'épaisseur. Un prélèvement d'une couche de 2 à 3 cm sous la couche de surface correspond aux sédiments de sub-surface.

Nous participons également à l'étude d'une zone de rejet végétalisée (zone humide artificielle) qui est utilisée en tant que « traitement de finition » à la sortie de la station d'épuration de la métropole urbaine du Grand Reims. Cette étude a notamment pour objectif de connaître l'effet de la « filtration » naturelle par diverses plantes aquatiques (phragmites, lentilles d'eau, ...) sur la qualité de l'eau finalement rejetée en rivière. La Figure 18 présente les résultats obtenus avec des échantillons d'eau prélevés en novembre 2018 et traités selon le protocole présenté en Figure 16. Nous avons déterminé les abondances absolues (copies/mL d'eau) en gène de l'ARNr 16S et en intégrase des intégrons de classe 1 (*int1*), et les abondances relatives (copie/copies de gène ARNr 16S) en *int1*. La seule différence entre les abondances absolues d'entrée et de sortie d'un marqueur a été mesurée pour *int1* dans la fraction bactérienne (Figure 18A). Cette observation se confirme par l'analyse des abondances relatives en intégrons dans la fraction bactérienne (Figure 18B). Ainsi, si la zone humide végétalisée ne permet pas de rejeter moins de bactéries dans la rivière, leur population est moins riche en cellules porteuses d'intégrons de classe 1. Enfin, on peut remarquer que les différentiels d'abondances absolues entre fractions bactériennes et phagiques (entrée vs. entrée et sortie vs. sortie) sont respectivement d'environ 3 ordres de grandeur pour le gène ARNr 16S alors qu'ils ne sont environ que d'un ordre de grandeur pour les intégrases (Figure 18A). Comme le corrobore l'analyse des abondances relatives en gène *int1* sortant de la zone végétalisée (Figure 18B), cela signifie que les phages sont proportionnellement plus riches en intégrons de classe 1 que les bactéries. La comparaison des abondances relatives en intégrons de classe 1 en entrée de la zone de rejet (bactéries vs. phages) (Figure 18B) ne sont pas significatives (écart-types trop importants). Ces premières données obtenues sur la station d'épuration du Grand Reims, comme celles obtenues sur l'Orne et présentées Figure 17, suggèrent que les phages puissent être proportionnellement très chargés en GRA et/ou EGM lorsqu'ils contiennent des ADN bactériens et que les phages pourraient jouer en rôle important dans la dissémination de l'antibiorésistance.

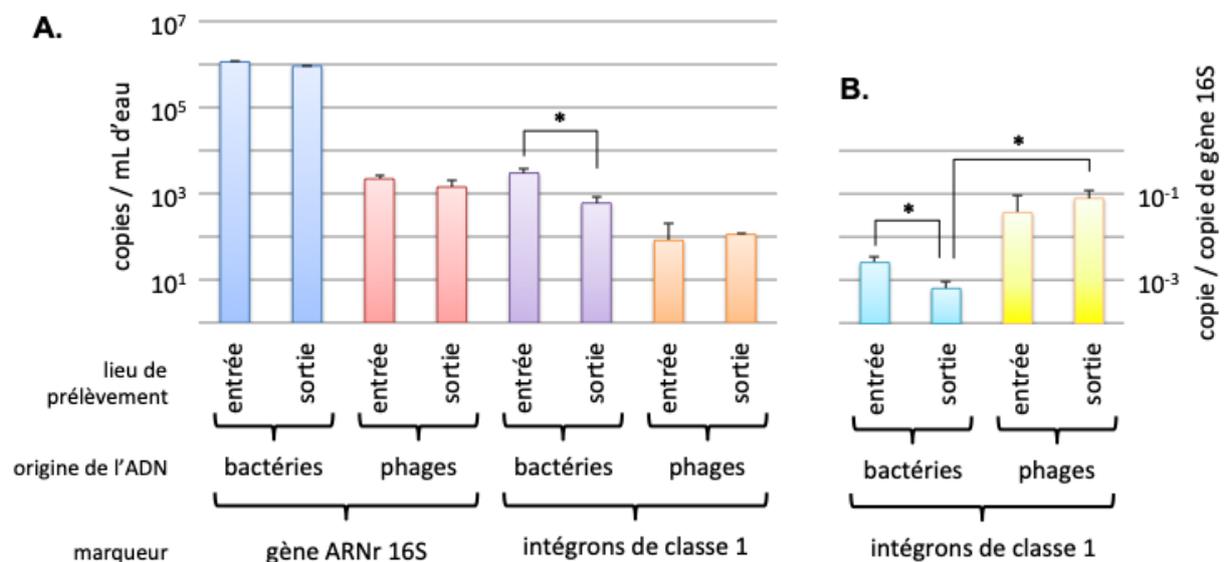


Figure 18 : Abondances absolues (A.) et relatives (B.) en gènes codant l'ARNr 16S et l'intégrase des intégrons de classe 1 (*int1*) dans l'eau d'une zone humide en aval de la station d'épuration du Grand Reims.

Les échantillons d'eau ont été prélevés en entrée ou sortie de zone humide en novembre 2018. Chaque valeur (moyenne ± écart-type) a été obtenue à partir d'ADN extraits en triplica puis eux-mêmes analysés par qPCR en triplica. Les ADN bactériens et phagiques correspondent à ceux dont l'origine est explicitée Figure 16. Les astérisques (*) symbolisent des différences statistiques significatives (test T de Student ; $p < 0,05$).

Une seconde approche actuellement développée dans notre étude du rôle des phages environnementaux dans la dissémination des GRA/EGM à pour objectif de démontrer, sans aucune ambiguïté possible, la survenue en microcosmes d'évènements de transduction entre bactéries environnementales. Pour ce faire, je me suis inspiré de l'approche que nous avons utilisée en microcosmes lors de nos suivis du devenir du plasmide pB10 au cours du temps (cf § 3.1.3). La nouvelle approche imaginée se base sur la détection et la quantification du transfert horizontal d'un marqueur unique par qPCR, mais aussi sur la détection de l'acquisition d'un gène *gfp* (green fluorescent protein) par cytométrie en flux. En effet, je ne pensais initialement pas qu'un plasmide comme pB10 (65 kb) puisse être facilement transduit. Des expériences ultérieures avec le coliphage P1vir (non-détaillées ici) m'ont cependant montré le contraire, comme le confirme d'ailleurs la littérature (Kenzaka et al., 2007). J'ai donc imaginé d'utiliser comme marqueur moléculaire une cassette d'intégron de classe 1 artificielle d'après un modèle proposé par l'équipe de Nicholas Coleman (Gestal et al., 2011). Ainsi, différents plasmides permettant de délivrer la cassette d'intégron artificielle *aadB-gfp* par mobilisation conjugative à des bactéries environnementales et divers plasmides contrôles ont été construits, comme l'illustre la Figure 19. L'archétype de ces constructions génétiques (Figure 19A) est un plasmide mobilisable suicide portant un gène *int11* et la cassette artificielle *aadB-gfp* flanquée de 2 sites *attC*. Le gène *int11* est réprimé chez la bactérie *E. coli* donneuse grâce au système *lacI^q* – pA1/O4/O3 dérivant de l'opéron lactose, mais il sera activé après mobilisation conjugative chez toutes bactéries receveuses autres qu'*E. coli* (dépourvues de l'allèle *lacI^q* surproduit du répresseur LacI). La souche *E. coli* donneuse contient un fragment de plasmide IncP-1 intégré dans son chromosome qui permet la mobilisation de tout plasmide possédant une origine de transfert de type IncP-1. Une mutation dans le gène *dapA* de cette souche entraîne également son autolyse lorsque le milieu n'est pas supplémenté en diaminopimélate (un composant essentiel de la paroi). Divers variants du plasmide dépourvus du gène *int11*, de l'origine de transfert IncP-1 et/ou possèdent une origine de répllication différente ont également été construits (Figure 19B-D).

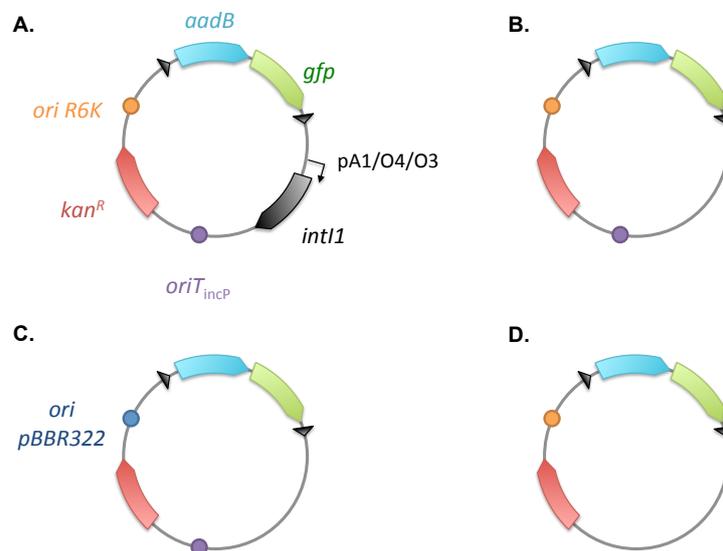


Figure 19 : Carte de différents plasmides construits dans le but d'étudier la transduction au sein de communautés microbiennes environnementales.

Les flèches rectangulaires et les triangles noirs représentent des cadres de lecture et des sites de recombinaison d'intégron *attC*, respectivement. La flèche cassée symbolise le promoteur pA1/O4/O3, variant du promoteur *P_{lac}* (opéron lactose) pouvant être réprimé par le répresseur LacI. *aadB* : résistance à la gentamycine ; *gfp* : green fluorescent protein ; *int11* : intégrase d'un intégron de classe 1 ; *kan^R* : résistance à la kanamycine ; *ori pBBR322* : origine de répllication à large spectre ; *ori R6K* : origine de répllication « suicide » (réplicase chromosomique) ; *oriT_{IncP}* : origine de transfert d'un plasmide de type IncP (plasmide mobilisable).

Ces plasmides porteurs de la cassette *aadB-gfp* sont utilisés lors d'expérience dont le principe est présenté Figure 20. Brièvement, il s'agit tout d'abord de transférer par mobilisation conjugative la cassette artificielle vers des bactéries environnementales pour que cette cassette soit capturée par des intégrons de classe 1 (probabilité accrue si le gène *int1* est également apporté sous le contrôle de pA1/O4/O3). Le plasmide apportant la cassette, tout comme la bactérie donneuse incapable de synthétiser le diaminopimélate, sont tout deux perdus après l'étape de mobilisation conjugative. Des phages environnementaux sont alors amplifiés sur les bactériesensemencées avec la cassette *aadB-gfp*, puis purifiés. La majorité des phages infectieux purifiés sont ensuite inactivés par un traitement UV court qui n'altère pas la capacité de transduction, comme l'indique la littérature (Miller, 1992). Ces phages traités aux UV sont co-incubés avec de nouvelles bactéries environnementales. Enfin, les événements de transduction sont détectés grâce à une recherche de la cassette artificielle par qPCR ou à l'apparition de phénotypes de fluorescence par cytométrie en flux. Cette approche expérimentale complexe a nécessité de nombreuses constructions génétiques et de longues mises au point techniques mais les premiers résultats expérimentaux sont prometteurs. Elle nous permettra à terme d'étudier le rôle exact de la transduction et les environnements ou conditions favorables à ce mécanisme de transfert horizontal.

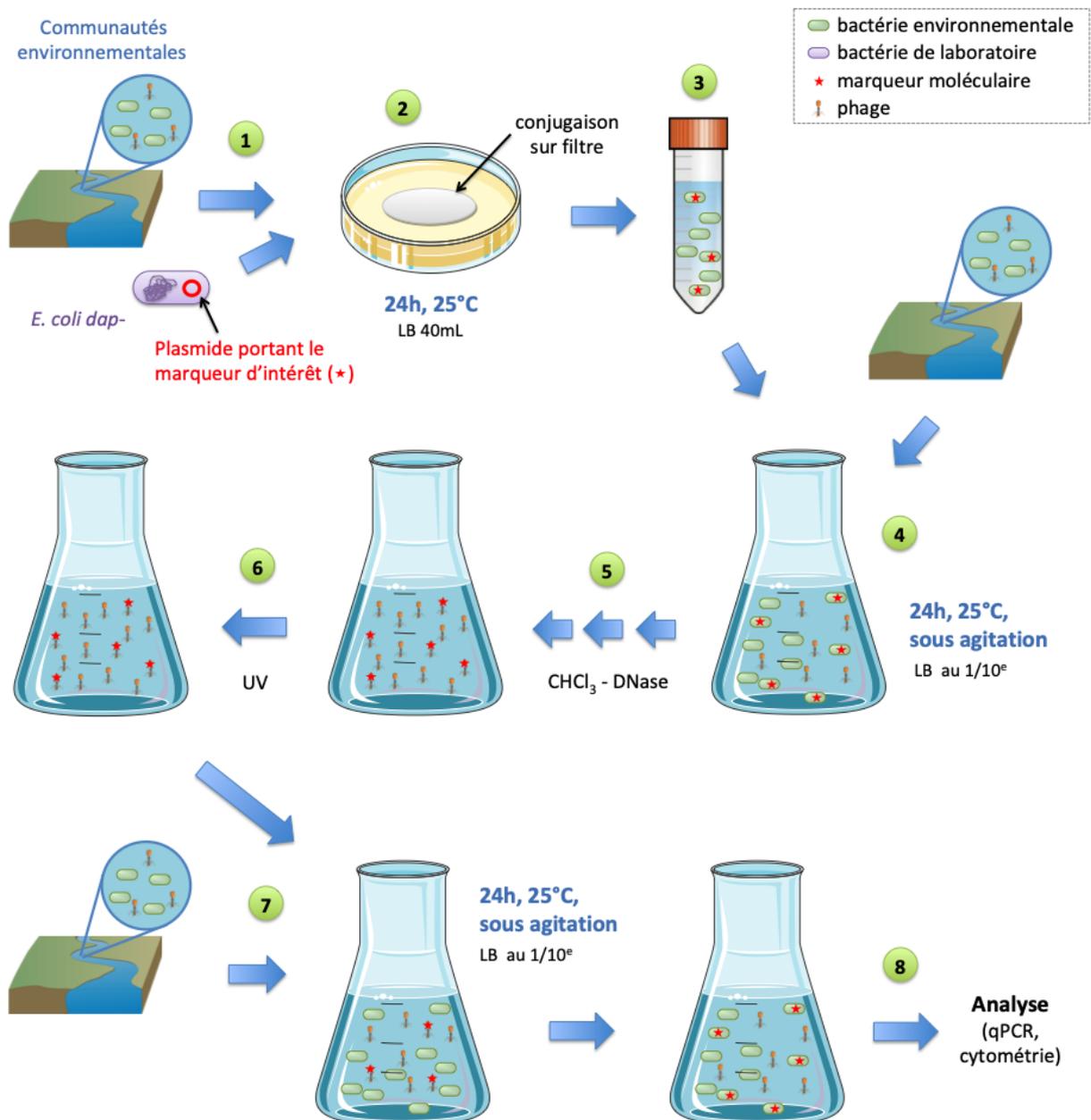


Figure 20 : Stratégie de mise en évidence d'évènements de transduction au sein de communautés microbiennes environnementales.

Les étapes clefs sont les suivantes : 1, échantillonnage ; 2, conjugaison suicide sur filtre pour ensemercer les bactéries environnementales avec un marqueur unique quantifiable par qPCR ; 3, recueil des bactéries environnementales ensemençées ; 4, incubation avec une communauté microbienne naturelle pour permettre la multiplication de phages environnementaux sur les bactéries ensemençées avec le marqueur ; 5, purification des phages par la succession des traitements filtration, chloroforme, ajout d'ADN marqué, Dnase tels que décrits dans la Figure 16 ; 6, inactivation de la majorité des phages infectieux par un court traitement UV ; 7, co-incubation des phages inactivés avec une communautés microbienne naturelle ; 8, recherche d'évènements de transduction par qPCR ou cytométrie en flux.

4. Perspectives de Recherche

A court terme, mes recherches se focaliseront sur les projets en cours développés dans les paragraphes 3.2.2, 3.2.4 et 3.2.5, à savoir, la compartimentation et la dissémination des GRA et EGM vecteurs d'antibiorésistance dans les environnements aquatiques. En perspectives à moyen et long termes de mes travaux passés et actuels, j'ai deux ambitions intimement liées l'une à l'autre. La première est d'améliorer notre compréhension de la compartimentation physique et biologique des EGM/GRA et de l'interaction des bactéries les portant avec les phases minérales de leurs environnements. La seconde est de participer à l'obtention d'une vision globale et intégrée de la dissémination des gènes d'antibiorésistance dans l'environnement. Les paragraphes ci-dessous présentent les voies d'exploration que je souhaite suivre pour ces deux grands thèmes de recherche.

4.1 Compartimentation des EGM/GRA et interactions des bactéries qui les portent avec leurs environnements

4.1.1 Contexte et Problématiques

Ce thème va nous permettre de poursuivre les relations fructueuses que nous avons établies avec les membres de réseaux scientifiques européens auxquels nous avons participé ou participons toujours (Action COST, Réseau Norman) et dont les études se focalisent sur la qualité des ressources et eaux et l'abondance environnementale de divers GRA/EGM. Il se place aussi clairement dans la continuité de notre collaboration avec l'équipe du LIEC menée par Emmanuelle Montargès-Pelletier et des travaux que nous avons réalisés sur l'écosystème de la rivière Orne. A cette occasion, nous avons constaté une répartition différente des bactéries dans l'eau de rivière ou sur les matières en suspension dans celle-ci en fonction du portage de plasmides IncP-1 ou d'intégrons de classe 1 (cf § 3.2.3). Le dépôt de ces matières en suspension dans le lit de la rivière est à l'origine de la formation des sédiments et des réservoirs d'EGM. Nous avons aussi mis en évidence, dans une carotte de sédiments, la présence de microréservoirs au sein desquels les bactéries sont enrichies en intégrons de classe 1. Constitués d'agrégats bio-organo-minéraux complexes et hétérogènes, les sédiments sont considérés comme un compartiment dynamique et ouvert, intégrant des particules récentes et/ou libérant des particules maturées dans le courant. A ce titre, les membres du LIEC ont notamment étudié, d'un point de vue physico-chimique, la dynamique des échanges de matière entre les sédiments et la colonne d'eau, la remise en suspension des sédiments et la libération concomitante de contaminants (métaux lourds, hydrocarbures, ...). Plusieurs questions ont à mon sens émergé de ces différentes études menées au LIEC et au LCPME.

Premièrement, les plasmides IncP-1 et les intégrons de classe 1 sont quasiment les seuls EGM dont l'abondance environnementale et la compartimentation physique ont été recherchées alors que d'autres EGM hautement pertinents sur le plan clinique tels que les plasmides IncF ou IncA/C n'ont jamais été étudiés jusqu'à présent. De plus, les différents liens statistiques pouvant exister dans un environnement entre les abondances en EGM et GRA dans les compartiments physiques (eau vs. matières en suspension vs. sédiments) et biologiques (bactéries vs. phages vs. ADN libre) sont encore largement méconnus. Ainsi, utiliser les EGM comme des indicateurs globaux de l'antibiorésistance reste encore délicat.

Deuxièmement, nous ne savons pas dans quelle mesure la composition physico-chimique des particules en suspension (argile, matière organique, ...) favorise l'adhésion de certaines bactéries porteuses d'EGM/GRA, de certains phages ou d'ADN libre, et donc leurs enrichissements dans les matières en suspension et les sédiments de surface. Des particules de différentes natures pourraient ainsi plus ou moins concourir à la création de réservoirs environnementaux d'EGM et de GRA. Par

ailleurs, si de nombreuses études ont déjà été menées sur les propriétés métaboliques des bactéries des sols depuis près d'un siècle (Löhnis et al., 1923; Paul, 2014), de tels travaux sur les communautés microbiennes de rivières n'ont débutés qu'au début des années 1980 (Battin et al., 2016) et le rôle des bactéries porteuses d'EGM/GRA qui sont enrichies sur l'évolution des matières en suspension et des sédiments n'a pas encore été étudié. Un enrichissement en bactéries présentant certains types métaboliques (ferro-oxydantes, ferri-réductrices, sulfato-réductrices, ...) pourrait impacter le devenir physico-chimique des matières ayant sédimentées. Ainsi, l'évolution physico-chimique des sédiments pourrait également dépendre des EGM qui, par leur spectre d'hôtes bactériens, enrichiraient spécifiquement les matières en suspension en certaines bactéries au type métabolique particulier.

4.1.2 Travaux en prévisions

4.2 Une vision globale et intégrée de la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement

4.2.1 Contexte et Problématiques

Ce second thème se situe dans la continuité des travaux menés avec Christophe Merlin sur la dissémination des éléments intégratifs et plasmides conjugatifs, des travaux que je mène sur la transduction, et également sur ceux que nous avons pu menés avec nos collègues européens de l'Action COST NEREUS ES1403. Les travaux que nous avons menés dans le cadre de cette Action COST avaient notamment pour objectifs d'uniformiser les procédures de détection et de quantification des GRA, et de déterminer lesquels sont le plus abondants ou persistants dans les eaux usées, les lisiers/fumiers, les environnements aquatiques et les sols.

Il a déjà été souligné que la grande majorité des travaux effectués à ce jour ont porté sur la conjugaison et, dans une moindre mesure, sur la transformation (Elsas et al., 2002). La transduction entre bactéries environnementales n'ayant jamais été formellement démontrée, les trois mécanismes de transfert horizontaux n'ont donc évidemment jamais été étudiés simultanément. Les estimations de leurs propension et spectres respectifs restent spéculatives. De même, la nature des acteurs bactériens et viraux (espèces, genres, familles) impliqués dans les transferts horizontaux d'EGM/GRA dans l'environnement ne peut pas être déterminée par des approches par métagénomique ou qPCR et reste méconnue. Un dernier paramètre dont l'importance n'a pas été évaluée est la perméabilité globale des communautés microbiennes ou leur capacité à être colonisée, envahie ou pénétrée par une bactérie antibiorésistante allochtone ou un EGM/GRA transféré horizontalement. Nous avons déjà légèrement exploré cet aspect de perméabilité des communautés microbiennes lors de nos travaux avec le plasmide conjugatif pB10 et avons montré des résultats contre-intuitifs par rapport à certains phénomènes décrits *in vitro* (cf § 3.1.3).

Différents travaux suggérant fortement que la transduction est une voie de dissémination efficace des GRA/EGM dans l'environnement ont également déjà été présentés précédemment (cf § 3.2.5.1). Néanmoins, les auteurs d'autres articles estiment que ce mécanisme de transfert de gène n'est probablement pas prépondérant en raison de la notion répandue selon laquelle les phages présentent le plus fréquemment une gamme d'hôtes étroite, parfois limitée à une espèce bactérienne ou quelques souches. Cependant, les développements récents dans ce domaine tendent à montrer que les phages polyvalents qui présentent des gammes d'hôtes s'étendant sur plusieurs genres sont fréquents. A titre d'exemple, le phage SN-T est capable d'infecter des α -, β - et γ -protéobactéries (Beumer and Robinson, 2005). À ce stade, il convient de distinguer les notions définies par Paul Hyman et Stephen Abedon de « penetrative host range » et de « replicative host range » (Hyman and Abedon, 2010). Le « penetrative host range » (ou spectre d'hôtes pénétrés) désigne l'ensemble des bactéries dans lesquelles un phage peut injecter son génome sans nécessairement y avoir la capacité de s'y maintenir sous la forme d'un prophage ou de déclencher un cycle infectieux. Le « replicative host range » (spectre d'hôtes permettant une répllication ou spectre d'hôtes réplcatifs) est le spectre plus étroit de bactéries dans lesquelles l'injection du génome d'un phage conduit efficacement à la production et à la libération de nouveaux virions. Ainsi, il conviendrait de différencier attentivement pour les phages transducteurs, la gamme d'hôte dans laquelle ils peuvent délivrer de l'ADN, de la gamme d'hôtes permettant leur multiplication, qui est celle habituellement décrite. Le phage P1 est ainsi notamment connu comme ne pouvant se multiplier que dans certaines γ -protéobactéries tout en étant capable de délivrer de l'ADN dans une gamme plus large d' α -, β -, γ - et δ -protéobactéries (Hyman and Abedon, 2010; Murooka and Harada, 1979). Bien que les propriétés de transduction globales des communautés de phages naturelles restent à déterminer, diverses études récentes suggèrent que les événements de transduction *via* des phages à large spectre d'hôtes peuvent être fréquents dans l'environnement (Kenzaka et al., 2010, 2007).

5. Détail de mes Activités d'Encadrement

5.1 Encadrements avant mon arrivée au LCPME (2005-2011)

Lors de mon Doctorat, j'ai eut l'occasion d'encadrer du point de vue technique 4 étudiants de 3^{ème} année de Licence de Biologie cellulaire et Physiologie pour des stages courts de 2 ou 10 semaines. J'ai également pu co-encadrer et co-superviser le stage de 4 étudiants de Master (listés ci-dessous). Dans un souci de relative concision, je ne mentionnerai pas les stagiaires de Licence dans cette partie.

Etudiants encadrés :

- Gonot Fabien – Master 2 Microbiologie (Nancy-Université – Faculté des Sciences) – Titre du projet : Etude de l'excision et de la mobilité de l'élément intégratif mobilisable CIME19258 de *Streptococcus thermophilus* – Stage de 6 mois de janvier à juillet 2009 – Encadrement : Gérard Guédon (GG) 50%, Xavier Bellanger (XB) 50% – Travail ayant conduit à une publication (Bellanger et al., 2011)
- Herbi Linda – Master 1 Microbiologie (Nancy-Université – Faculté des Sciences) – Titre du projet : Role du gène *orfA* dans le transfert de l'élément intégratif conjugatif ICESt3 de *Streptococcus thermophilus* – Stage de 10 semaines de janvier à février 2009 – Encadrement : GG 50%, XB 50%
- Puymège Aurore – Master 1 Microbiologie (Nancy-Université – Faculté des Sciences) – Titre du projet : Etude du transfert de l'élément intégratif conjugatif ICESt3 de *Streptococcus thermophilus* – Stage de 10 semaines de janvier à février 2008 – Encadrement : GG 50%, XB 50% – Travail ayant conduit à une publication (Bellanger et al., 2011)
- Rahim Sliman – Master 1 Microbiologie (Nancy-Université – Faculté des Sciences) – Titre du projet : Marquage par un gène de résistance des éléments intégratifs conjugatifs ICESt1 et ICESt3 de *Streptococcus thermophilus* – Stage de 10 semaines de janvier à février 2007 – Encadrement : GG 50%, XB 50%

5.2 Encadrements au LCPME avant ma nomination comme MCF (2011-2014)

Ma présence dans le LCPME de janvier 2011 à août 2014 en tant que de Post-Doctorant puis ATER m'a permis participer à la formation technique (microbiologie et biologie moléculaire) de deux étudiantes étrangères (1 doctorante et 1 Master 2) en visite au LCPME et de co-encadrer deux étudiants de Master.

Etudiants encadrés :

- Nowaczyk Natalia – Master 2 de Pharmacie, filière officine (Medical University of Gdańsk – Faculty of Pharmacy, Pologne) – Titre du projet : Etude de la toxicité de nanoparticules de type QD ZnO sur le système bactérien – Stage de 6 mois de janvier à juillet 2014 – Formation technique : XB 50 %
- Arroua Boussad – Master 2 Microbiologie (Université de Lorraine – Faculté des Sciences) – Titre du projet : Etude de nanoparticules de type QD sur l'intégralité cellulaire de *Cupriavidus metallidurans* CH34 – Stage de 6 mois de janvier à juillet 2013 – Encadrement : Christophe merlin (CM, LCPME) 50%, Xavier Bellanger (XB) 50% – Travail ayant conduit à une publication (Arroua et al., 2014)

- Moreira-Fontes Filipe – Master 1 Microbiologie (Université de Lorraine – Faculté des Sciences) – Titre du projet : Effet du stress génotoxique sur le transfert du plasmide pB10 – Stage de 10 semaines de janvier à février 2013 – Encadrement : CM 50%, XB 50%
- Katipoglu-Yazan Tuğçe – Doctorante en Biotechnologie Environnementale (Istanbul Technical University, Turquie) – Titre du projet : Evaluation Of The Biodegradation Characteristics And Toxicity/Inhibition Effects Of Selected Antibiotics On Nitrification Systems – Stage de 6 mois de janvier à décembre 2012 – Formation technique : XB 100% – Travail ayant conduit à deux publications (Katipoglu-Yazan et al., 2016, 2015)

5.3 Encadrement au LCPME depuis ma nomination comme MCF (depuis 2014)

Depuis ma nomination en qualité de MCF, j'ai encadré seul ou co-encadré avec Christophe Merlin une Post-Doctorante, une ATER, plusieurs étudiants en Master ou Doctorat et des membres du personnel technique en CDD. En effet, la thématique de recherche que je développe, et qui m'est propre (transfert de gènes dans l'environnement *via* les phages), peut également se concevoir comme un complément à l'étude des transferts de gènes dans l'environnement par les éléments conjugatifs que mène Christophe Merlin. Par ailleurs, j'ai encadré de 2016 à 2018 deux étudiants en DFA SP 2^{ème} année Officine souhaitant effectuer leur thèse d'exercice grâce à un travail de synthèse bibliographique.

5.3.1 Personnels Techniques

- Martin-Mériadec Audrey – Assistant Ingénieur CNRS – Titre du projet : PHARG : Rôle des bactériophages environnementaux dans la dissémination des gènes d'antibiorésistance – CDD de 12 mois de janvier 2018 à janvier 2019 – Encadrement : XB 100%
- Groshenry Guillaume – Assistant Ingénieur CNRS – Titre du projet : Identification de paramètres environnementaux affectant la dynamique d'éléments génétiques mobiles impliqués dans la dissémination de résistances aux antibiotiques – CDD de 6 mois de novembre 2015 à avril 2016 – Encadrement : CM 70%, XB 30%

5.3.2 Post-Doctorante et ATER

- Julie Colin – ATER en Biotechnologies (Université de Lorraine – IUT du Montet) – Titre du projet : PHARG : Rôle des bactériophages environnementaux dans la dissémination des gènes d'antibiorésistance – CDD de 3 mois d'octobre à décembre 2018 (interruption avant terme d'un contrat d'une durée initiale de 11 mois pour cause de recrutement en CDI dans une entreprise privée) – Encadrement : XB 100%
- Scornec Hélène – Post-Doctorante – Titre du projet : Identification de paramètres environnementaux affectant la dynamique d'éléments génétiques mobiles impliqués dans la dissémination de résistances aux antibiotiques – CDD de 9 mois de décembre 2014 à août 2015 (interruption avant terme d'un contrat d'une durée initiale de 13 mois pour cause de recrutement en CDI dans une entreprise privée) – Encadrement : CM 70%, XB 30%

5.3.3 Doctorantes d'Université

- Véronica Roman – Doctorante en "Sciences de la Vie et de la Santé" – Ecole Doctorale BioSE (ED 266 - Biologie, Santé, Environnement) – Titre du projet : Rôle des éléments intégratifs conjuguatifs de la famille SXT dans la dissémination des gènes d'antibiorésistance en milieu aquatiques – Travaux débutés en octobre 2017 – Financement par contrat doctoral – Encadrement : CM 50%, XB 50% (ACT obtenue en février 2018 ; Doctorat en cours) – Travail ayant conduit à 1 communication orale.
- Magali de la Cruz Barrón – Doctorante en "Sciences de la Vie et de la Santé" – Ecole Doctorale BioSE (ED 266 - Biologie, Santé, Environnement) – Titre du projet : Compartimentation des intégrons de classe 1 et des plasmides IncP-1 dans la rivière Orne (France), un écosystème aquatique soumis à des pressions anthropiques urbaines et industrielles – Travaux menés d'octobre 2015 à décembre 2018 – Financement provenant du CONACYT (Conseil National des Sciences et Technologies, Gouvernement Mexicain) obtenu après réponse à un appel d'offre menée par CM et XB – Encadrement : CM 50%, XB 50% (ACT obtenue en septembre 2016) – Travail ayant conduit à 1 article publié et 2 articles en préparation (cf : De la Cruz Barrón et al., 2018), 1 communication orale et 3 posters.

5.3.4 Doctorants d'Exercice en Pharmacie

- Coppe Ludovic – DFA-SP 2^{ème} année Officine – Titre du projet de thèse d'exercice : Dysbiose du microbiote intestinal chez l'Homme : causes, conséquences, prophylaxie et thérapeutiques – Travaux bibliographiques menés de juillet 2016 à juin 2018 – Encadrement : XB 100%
- Lenclen Maxime – DFA-SP 2^{ème} année Officine – Titre du projet de thèse d'exercice : Effet sur les bactéries des antibiotiques en doses sub-inhibitrices – Travaux bibliographiques menés de décembre 2016 à juillet 2018 – Encadrement : XB 100%

5.3.5 Etudiants en Master de Sciences et BTS

- Clivio Léa – BTS Biotechnologies (Lycée Stanislas – Villers-lès-Nancy) – Titre du projet : Développement d'outils moléculaires permettant l'étude du transfert de gènes d'antibiorésistance dans l'environnement – Stage de 7 semaines de mai à juillet 2018 – Encadrement : XB 100%
- Mathieu Sébastien – Master 1 BioMANE (Biotechnologies Microbiologie Aliment Nutrition Environnement – Université de Lorraine – Faculté des Sciences) – Titre du projet : Etude du rôle des bactériophages environnementaux dans la dissémination des gènes d'antibiorésistance – Stage de 10 semaines d'avril à juin 2018 – Encadrement : XB 100%
- Doisy-Caquant Mathilde – BTS Biotechnologies (Lycée Stanislas – Villers-lès-Nancy) – Titre du projet : Développement d'outils moléculaires permettant l'étude du transfert de gènes d'antibiorésistance dans l'environnement – Stage de 7 semaines de mai à juillet 2017 – Encadrement : XB 100%
- Véronica Roman – Master 2 BioMANE (Biotechnologies Microbiologie Aliment Nutrition Environnement – Université de Lorraine – Faculté des Sciences) – Titre du projet : Rôle des éléments intégratifs conjuguatifs de la famille SXT dans la dissémination des gènes d'antibiorésistance en milieu aquatiques – Stage de 6 mois de janvier à juillet 2017 – Contrat doctoral obtenu auprès de l'Ecole Doctorale BioSE en juillet 2017 – Encadrement : CM 50%, XB 50%

- Lorine Derongs – Master 2 Sciences, Technologies, Santé : Mention Biologie, Agronomie, Santé – Université de Rennes 1 – UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement – Titre du projet : Occurrence et activités des éléments génétiques mobiles vecteurs d'antibiorésistance dans les sédiments de l'Orne – Stage de 6 mois de janvier à juillet 2017 – Encadrement : CM 50%, XB 50%
- Adjobi Anouchcca – Master 2 BioMANE (Biotechnologies Microbiologie Aliment Nutrition Environnement – Université de Lorraine – Faculté des Sciences) – Titre du projet : Dissémination et activité des intégrons de classe I dans l'environnement Orne – Stage de 6 mois de janvier à juillet 2016 – Encadrement : CM 50%, XB 50%
- Houin Anthony – Master 1 BioMANE (Biotechnologies Microbiologie Aliment Nutrition Environnement – Université de Lorraine – Faculté des Sciences) – Titre du projet : Abondance relative des gènes de résistance aux antibiotiques dans les fractions phagiques des eaux de l'Orne – Stage de 10 semaines d'avril à mai 2015 – Encadrement : XB 100%

6. Participation à des Jurys

6.1 Participation à des Jurys de Doctorat d'Université

J'ai participé à ce jour à deux jurys de Doctorat d'Université, le premier en tant qu'examineur et le second en tant que co-directeur de thèse :

- Magali de la Cruz Barrón – Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé – Université de Lorraine – Titre de la thèse : Compartimentation des intégrons de classe 1 et des plasmides IncP-1 dans la rivière Orne (France), un écosystème aquatique soumis à des pressions anthropiques urbaines et industrielles – Décembre 2018 – Qualité : Co-Directeur de thèse
- Kevin Hugué – Doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire – Université François Rabelais de Tours – Titre de la thèse : Stabilité de *Salmonella* Genomic Island 1 et son incompatibilité avec les plasmides IncA/C – Novembre 2016 – Qualité : Examineur

6.2 Participation à des Jurys de Doctorat d'Exercice en Pharmacie

J'ai également participé à 10 jurys de soutenance en vue de la délivrance du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie à l'Université de Lorraine dont 8 en tant que membre du jury et 2 en qualité de directeur de thèse :

- Lenclen Maxime – Titre de la thèse d'exercice : Effet des antibiotiques en doses sub-inhibitrices sur les bactéries – Juillet 2018 – Qualité : Directeur de thèse
- Coppe Ludovic – Titre de la thèse d'exercice : Dysbiose du microbiote intestinal chez l'Homme : causes, conséquences, prophylaxie et thérapeutiques – Juin 2018 – Qualité : Directeur de thèse
- Kauffman Sébastien – Titre de la thèse d'exercice : La maladie de Chagas : Diagnostic, clinique et perspectives d'une maladie négligée – Juin 2018 – Qualité : Membre du jury
- Claudel Yoann – Titre de la thèse d'exercice : Les différents traitements dans les pathologies liées à la borréliose : Etat des lieux de la recherche actuelle sur les traitements et controverse sur les traitements européens – Septembre 2017 – Qualité : Membre du jury
- Durand Bérénice – Titre de la thèse d'exercice : Traitement des mycoses vulvo-vaginales aiguës et récidivantes – Septembre 2017 – Qualité : Membre du jury
- Mangin Stéphane – Titre de la thèse d'exercice : Diagnostic du paludisme dans un dispensaire au Bénin – Décembre 2016 – Qualité : Membre du jury
- Duflot Clément – Titre de la thèse d'exercice : Historique et évolution des traitements à *Pediculus humanus capitis* – Septembre 2016 – Qualité : Membre du jury
- Chevalley Alicia – Titre de la thèse d'exercice : Utilisation de la phytothérapie et de l'aromathérapie dans le cadre du conseil vétérinaire chez le chat, le chien et le cheval – Mars 2016 – Qualité : Membre du jury
- Thillement Delphine – Titre de la thèse d'exercice : La contamination parasitaire liée à la consommation de viande, de poissons et de végétaux dans les pays industrialisés – Mars 2015 – Qualité : Membre du jury
- Vitoux Adeline – Titre de la thèse d'exercice : Le chat : Un vecteur de zoonose – Novembre 2014 – Qualité : Membre du jury

6.3 Participation à un Jury de Diplôme d'Ingénieur

J'ai été sollicité pour participer à un jury de soutenance de stage pour la délivrance du diplôme d'ingénieur d'un étudiant inscrit à l'École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA) et à la Faculté de Pharmacie en qualité de responsable, pour la composante Pharmacie, du double cursus « Pharma+ ENSAIA » :

- Marc Noisette – Diplôme d'Ingénieur de l'ENSAIA en Génie des Procédés et des Bioprocédés, Spécialité « Développement Industriel » – Titre du rapport : Gestion de projet dans une unité opérationnelle de production de vaccins (Sanofi Pasteur) – Septembre 2018 – Qualité : Rapporteur

6.4 Participation à des Jurys de Master et de Diplôme de Formation Générale en Sciences Pharmaceutiques

Depuis 2014, je participe régulièrement aux jurys des différents diplômes dans lesquels j'enseigne. En tant que membre de la Commission Recherche de la Faculté de Pharmacie, je suis régulièrement sollicité pour être le référent ou garant de la bonne tenue de Stages d'Initiation à la Recherche. Ces stages sont ouverts sur la base du volontariat aux étudiants en DFG-SP2 et DFG-SP3 de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine et leur permettent d'acquérir une première expérience de recherche. Pour les étudiants en Pharmacie, avoir effectué un de ces stages est obligatoire pour accéder à la majorité des Master et à la filière Industrie.

- **Participation à des jurys de Master 1 et Master 2** (Master BioMANE puis Master Microbiologie) **et des jurys de Licence 3** (Cursus Master en Ingénierie mention Biologie, Santé, Environnement) en qualité de rapporteur de stage (Université de Lorraine) ; 10 participations à la date de février 2019.
- **Membre du jury du DFG-SP3 et du DFG-SP** en tant qu'invité (2017-2018) puis membre nommé par M. Le Président de l'Université de Lorraine sur proposition de M. Le Doyen de la Faculté de Pharmacie (2018-2019).
- **Référent de Stage d'Initiation à la Recherche** ; 5 rapports de stage évalués en jury de soutenance depuis 2016.

6.5 Participation à des Jurys de Baccalauréat

J'ai à ce jour été nommé à deux reprises comme Président suppléant du jury de baccalauréat général ou professionnel :

- Président suppléant du **jury de baccalauréat général série S-SVT-SVT du Lycée polyvalent régional Louis Lapique à Epinal** en juillet 2018.
- Président suppléant du **jury de baccalauréat professionnel série Esthétique - Cosmétique - Parfumerie du Lycée des métiers des services et du commerce Marie Marvingt à Tomblaine** en juillet 2018.

7. Production Scientifique

Les travaux que j'ai réalisés lors de ma thèse au Laboratoire de Génétique et Microbiologie (Faculté des Sciences, Nancy-Université) m'ont permis de publier 4 articles en tant que premier auteurs et de présentées plusieurs communications orales et posters. Après un premier Post-Doctorat à l'Institut Pasteur, j'ai intégré le LCPME en 2011, en qualité de Post-Doctorant puis d'ATER. Ces différents travaux Post-Doctoraux ont fait l'objet de 4 publications et diverses communications listées ci-après. En septembre 2014, j'ai été recruté en qualité de MCF à l'Université de Lorraine où j'ai pu poursuivre mes activités de recherche au sein du LCPME. Depuis mon recrutement, 9 articles ont été publiés ou seront très prochainement soumis, de nombreuses communications ont été effectuées et nous avons déposé une déclaration d'invention auprès de la SAYENS (SATT Grand Est).

Ma production scientifique est résumée dans le Tableau 5 ci-dessous puis détaillée dans les paragraphes suivants.

Tableau 5 : Résumé synthétique de ma production scientifique à la date du 1^{er} avril 2019.

Production	Quantité	Commentaires
Facteur h : 8 (selon Web of Science) Statistique sur 12 publications parues : 225 citations (dont 218 citations externes) par 183 articles (dont 178 articles externes) Moyenne : 20,45 citations par publication		
Publications		
Articles scientifiques	11	1 ^{er} auteur : 8 ; 2 ^e auteur : 2 ; dernier auteur : 1
Articles de revue	1	1 ^{er} auteur : 1
Articles soumis	2	1 ^{er} auteur : 1 ; 2 ^e auteur : 1
Articles en préparation	3	2 ^e auteur : 3
Communications dans des congrès internationaux		
Présentations orales	9	2 en qualité d'orateur
Affiches	11	4 en qualité de présentateur
Communications dans des congrès nationaux		
Présentations orales	9	3 en qualité d'orateur
Affiches	7	3 en qualité de présentateur
Séminaires		
Nationaux	1	1 en qualité d'orateur
Conférences	1	1 conférence sur invitation dans un laboratoire suisse

7.1 Articles et Revue parus dans des Journaux Internationaux à Comité de Lecture

Les facteurs d'impact indiqués ci-dessous ont été relevés en février 2019.

- De la Cruz Barrón M, Merlin C, Guilloteau H, Montarges-Pelletier E, Bellanger X. Suspended materials in river water column differentially enrich class 1 integron- and IncP-1 plasmid-carrying bacteria in sediments. *Front Microbiol*. 2018, 9, 1443. Facteur d'impact : 4,019
- Scornec H, Bellanger X, Guilloteau H, Grosheny G, Merlin, C. Inducibility of Tn916 conjugative transfer in *Enterococcus faecalis* by subinhibitory concentrations of ribosome-targeting antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 2017, 72(10), 2722-2728. Facteur d'impact : 5,217
- Fiorentino A, Rizzo L, Guilloteau H, Bellanger X, Merlin C. Comparing TiO₂ photocatalysis and UV-C radiation for inactivation and mutant formation of *Salmonella typhimurium* TA102. *Environ Sci Pollut Res*. 2017, 24(2), 1871-1879. Facteur d'impact : 2,800
- Bellanger X, Billard P, Schneider R, Merlin C. Stability and toxicity of ZnO quantum dots: interplay between nanoparticles and bacteria. *J Hazard Mater*. 2015, 283, 110-116. Facteur d'impact : 6,434
- Bellanger X, Guilloteau H, Breuil B, Merlin C. Natural microbial communities supporting the transfer of the IncP-1 β plasmid pB10 exhibit a higher initial content of plasmids from the same incompatibility group. *Front Microbiol*. 2014, 5(637). Facteur d'impact : 4,019
- Bellanger X, Guilloteau H, Bonot S, Merlin C. Demonstrating antibiotic resistance gene transfer in complex environmental matrices: a practical approach for a critical review. *Sci Total Environ*. 2014, 493, 872-882. Facteur d'impact : 4,610
- Arroua B, Bellanger X, Guilloteau H, Mathieu L, Merlin C. Atypical stress response to temperature exposure leads to septation defect in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *FEMS Microbiol Lett*. 2014, 353(1). Facteur d'impact : 1,735
- Bellanger X, Payot S, Leblond-Bourget N, Guédon G. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol Rev*. 2014, Jul; 38(4). Facteur d'impact : 11,392
- Bellanger X, Morel C, Gonot F, Puymege A, Decaris B, Guédon G. Cis-mobilization and retro-mobilization of a genomic island by a related integrative and conjugative element from *Streptococcus thermophilus*: evolution of genomic islands by site-specific accretion. *Mol. Microbiol*. 2011 Aug;(81)4. Facteur d'impact : 3,816
- Bellanger X, Morel C, Roberts AP, Mullany P, Decaris B, Guédon G. Characterization of the conjugative transfer of ICESt1 and ICESt3 from *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*. 2009 Apr; 191(8). Facteur d'impact : 3,219
- Bellanger X, Morel C, Decaris B, Guédon G. Regulation of Excision of Integrative and Potentially Conjugative Elements from *Streptococcus thermophilus*: Role of the *arp1* Repressor. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008; 14(1-3). Facteur d'impact : 1,462
- Bellanger X, Morel C, Decaris B, Guédon G. Derepression of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus* by DNA damage response: implication of a *cl*-related repressor. *J Bacteriol*. 2007 Feb; 189(4). Facteur d'impact : 3,219

7.2 Articles Soumis à des Journaux Internationaux à Comité de Lecture ou en Préparation

Les facteurs d'impact indiqués ci-dessous ont été relevés en février 2019.

- Bellanger X, Schneider R, Dezanet C, Arroua B, Billard P, Merlin C. Using DNA damage to assess cryptic photo-induced ROS effects generated by metal oxide nanoparticles. *Article soumis à ACS Nano ; Facteur d'impact : 13,709*
- Wögerbauer M, Bellanger X, Merlin C. Antimicrobial resistance and water scarcity, when current challenges collide at the interface between wastewater effluents and downstream environments. *Article soumis à Molecular Microbiology ; Facteur d'impact : 3,816*
- De la Cruz Barrón M, Bellanger X, Mansuy L, Montarges-Peltier E, Guilloteau H, Merlin C. Fate of class 1 integron- and IncP-1 plasmid-carrying bacteria in polluted riverbed sediments. *Article en préparation pour soumission à Chemosphere ; Facteur d'impact : 4,427*
- De la Cruz Barrón M, Bellanger X, Maul A, Montarges-Peltier E, Guilloteau H, Merlin C. Anthropogenic impact on the content in class 1 integron- and IncP-1 plasmid-carrying bacteria in the Orne River ecosystem (France). *Article en préparation pour soumission à Water Research ; Facteur d'impact : 7,051*
- Lopes AR, Bellanger X, Nunes OC. Characterization of the conjugative plasmid from the Actinobacteria *Gulosibacter molinivorax* ON4^T. *Article en préparation*

7.3 Communications Orales dans des Congrès Internationaux

Les personnes ayant réalisées les présentations ci-dessous sont indiquées par une astérisque (*).

- Bellanger X, Pradalier C, Guilloteau H, De la Cruz Barrón M, Roman V, Merlin C*. Identifying antibiotics triggering the dissemination of resistance genes at low concentrations. Congrès XENOWAC II. Limassol, Chypre. Octobre 2018.
- Scornec H, Guilloteau H, Groshenry G, Pradalier C, Bellanger X, Merlin C*. Exploring the effect of antibiotics at sub-MIC level on the activity of mobile genetic elements. 4th International symposium on the environmental dimension of antibiotic resistance (4th EDAR). Lansing, Michigan (USA). Août 2017.
- Scornec H, Guilloteau H, Groshenry G, Pradalier C, Bellanger X, Merlin C*. Exploring the effect of antibiotics at sub-inhibitory concentrations on the activity of promoters involved in the mobility of mobile genetic elements. Plasmid Biology Conference. Cambridge, Angleterre. Septembre 2016
- Merlin C*, Bellanger X, Guilloteau H, Scornec H. Exploring plasmid-based dissemination of antibiotic resistance genes in environmental matrices. 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015), Maastricht, Pays-Bas. Juin 2015.
- Bellanger X*, Guilloteau H, Scornec H, Merlin C. Exploring plasmid-based dissemination of antibiotic resistance genes in environmental matrices. 3rd International symposium on the environmental dimension of antibiotic resistance (3rd EDAR), Wernigerode, Allemagne. Mai 2015.
- Merlin C*, Bellanger X, Guilloteau H, Breuil B. Exploring plasmid-based dissemination of antibiotic resistance genes in environmental matrices. SETAC Europe 25th Annual Meeting (Society of Environmental Toxicology and Chemistry), Barcelone, Espagne. Mai 2015.

- Bellanger X, Guilloteau H, Merlin C *. Persistence and dissemination of the multiple-antibiotic-resistance plasmid pB10 in complex environment matrices. Joined workshop « Wastewater reuse applications and contaminants of emerging concern » organisé par le groupe NORMAN et l'Action COST TD0803 DARE (« Detecting evolutionary hot spots of antibiotic resistances in Europe »), Limassol, Chypre. Septembre, 2012
- Bellanger X*, Guilloteau H, Stalder T, Bonot S, Ploy MC, Dagot C, and Merlin C. Persistence and dissemination of the multiple-antibiotic-resistance plasmid pB10 in complex environmental communities. 3rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans and the Environment. Aix-en-Provence. Juin 2012
- Merlin C*, Stalder T, Bellanger X, Barraud O, Guilloteau H, Bonot S, Casellas M, Fick M, Pacaud S, Ploy MC and Dagot C. Occurrence and dissemination of antibiotic resistance genes in anthropic environments. SETAC World Congress 2012. Berlin, Allemagne. Mai 2012

7.4 Communications Orales dans des Congrès Nationaux

Les personnes ayant réalisées les présentations ci-dessous sont indiquées par une astérisque (*).

- Scornec H, Guilloteau H, Groshenry G, Pradalier C, Bellanger X, Merlin C*. Exploration des effets des antibiotiques en doses sub-inhibitrices sur l'activité des éléments génétiques mobiles. Réunion du GDR3546 « Les Eléments Génétiques Mobiles : du mécanisme aux populations, une approche intégrative. » Paris, France. Décembre 2017.
- Bellanger X, Guilloteau H, Merlin C*. Emergence et dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques en milieux anthropisés. Colloque Biennal des Zones Ateliers. Paris, France. Décembre 2013.
- Bellanger X, Guilloteau H, Bonot S, Block JC, Bou Orom Y, Breuil B, Courtois S, Audic JM, Stalder T, Poly MC, Dagot C, Merlin C*. Persistence et dissémination du plasmide pB10 dans des matrices environnementales complexes. 9ème Congrès de la Société Française de Microbiologie, Lille, France. Février 2013.
- Puymège A*, Bellanger X, Leblond-Bourget N, Libante V, Charron-Bourgoin F, Guédon G, Payot S (2012). Integrative and Conjugative Elements and gene flux in streptococci. Réunion du GDR3546 Eléments transposables. Paris, France. Juin 2012.
- C. Merlin*, X. Bellanger, S. Bonot, H. Guilloteau, S. Courtois, J.C. Block. Emerging pollution and gene transfer of antibiotic resistance: persistence and spread of a plasmid model in anthropized environments. Colloque Biennal des Zones Ateliers. Rennes, France. Octobre 2011
- Puymège A*, Bellanger X, Guédon G, Leblond P, Payot S (2010). Transfert conjugatif et mobilisation d'îlots génomiques chez les streptocoques. Journées des microbiologistes de l'INRA. Poitiers, France. Mai 2010.
- Bellanger X*, Morel C, Decaris B, Guédon G. Mobilisation d'un îlot génomique en cis par l'élément intégratif conjugatif apparenté ICESt3 de *Streptococcus thermophilus*. 16ème Congrès National des Eléments Transposables. Le Mans, France. Juillet 2009.
- Bellanger X*, Morel C, Roberts AP, Mullany P, Decaris B, Guédon G. Characterization of the conjugative transfer of the genomic islands ICESt1 and ICESt3 from *Streptococcus thermophilus* 15ème Symposium du Club des Bactéries Lactiques. Rennes, France. Novembre 2007

- Bellanger X*, Morel C, Decaris B and Guédon G. Régulation de l'excision des éléments intégratifs potentiellement conjugatifs de *Streptococcus thermophilus* : rôle du répresseur Arp1. 14ème Symposium du Club des Bactéries Lactiques. Paris, France. Mai 2006

7.5 Communications par Poster dans des Congrès Internationaux

Les personnes ayant réalisées les présentations ci-dessous sont indiquées par une astérisque (*).

- De la Cruz Barrón M*, Bellanger X, Guilloteau H, Montargès-Pelletier E, Merlin C. Compartmentalization of class 1 integrons and IncP-1 plasmids in the Orne river (France), an aquatic ecosystem impacted by urban and industrial anthropogenic pressures. XENOWAC II, Limassol, Chypre. Octobre 2018.
- De la Cruz Barrón M*, Guilloteau H, Mathieu L, Merlin C, Bellanger X. Compartmentalization and activity of class 1 integrons and IncP-1 plasmids in river sediments impacted by urban and industrial anthropogenic pressure. 7th FEMS Congress of European Microbiologist. Barcelone, Espagne. Juillet 2017
- Scornec H, Bellanger X, Guilloteau H, Groshenry G, Pradalier C, Merlin C*. When sub-inhibitory concentrations of antibiotics promote the dissemination of unselected resistance genes. 7th FEMS Congress of European Microbiologist. Barcelone, Espagne. Juillet 2017
- De la Cruz-Barrón M, Adjobi A, Guilloteau H, Mathieu L, Merlin C, Bellanger X*. Investigating the compartmentalization and the activity of class 1 integrons and IncP-1 plasmids in the Orne River, France. Plasmid Biology Conference. Cambridge, Angleterre. Septembre 2016
- Bellanger X, Guilloteau H, Merlin C*. Investigating plasmid transfer in environmental matrices using molecular approaches. "The history of plasmids", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (USA). Septembre 2014.
- Bellanger X, Morel C, Puymege A, Payot S and Guédon G*. Accretion by site-specific recombination and conjugative mobilization: major mechanisms of evolution and transfer of streptococcal genomic islands? International Congress on Transposable Elements 2012. St Malo, France. Mai 2012
- Bellanger X *, B Decaris, G Guédon, C Morel. Site-specific accretion and mobilization in *cis*: two recently characterized mechanisms of genomic island evolution. Antibiotics and Resistance: Challenges and Solutions, Keystone Symposium. Santa Fe, Nouveau Mexique (USA). Février 2010
- Bellanger X*, Morel C, Decaris B and Guédon Site-specific accretion and mobilization in *cis*: two recently characterized mechanisms of genomic island evolution. 3rd FEMS Congress of European Microbiologist. Göteborg, Suède. Juin-juillet 2009 (Young scientist award)
- Burrus V, Pavlovic G, Choulet F, Toulmay A, Bellanger X, Guédon G*. Evolution of genomic islands by site-specific accretion and *cis*-mobilization. International Congress on Transposable Elements 2008. St Malo, France. Mai 2008
- Bellanger X*, A.P. Roberts, P. Mullany, B. Decaris & G. Guédon Characterization of the conjugative transfer of IC*Est1* and IC*Est3* from *Streptococcus thermophilus* 162nd Meeting of the Society for General Microbiology. Edinbourg, Ecosse. Avril 2008 (Meeting Travel Grant)

- Bellanger X*, Morel C, Decaris B and Guédon G. Implication of the *arp1* Gene in the Induction of the Excision of Integrative and Potentially Conjugative Elements from *Streptococcus thermophilus* by mitomycin C. 9th Conference on Streptococcal Genetics of the American Society for Microbiology. Saint Malo, France. Juin 2006

7.6 Communications par Poster dans des Congrès Nationaux

Les personnes ayant réalisées les présentations ci-dessous sont indiquées par une astérisque (*).

- Roman V*, Bellanger X, Merlin C. Effect of the antibiotics at sub-inhibitory concentrations on the spread of mobile genetics elements from the SXT family in fish farming. 21^{ème} Colloque National sur les Elements Transposables. Clermont-Ferrand. Juillet 2018.
- Hartard C, Rivet R, Banas S, Bellanger X*, Gantzer C. Genetic Diversity of F-Specific RNA Bacteriophages isolated from Urban and Animal Waste as a Tool for Tracking the Origin of Fecal Pollution. Colloque Interactions Phages-Bactéries. Montpellier. Novembre 2015
- Bellanger X*, Goussard S, Cerballeira Rodriguez JD, Courvalin P, de la Cruz F, Grillot-Courvalin C. Development of a site-specific integration system for safer gene therapy. 11ème colloque des Jeunes Chercheurs français en mucoviscidose. Paris. Mars 2010
- Bellanger X, Morel C, Decaris B and Guédon G*. *Cis*-mobilization of a genomic island by the related integrative and conjugative element ICESt3 from *Streptococcus thermophilus*. 16ème Symposium du Club des Bactéries Lactiques. Toulouse, France. Mai 2009
- Bellanger X*, Roberts A.P, Mullany, P, Decaris B, Guédon G. Mise en évidence du transfert conjugatif des îlots génomiques ICESt1 et ICESt3 de *Streptococcus thermophilus*. 15ème colloque des bactéries lactiques. Rennes, France. Novembre 2007.
- Bellanger X, Morel C, Decaris B, Guédon G*. Implication du gène *arp1* dans l'induction de l'excision des éléments intégratifs potentiellement conjugatifs ICESt1 et ICESt3 de *Streptococcus thermophilus* par la mitomycine C. 14ème rencontre des microbiologistes de l'INRA. Dourdan, France. Juillet 2006.
- Bellanger X*, Decaris B and Guédon G. Evolution par accréation et échanges entre des éléments intégratifs conjugatifs et îlots génomiques intégrés dans deux loci différents de *Streptococcus thermophilus*. 14ème Symposium du Club des Bactéries Lactiques. Paris, France. Mai 2006

7.7 Valorisation

Un dossier de déclaration d'invention relatif au travail mené dans le cadre du projet ANR BIOAPDAPT « RéguloMobile » et à l'article Scornec *et al* (2017) a été déposé auprès de la SAYENS fin 2017 (en cours d'étude). Il concerne une méthode de criblage de molécule active sur des promoteurs bactériens grâce à l'utilisation de biosenseurs luminescents et d'une caméra CDD à comptage de photon très sensible.

8. Rayonnement Scientifique

J'ai été invité à présenter mes travaux ou à effectuer un cours en dehors de l'Université de Lorraine à trois reprises et mon expertise a été requise plusieurs fois pour l'évaluation d'articles et de chapitres d'ouvrage, une table ronde et la remise de prix scientifiques. J'ai reçu une bourse de l'EMBO (European Molecular Biology Organization) qui m'a permis de passer trois mois dans un laboratoire anglais pendant ma thèse et deux bourses de la FEMS (Federation of European Microbiological Societies) à l'occasion de congrès. Par ailleurs, j'ai été membre de l'Action COST NEREUS ES1403 (New and emerging challenges and opportunities in wastewater reuse) et suppléant au sein du comité de management de cette Action COST. Tous les détails sont présentés ci-dessous :

8.1 Cours et Conférences invités

Les personnes ayant réalisées les cours ou conférences invités ci-dessous sont indiquées par une astérisque (*) :

- Bellanger X*. Introduction à la microbiologie des biofilms. Cours magistral invité à l'école thématique du CNRS « Biofilms bactériens : réactivité aux interfaces et dans l'espace intercellulaire ». Merville-Franceville, France. Octobre 2017
- Bellanger X, Guilloteau H, Merlin C*. Persistence and dissemination of the multiple-antibiotic-resistance plasmid pB10 in complex environment matrices. Conférence invitée lors du Jointed workshop « Wastewater reuse applications and contaminants of emerging concern » organisé par le groupe NORMAN et l'Action COST TD0803 DARE (« Detecting evolutionary hot spots of antibiotic resistances in Europe »). Limassol, Chypre. Septembre, 2012
- Bellanger X*, Morel C, Decaris B, Guédon G. Horizontal gene transfer and dynamics of bacterial genomes. Conférence invitée à l'Université de Lausanne (Unil), Suisse. Juillet 2012

8.2 Expertises Scientifiques

La liste suivante présente les différentes sollicitations que j'ai reçu pour expertiser des travaux, des candidatures, des manuscrits ou des propositions de communications en congrès :

- Membre du **comité de suivi de thèse** de Caroline Choufa dont le travail est intitulé « Transfert de gènes chez les bactéries et fonctionnement de la rhizosphère » et dirigé par P. Leblond et C. Bontemps (Dynamic UMR1128 INRA-Université de Lorraine) et M. Vos (Université d'Exeter, Royaume-Uni). Depuis février 2019.
- Membre du **comité de suivi de thèse** de Nicolas Maurice dont le travail est intitulé « Les zones de rejet végétalisées de grande taille : observation et modélisation » et dirigé par M.N. Pons (LRGP UMR 7274 CNRS-Université de Lorraine). Depuis novembre 2018.
- Membre du **comité scientifique du congrès XENOWAC II** (Challenges and Solutions related to Xenobiotics and Antimicrobial Resistance in the Framework of Urban Wastewater Reuse: Towards a blue circle society). Limassol, Chypre. Octobre 2018.
- **Paneliste invité lors de la table ronde** « Monitoring Big or Monitoring Smart » organisé par l'Action COST NEREUS ES1403 à Limassol, Chypre. Octobre 2018.

- **Evaluation d'un chapitre d'ouvrage** publié dans le cadre de l'Ecole Thématique CNRS BIODEMAT « Biodétérioration des matériaux : interactions biofilms-alliages métalliques ou bétons ». Février 2016
- **Evaluation d'articles** publiés dans des journaux internationaux à comité de lecture dont :
 - « Water research » (FI : 7,051)
 - « Molecular Ecology » (FI : 6,131)
 - « Journal of Antimicrobial Chemotherapy » (FI : 5,217)
 - « Sciences of the Total Environment » (FI : 4,610)
 - « Journal of Oral Microbiology » (FI : 4,444)
 - « Frontiers in Microbiology » (FI : 4,019)
 - « Journal of Bacteriology » (FI : 3,219)
 - « Microbial Drug Resistance » (FI : 2,344)

Facteurs d'impact (FI) relevés en janvier 2019 (Web of Knowledge)

- **Evaluation de dossiers de candidature** au « Prix de l'ASTEE » 2014 et 2019 (Association Scientifique et Technique pour l'Eau et l'Environnement) décerné annuellement à un(e) jeune Doctorant(e) dont le sujet de Doctorat d'Université a porté sur la thématique eau (traitement des eaux usées, potabilisation, ...).

8.3 Implication dans des Réseaux Scientifiques

8.3.1 Zone Atelier Moselle (ZAM)

La Zone Atelier du bassin versant de la Moselle (ZAM) est un consortium scientifique labélisé par l'Institut Ecologie et Environnement du CNRS dont les activités de recherche sont orientées sur l'environnement et les anthroposystèmes. La ZAM rassemble des chercheurs issus de 14 laboratoires rattachés à 5 organismes différents (AgroParisTech, Anses, CNRS, INRA, Université de Lorraine) autour de la protection des ressources en eau. Elle se focalise sur la Moselle et son bassin versant pour y mener des recherches pluridisciplinaires sur le long terme. Au sein de la ZAM se retrouvent notamment des physico-chimistes, minéralogistes, géochimistes, hydrogéologues, microbiologistes environnementaux et écotoxicologistes.

Je suis un membre actif de cette communauté depuis 2012 ce qui me permet de participer à différents projets collectifs et de compter sur la ZAM pour des projets plus personnels comme l'étude des phages dans les rivières de Lorraine en obtenant de nombreuses données physico-chimiques sur des prélèvements communs d'eau, de matières en suspension ou de sédiments.

Par ailleurs les thèses de Doctorat d'Université de Magali de la Cruz Barrón et de Véronica Roman ont été labellisées par la ZAM ce qui leur a permis d'obtenir un soutien du réseau.

8.3.2 RTP « Phages.fr »

Je suis membre du réseau thématique pluridisciplinaire (RTP) « Phages.fr » depuis sa création en novembre 2015. Un RTP est une formule institutionnelle nationale de regroupement de laboratoires, d'équipes de recherche ou de scientifiques de différentes disciplines autour d'un thème particulier ou d'un objectif clairement défini. Le RTP « Phages.fr » fédère les chercheurs et scientifiques de France ayant un thème de recherche, animent une start-up ou développent des traitements bactéricides innovants en lien avec les bactériophages.

Dans ce contexte, j'ai pris la responsabilité de l'animation du groupe de travail « Ecologie des Phages » qui s'est créé en 2017 au sein de ce RTP. A ce titre, j'ai organisé et animé trois réunions de travail de notre groupe, sur le site du CNRS à Gif-sur-Yvette en novembre 2017, à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine en mai 2018 et, à l'ENS Lyon en mars 2019.

8.3.3 Action COST NEREUS ES1403

J'ai participé à l'Action COST NEREUS ES1403 (« New and emerging challenges and opportunities in wastewater reuse » ; 2014-2018) en tant que membre français suppléant du comité de management et membre du « Working Group 1: Microbiome and mobile antibiotic resistome in treated wastewater and in downstream environments ». Ce programme intergouvernemental de mise en réseau de chercheurs, financé par la Commission Européenne, visait à déterminer lesquels des défis actuels liés à la réutilisation des eaux usées sont problématiques en matière de santé publique et de protection de l'environnement, et comment ceux-ci peuvent être surmontés.

Dans le cadre de ce programme, j'ai participé notamment à l'accomplissement d'un des Work Package consistant en la rédaction d'une revue de synthèse intitulée « Elucidating the scope, persistence and horizontal gene transfer potential of DNA that is not associated to viable bacterial cells - in wastewater effluents and downstream environments ».

8.4 Collaborations Scientifiques

Les différents travaux que j'ai effectués au LCPME m'ont permis de développer mon réseau scientifique et de nouer des collaborations régulières ou plus ponctuelles. Mes collaborations les plus significatives et leurs thèmes sont mentionnés dans la liste suivante :

- **A l'Université de Lorraine (or LCPME) :**
 - Patrick Billard (LIEC UMR7360 CNRS-UL) : Interactions bactéries-métaux ; 2 publications
 - Emmanuelle Montargès-Pelletier (LIEC UMR7360 CNRS-UL) : Occurrence d'éléments génétiques mobiles dans l'Orne ; 1 publication et 1 conférence internationale, ANR MobiSed.
 - Raphaël Schneider (LRGP UMR 7274 CNRS-UL) : Stabilité et toxicité de Quantum Dots de ZnO et réponse au stress du système bactérien ; 2 publications, ANR NanoZnOTox.
 - Marie-Noëlle Pons (LRGP UMR 7274 CNRS-UL) : Transduction phagique dans l'environnement et qualité des eaux de surface
- **A l'Université de Limoges :**
 - Marie Cécile Ploy et Sandra Da Ré (UMR Inserm 1092) : Occurrence et activité d'éléments génétiques mobiles, ANR RéguloMobile.
- **A Georgia Tech Lorraine :**
 - Cédric Pradalier (UMI 2958 GT-CNRS) : Activité d'éléments génétiques mobiles ; 5 communications internationales et nationales, 1 dépôt de déclaration d'invention.
- **A l'Anses (Ploufragan/Plouzané) :**
 - Sandrine Baron et Thierry Morin : Occurrence et activité de l'ICE SXT dans l'environnement ; Projet SQUARESIST

- **via les participations à des réseaux et des projets scientifiques européens** (Action COST NEREUS ES1403 et Prima-H2020 DSWAP) :
 - Eddie Cytryn (Agricultural Research Organization, Israël) et Thomas Berendonk (Technical University of Dresden, Allemagne) : Recherche de pathogènes bactériens et viraux, de gènes de résistance aux antibiotiques et d'éléments génétiques mobiles dans l'eau et le sol
 - Marko Virta (University of Helsinki, Finlande) : Occurrence d'éléments génétiques mobiles dans l'environnement
 - Olga Nunes et Rita Lopes (University of Porto, Portugal) : Etude du transfert conjugatif d'un plasmide de *Gulosibacter molinatiovorax*

8.5 Bourses de Mobilité et Prime Scientifique

J'ai reçu une bourse de l'EMBO (European Molecular Biology Organization) qui m'a permis de passer trois mois dans un laboratoire anglais pendant mon Doctorat et deux bourses de la FEMS (Federation of European Microbiological Societies) à l'occasion de congrès lors desquels j'ai présenté mes travaux en conférences. Nous avons pu, grâce à l'Action COST NEREUS ES1403, obtenir une bourse qui a permis le déplacement de Véronica Roman dans un laboratoire finlandais pendant un mois. Enfin, mon travail de recherche et mon implication dans la formation de jeunes chercheurs m'ont également permis d'être le bénéficiaire de la Prime d'Encadrement Doctoral et de Recherche (PEDR) :

- **Bénéficiaire de la PEDR** (depuis septembre 2018).
- **Short Term Scientific Mission Grant** obtenue grâce à l'Action COST NEREUS ES1403 et qui a permis à Véronica Roman de passer un mois dans le laboratoire de Marko Virta (University of Helsinki, Finlande) et d'initier une collaboration sur l'occurrence d'éléments génétiques mobiles dans l'environnement. Janvier 2018.
- **FEMS Young Scientists Meeting Grant** reçue à l'occasion d'une présentation orale et de la participation au « 3rd International symposium on the environmental dimension of antibiotic resistance », Wernigerode, Allemagne, mai 2015
- **FEMS Young Scientists Meeting Grant** reçue à l'occasion de la présentation d'un poster et de la participation au « 3rd FEMS Congress of European Microbiologist », Gotheborg, Suède. Juin-juillet 2009
- **EMBO Short Term Fellowship Grant** (grant number : ASTF 279-2006) m'ayant permis de réaliser une collaboration concernant mes travaux de thèse et de passer trois mois à l'Eastman Dental Institute, University College London. Janvier à mars 2007.

9. Responsabilités Scientifiques et Administratives.

9.1 Rédaction, Coordination et Participation à des Projets Scientifiques

La Figure 21 ci-dessous résume les projets de recherche dans lesquels j'ai été impliqué depuis la fin de mon Doctorat. Ces projets sont davantage détaillés dans la suite de ce paragraphe.

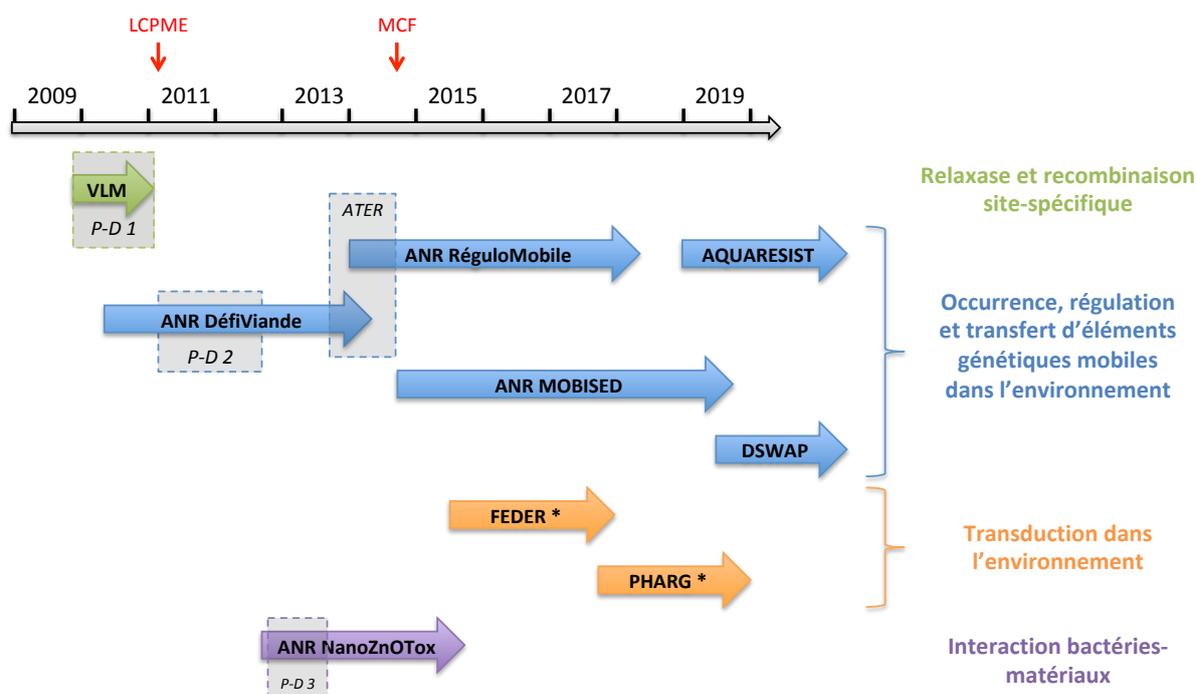


Figure 21 : Résumé des projets de recherche auxquels j'ai participé depuis la fin de mon Doctorat.

Les rectangles grisés symbolisent les différents postes que j'ai occupé entre mon Doctorat et mon recrutement en qualité de Maître de Conférence (MCF). Les astérisques (*) indiquent les projets dont je suis/étais le coordinateur. Mon arrivée au LCPME et mon recrutement en qualité de MCF sont représentés par des flèches rouges. FEDER : Fonds Européens de Développement Régional ; P-D : Post-Doctorat ; VLM : Vaincre la Mucoviscidose.

La liste suivante présente les différents projets dans lesquels je suis/étais impliqué en tant que participant et/ou coordinateur. Les financements de projet que j'ai obtenus ou participé à obtenir sont indiqués en bleu.

- Participation à la réalisation d'un projet Prima-Horizon 2020 « Water Management » – Titre du projet : DSWAP : Decision support-based approach for sustainable water reuse application in agricultural production (de février 2019 à février 2022) – Appel à projet de Prima (Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area) et de l'UE via le fond Horizon 2020 : 2 M€ (dont LCPME : 200 k€) – Permettra le recrutement d'un Post-Doctorant (24 mois) – Coordinateur : Eddie Cytryn (Agricultural Research Organization (ARO), Israël)

- Participation à la rédaction et à la réalisation d'un projet financé par l'Anses dans le cadre du Programme National de Recherche – Titre du projet : AQUARESIST : Influence des polluants aquatiques et des pratiques d'élevage sur la dissémination de l'antibiorésistance en milieu piscicole (de décembre 2018 à décembre 2021) – Permettra le recrutement de 2 stagiaires de Master 2 (6 mois) et d'un(e) Technicien(ne) (12 mois) – Aide de l'Anses : 163 k€ (dont LCPME : 82 k€) – Coordinateur: C. Merlin (LCPME)
- Rédaction, Réalisation et Coordination d'un projet financé par l'Anses dans le cadre du Programme National de Recherche « Antibiorésistance et Environnement » – Titre du projet : PHARG : Rôle des bactériophages environnementaux dans la dissémination des gènes d'antibiorésistance (d'octobre 2017 à décembre 2019) – A permis le recrutement d'une Assistante Ingénieur (12 mois) – Aide de l'Anses : 50 k€ – Coordinateur : X. Bellanger
- Rédaction, Réalisation et Coordination d'un projet financé par le Conseil Régional de Lorraine et l'Université de Lorraine – Titre du projet: Etude de la dissémination des gènes de résistances aux antibiotiques par les bactériophages environnementaux (de juillet 2015 à décembre 2017) – Aide du Conseil Régional et de l'Europe via les fonds FEDER : 30 k€ – Coordinateur : X. Bellanger
- Participation à la réalisation d'un projet ANR « Comprendre et prévoir les évolutions de l'environnement » – Titre du projet: MOBISED : Modélisation de la remobilisation des sédiments et libération des contaminants associés (de novembre 2014 à mai 2019) – Aide de l'ANR : 497 k€ (dont LCPME : 79 k€) – Coordinatrice : E. Montarges-Pelletier (LIEC UMR 7360 Université de Lorraine-CNRS)
- Participation à la rédaction et à la réalisation d'un projet ANR BIOADAPT – Titre du projet : Régulomobile: Identification de paramètres environnementaux affectant la dynamique d'éléments génétiques mobiles impliqués dans la dissémination de résistances aux antibiotiques (de janvier 2014 à juillet 2018) – A permis le recrutement d'une Post-Doctorante (9 mois) et d'un Assistant Ingénieur (6 mois) – Aide de l'ANR : 278 k€ (dont LCPME : 197 k€) – Coordinateur : C. Merlin (LCPME)
- Participation à la réalisation d'un projet ANR (Post-Doctorat) – Titre du projet : NanoZnOTOX : Bioperception, toxicité et stabilité de quantum dots d'oxyde de zinc (de novembre 2012 à novembre 2015) – Aide de l'ANR : 444 k€ (dont LCPME : 100 k€) – Coordinateur : R. Schneider (LRGP UMR 7274 Université de Lorraine-CNRS)
- Participation à la réalisation d'un projet ANR « Ecotech » (Post-Doctorat) – Titre du projet : DéfiViande : Meat production: towards a reduction of the impacts on health and environment (de mars 2010 à mars 2014) – Aide de l'ANR : 718 k€ (dont LCPME : 150 k€) – Coordinateur : C. DAGOT (GRESE, URA IRSTEA-Université de Limoges / EA4330)
- Participation à la rédaction et à la réalisation d'un projet « Vaincre la Mucoviscidose » (Post-Doctorat) – Titre du projet : Development of a novel site-specific recombination system for safer gene therapy (d'octobre 2009 à janvier 2011) – A permis mon recrutement en tant que Post-Doctorant (12 mois) – Aide de VLM : 130 k€ (dont Institut Pasteur : 120 k€) – Coordinateur : C. Grillot-Courvalin (Institut Pasteur - CNRS)
- Rédaction et réalisation d'un projet d'échange de court terme (EMBO short term fellowship) – Titre du projet : Characterization of the *Streptococcus thermophilus* ICEs conjugative transfer (de janvier 2007 à mars 2007) – A permis mon déplacement dans un laboratoire étranger pendant ma thèse – Aide de l'EMBO (European Molecular Biology Organization) : 6 k€ – Coordinateur : G. Guédon (LGM UMR 1128 Nancy-Université-INRA), A.P. Roberts et P. Mullany (Eastman Dental Institute, University College London)

9.2 Participation à l'Obtention de Bourse et Contrat Doctoraux

Nous avons répondu à ma demande en 2015 avec Christophe Merlin à une sollicitation de Campus France pour participer au programme d'accueil de doctorants mexicains financé par le ministère de la recherche de ce pays (CONACYT). Après avoir proposé un sujet de thèse sur le suivi de l'occurrence d'éléments génétiques mobiles dans la rivière Orne, nous avons validé la première étape du processus qui nous revenait en sélectionnant la candidature de Magali de la Cruz Barrón. Nous l'avons ensuite fortement épaulée pour la seconde étape consistant au montage du dossier administratif de candidature auprès du CONACYT. La candidature de Magali ayant été retenue par cet organisme, le Mexique a financé le Doctorat d'Université de Magali pour un total de 39 mois (octobre 2015-décembre 2018).

Après avoir co-encadré Véronica Roman en stage de Master 2, Christophe Merlin et moi avons également eut l'occasion de la présenter en 2017 au concours de l'Ecole Doctorale BioSE en vue de l'attribution de Contrats Doctoraux avec pour sujet de thèse l'étude de l'ICE SXT dans les environnements piscicoles. Le sujet de thèse proposé ayant été favorablement évalué et Véronica en ayant réussi une présentation convaincante, elle a réussi à obtenir un Contrat Doctoral et a débuté ces travaux de thèse en octobre 2017.

Enfin, j'ai été choisi fin 2018 pour proposer un sujet de thèse à notre pôle scientifique de rattachement (Pôle CPM) à l'Université de Lorraine et solliciter un Contrat Doctoral en tant que représentant de l'équipe MIC. Ce choix de l'équipe MIC a été l'une des motivations de ma démarche de demande d'Habilitation à Diriger des Recherches. Cependant, étant encore non-habilité, j'ai sollicité C. Merlin pour qu'il m'appuie dans ma démarche auprès du Pôle CPM. Le sujet qui a été proposé reprend la majorité des approches présentées dans mes perspectives à moyen terme d'étude des acteurs et des mécanismes de dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement (§ 4.2.2). Nous avons passé avec succès une audition devant le Conseil de pôle et pourront recruter un(e) étudiant(e) en thèse dont les travaux débiteront en octobre 2019.

9.3 Autres Responsabilités Scientifiques

Comme déjà indiqué dans le paragraphe §8.3.2, je suis le coordinateur du groupe de travail « Ecologie des Phages » au sein du Réseau Thématique Pluridisciplinaire (RTP) « Phages.fr » et ai organisé en cette qualité plusieurs réunions nationales se déroulant sur une journée.

9.4 Comités de Recrutements de Personnels en CDD

J'ai à ce jour participé à 5 comités de recrutement en CDD de Personnels Techniques ou Post-Doctorants pour le LCPME ou son Plateau Technique BME. Cette tâche consiste en un examen des dossiers de candidature, à une sélection des personnes retenues pour audition puis, après ces dernières, de l'établissement d'un classement des candidats. La liste de ces participations est la suivante :

- **Comité de recrutement d'un Chercheur H/F en Virologie environnementale** dans le cadre des travaux mené à dans l'Unité Mixte de Technologie (UMT) réunissant Actalia (Institut Technique Agro-Industriel, ITAI) et le LCPME. Janvier 2019.

- **Comité de recrutement d'un Post-Doctorant H/F en Microbiologie-Géomicrobiologie-Géologie** pour un contrat de 18 mois sur un projet GIS Geodenergies intitulé RosTOCK-H (Risques et Opportunités du STOCKage géologique d'Hydrogène en cavités salines en France et en Europe) dirigé par F. Jorand (LCPME) et F. Golfier (Laboratoire Géoressources, UMR 7359 CNRS-UL). Décembre 2018.
- **Comité de recrutement d'un Assistant Ingénieur H/F en Virologie environnementale** pour un contrat de 12 mois sur le projet de recherche PHARG (financement Anses) dirigé par X. Bellanger. Novembre 2017.
- **Comité de recrutement d'un Assistant Ingénieur H/F en Virologie environnementale** pour un contrat de 12 mois pour le Plateau Technique BME du LCPME. Novembre 2017.
- **Comité de recrutement d'un Post-Doctorant H/F en Microbiologie et Biologie moléculaire** pour un contrat de 13 mois sur le projet ANR RéguloMobile dirigé par C. Merlin (LCPME). Octobre 2014.

9.5 Autres Responsabilités Administratives

Mes responsabilités administratives sont détaillées dans la liste ci-dessous. Je suis notamment investi dans la gestion de notre bâtiment de recherche, du plateau technique de biologie moléculaire environnementale (BME) du LCPME et de la promotion de la recherche dans notre Faculté de Pharmacie. Mes responsabilités administratives liées à la pédagogie (Responsabilité des TP de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie et Responsabilité du double cursus « Pharma + ENSAIA ») ont été abordés dans le paragraphe §2.4 et ne le seront pas ici.

Liste de mes responsabilités administratives :

- **Représentant du LCPME au Comité de Pilotage et de Gestion du « Site Brabois Ingénierie »** de l'Université de Lorraine. Ce comité s'assure principalement de la bonne gestion du patrimoine immobilier du site, des travaux de rénovation et d'entretien, de la sécurisation des locaux, ... (depuis mars 2018).
- **Responsable du Plateau Technique BME** (Biologie Moléculaire Environnementale) du LCPME qui est ouvert aux mondes académique et industriel (production et concentration de phages modèles ; diagnostique de contamination fécale des eaux de consommation ou environnementales grâce à la détection de phages d'*Escherichia coli* ARN-F spécifiques ; ...) (depuis janvier 2018).
- **Membre nommé de la Commission Recherche** de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine qui gère notamment les Stages d'Initiation à la Recherche, options proposées aux étudiants en Pharmacie, la remise de divers Prix de thèse d'Université et d'Exercice et l'animation des Journées Portes Ouvertes de la Faculté (depuis mars 2015 ; 2^{ème} mandat en cours).

10. Bibliographie

- Ackermann, H.-W., DuBow, M.S., 1987. *Viruses of Prokaryotes: Natural groups of bacteriophages*. CRC Press.
- Agúndez, L., Machón, C., César, C.E., Rosa-Garrido, M., Delgado, M.D., Llosa, M., 2011. Nuclear targeting of a bacterial integrase that mediates site-specific recombination between bacterial and human target sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 201–210. <https://doi.org/10.1128/AEM.01371-10>
- Alawi, M., Schneider, B., Kallmeyer, J., 2014. A procedure for separate recovery of extra- and intracellular DNA from a single marine sediment sample. *J. Microbiol. Methods* 104, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.06.009>
- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Arroua, B., Bellanger, X., Guilloteau, H., Mathieu, L., Merlin, C., 2014. Atypical stress response to temperature and NaOCl exposure leading to septation defect during cell division in *Cupriavidus metallidurans* CH34. *FEMS Microbiol. Lett.* 353, 32–39.
- Baharoglu, Z., Mazel, D., 2014. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1126–1145. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>
- Baharoglu, Z., Mazel, D., 2011. *Vibrio cholerae* Triggers SOS and Mutagenesis in Response to a Wide Range of Antibiotics: a Route towards Multiresistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2438–2441. <https://doi.org/10.1128/AAC.01549-10>
- Balcázar, J.L., 2018. How do bacteriophages promote antibiotic resistance in the environment? *Clin. Microbiol. Infect.* 24, 447–449. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.010>
- Battin, T.J., Besemer, K., Bengtsson, M.M., Romani, A.M., Packmann, A.I., 2016. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 251–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15>
- Beaber, J.W., Hochhut, B., Waldor, M.K., 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427, 72–74. <https://doi.org/10.1038/nature02241>
- Bellanger, X., Billard, P., Schneider, R., Balan, L., Merlin, C., 2015. Stability and toxicity of ZnO quantum dots: interplay between nanoparticles and bacteria. *J. Hazard. Mater.* 283, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.017>
- Bellanger, X., Guilloteau, H., Bonot, S., Merlin, C., 2014a. Demonstrating plasmid-based horizontal gene transfer in complex environmental matrices: a practical approach for a critical review. *Sci. Total Environ.* 493, 872–882. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.070>
- Bellanger, X., Guilloteau, H., Breuil, B., Merlin, C., 2014b. Natural microbial communities supporting the transfer of the IncP-1 β plasmid pB10 exhibit a higher initial content of plasmids from the same incompatibility group. *Front. Microbiol.* 5, 637. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00637>
- Bellanger, X., Morel, C., Decaris, B., Guédon, G., 2008. Regulation of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus*: role of the arp1 repressor. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14, 16–21. <https://doi.org/10.1159/000106078>
- Bellanger, X., Morel, C., Decaris, B., Guédon, G., 2007. Derepression of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus* by DNA damage response: implication of a *cl*-related repressor. *J. Bacteriol.* 189, 1478–1481. <https://doi.org/10.1128/JB.01125-06>
- Bellanger, X., Morel, C., Gonot, F., Puymège, A., Decaris, B., Guédon, G., 2011. Site-specific accretion of an integrative conjugative element together with a related genomic island leads to *cis* mobilization and gene capture. *Mol. Microbiol.* 81, 912–925. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07737.x>

- Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N., Guédon, G., 2014c. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 720–760. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12058>
- Bellanger, X., Roberts, A.P., Morel, C., Choulet, F., Pavlovic, G., Mullany, P., Decaris, B., Guédon, G., 2009. Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICESt1 and ICESt3 from *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 191, 2764–2775. <https://doi.org/10.1128/JB.01412-08>
- Bellanger, X., Schneider, R., Dezanet, C., Arroua, B., Billard, P., Merlin, C., 2019. Using DNA damage to assess cryptic photo-induced ROS effects generated by metal oxide nanoparticles. *Soumis À ACS. Nano.*
- Bengtsson-Palme, J., Larsson, D.G.J., Kristiansson, E., 2017. Using metagenomics to investigate human and environmental resistomes. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 2690–2703. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx199>
- Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., Martinez, J.L., 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- Berg, C.M., Grullón, C.A., Wang, A., Whalen, W.A., Berg, D.E., 1983. Transductional instability of Tn5-induced mutations: generalized and specialized transduction of Tn5 by bacteriophage P1. *Genetics* 105, 259–263.
- Beumer, A., Robinson, J.B., 2005. A Broad-Host-Range, Generalized Transducing Phage (SN-T) Acquires 16S rRNA Genes from Different Genera of Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8301–8304. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8301-8304.2005>
- Bioteau, A., Durand, R., Burrus, V., 2018. Redefinition and Unification of the SXT/R391 Family of Integrative and Conjugative Elements. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e00485-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00485-18>
- Bonot, S., Merlin, C., 2010. Monitoring the Dissemination of the Broad-Host-Range Plasmid pB10 in Sediment Microcosms by Quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 378–382. <https://doi.org/10.1128/AEM.01125-09>
- Brabban, A. d., Hite, E., Callaway, T. r., 2005. Evolution of Foodborne Pathogens via Temperate Bacteriophage-Mediated Gene Transfer. *Foodborne Pathog. Dis.* 2, 287–303. <https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.287>
- Brown, K.D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T.H., Mawhinney, D.B., 2006. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci. Total Environ.* 366, 772–783. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.10.007>
- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., Espinal, P., Rodríguez-Navarro, J., Miró, E., González-López, J.J., Cornejo, T., Hurtado, J.C., Navarro, F., Muniesa, M., 2018. Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human faeces and induced from clinical bacterial isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51, 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.11.014>
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., Guédon, G., 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol. Microbiol.* 46, 601–610. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03191.x>
- Calendar, R., 2012. *The Bacteriophages*. Springer Science & Business Media.
- Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., Muniesa, M., 2014. Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7602–7611. <https://doi.org/10.1021/es501851s>
- Calero-Cáceres, W., Méndez, J., Martín-Díaz, J., Muniesa, M., 2017. The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environ. Pollut.* 223, 384–394. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.035>
- Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Guerin, É., Da Re, S., González-Zorn, B., Ploy, M.-C., Barbé, J., Mazel, D., Erill, I., 2011. Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mob. DNA* 2, 6. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-2-6>

- Carraro, N., Matteau, D., Burrus, V., Rodrigue, S., 2015. Unraveling the regulatory network of IncA/C plasmid mobilization: When genomic islands hijack conjugative elements. *Mob. Genet. Elem.* 5, 34–38. <https://doi.org/10.1080/2159256X.2015.1045116>
- Carraro, N., Matteau, D., Luo, P., Rodrigue, S., Burrus, V., 2014. The Master Activator of IncA/C Conjugative Plasmids Stimulates Genomic Islands and Multidrug Resistance Dissemination. *PLoS Genet.* 10, e1004714. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004714>
- Casas, V., Rohwer, F., 2007. Phage Metagenomics, in: *Methods in Enzymology, Advanced Bacterial Genetics: Use of Transposons and Phage for Genomic Engineering*. Academic Press, pp. 259–268. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)21020-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)21020-6)
- Celli, J., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., 1997. Use of an excision reporter plasmid to study the intracellular mobility of the conjugative transposon Tn916 in Gram-positive bacteria. *Microbiology* 143, 1253–1261. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-4-1253>
- Chang, X., Meyer, M.T., Liu, X., Zhao, Q., Chen, H., Chen, J., Qiu, Z., Yang, L., Cao, J., Shu, W., 2010. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. *Environ. Pollut.* 158, 1444–1450. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.12.034>
- Chen, B., He, R., Yuan, K., Chen, E., Lin, Lan, Chen, X., Sha, S., Zhong, J., Lin, Li, Yang, L., Yang, Y., Wang, X., Zou, S., Luan, T., 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enriching antibiotic resistance genes (ARGs) in the soils. *Environ. Pollut.* 220, 1005–1013. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.047>
- Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.-L., Brüßow, H., 2004. Phage-Host Interaction: an Ecological Perspective. *J. Bacteriol.* 186, 3677–3686. <https://doi.org/10.1128/JB.186.12.3677-3686.2004>
- Clewell, D.B., Tomich, P.K., Gawron-Burke, M.C., Franke, A.E., Yagi, Y., An, F.Y., 1982. Mapping of *Streptococcus faecalis* plasmids pAD1 and pAD2 and studies relating to transposition of Tn917. *J. Bacteriol.* 152, 1220–1230.
- Colombo, S., Arioli, S., Guglielmetti, S., Lunelli, F., Mora, D., 2016. Virome-associated antibiotic-resistance genes in an experimental aquaculture facility. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw003>
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., 2014. Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1265–1274. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt528>
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., 2011. Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. *PLoS ONE* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017549>
- Courvalin, P., 2008. New plasmid-mediated resistances to antimicrobial agents. *Arch. Microbiol.* 189, 289–291. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0331-9>
- Danovaro, R., Armeni, M., Corinaldesi, C., Mei, M.L., 2003. Viruses and marine pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 301–304. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00461-7](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00461-7)
- De la Cruz Barrón, M., 2018. Compartimentation des intégrons de classe 1 et des plasmides IncP-1 dans la rivière Orne (France), un écosystème aquatique soumis à des pressions anthropiques urbaines et industrielles. Université de Lorraine.
- De la Cruz Barrón, M., Merlin, C., Guilloteau, H., Montargès-Pelletier, E., Bellanger, X., 2018. Suspended Materials in River Waters Differentially Enrich Class 1 Integron- and IncP-1 Plasmid-Carrying Bacteria in Sediments. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01443>
- Dugat-Bony, E., Lossouarn, J., Paepe, M.D., Sarthou, A.-S., Fedala, Y., Petit, M.-A., Chaillou, S., 2018. Viral metagenomic analysis of the cheese surface: a comparative study of rapid procedures for extracting virus-like particles. *bioRxiv* 503599. <https://doi.org/10.1101/503599>
- Elsas, V., Dirk, J., Bailey, M.J., 2002. The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 187–197. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb01008.x>

- Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., Sullivan, M.B., Petit, M.-A., 2017. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *ISME J.* 11, 237–247. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.90>
- Ezzariai, A., Hafidi, M., Khadra, A., Aemig, Q., El Fels, L., Barret, M., Merlina, G., Patureau, D., Pinelli, E., 2018. Human and veterinary antibiotics during composting of sludge or manure: Global perspectives on persistence, degradation, and resistance genes. *J. Hazard. Mater.* 359, 465–481. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.092>
- Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R.H., Phan, C., Tysklind, M., Larsson, D.G.J., 2009. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2522–2527. <https://doi.org/10.1897/09-073.1>
- Finley, R.L., Collignon, P., Larsson, D.G.J., McEwen, S.A., Li, X.-Z., Gaze, W.H., Reid-Smith, R., Timinouni, M., Graham, D.W., Topp, E., 2013. The Scourge of Antibiotic Resistance: The Important Role of the Environment. *Clin. Infect. Dis.* 57, 704–710. <https://doi.org/10.1093/cid/cit355>
- Forterre, P., Soler, N., Krupovic, M., Marguet, E., Ackermann, H.-W., 2013. Fake virus particles generated by fluorescence microscopy. *Trends Microbiol.* 21, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.10.005>
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., Toussaint, A., 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 722–732. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
- Gestal, A.M., Liew, E.F., Coleman, N.V., 2011. Natural transformation with synthetic gene cassettes: new tools for integron research and biotechnology. *Microbiology* 157, 3349–3360. <https://doi.org/10.1099/mic.0.051623-0>
- Ghigo, J.-M., 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412, 442–445. <https://doi.org/10.1038/35086581>
- Grillot-Courvalin, C., Goussard, S., Courvalin, P., 2002. Wild-type intracellular bacteria deliver DNA into mammalian cells. *Cell. Microbiol.* 4, 177–186.
- Grüll, M.P., Mulligan, M.E., Lang, A.S., 2018. Small extracellular particles with big potential for horizontal gene transfer: membrane vesicles and gene transfer agents. *FEMS Microbiol. Lett.* 365. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny192>
- Guerin, É., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Re, S.D., Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.-C., Mazel, D., 2009. The SOS Response Controls Integron Recombination. *Science* 324, 1034–1034. <https://doi.org/10.1126/science.1172914>
- Guglielmini, J., Quintais, L., Garcillán-Barcia, M.P., Cruz, F. de la, Rocha, E.P.C., 2011. The Repertoire of ICE in Prokaryotes Underscores the Unity, Diversity, and Ubiquity of Conjugation. *PLOS Genet.* 7, e1002222. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002222>
- Guo, J., Li, J., Chen, H., Bond, P.L., Yuan, Z., 2017. Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Res.* 123, 468–478. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.002>
- Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E.T., Schwartz, T., 2017. Occurrence of the *mcr-1* Colistin Resistance Gene and other Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Microbial Populations at Different Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01282>
- Hyman, P., Abedon, S.T., 2010. Chapter 7 - *Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance*, in: *Advances in Applied Microbiology*, Advances in Applied Microbiology. Academic Press, pp. 217–248. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)
- Jechalke, S., Broszat, M., Lang, F., Siebe, C., Smalla, K., Grohmann, E., 2015. Effects of 100 years wastewater irrigation on resistance genes, class 1 integrons and IncP-1 plasmids in Mexican soil. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00163>
- Jensen, E.C., Schrader, H.S., Rieland, B., Thompson, T.L., Lee, K.W., Nickerson, K.W., Kokjohn, T.A., 1998. Prevalence of Broad-Host-Range Lytic Bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 575–580.
- Jiang, S.C., Paul, J.H., 1998. Gene Transfer by Transduction in the Marine Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2780–2787.

- Johnson, C.M., Grossman, A.D., 2015. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annu. Rev. Genet.* 49, 577–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055018>
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., Górski, A., 2011. The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol.* (Praha) 56, 191–200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>
- Kanbar, H.J., Montargès-Pelletier, E., Losson, B., Bihannic, I., Gley, R., Bauer, A., Villieras, F., Manceau, L., El Samrani, A.G., Kazpard, V., Mansuy-Huault, L., 2017. Iron mineralogy as a fingerprint of former steelmaking activities in river sediments. *Sci. Total Environ.* 599–600, 540–553. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.156>
- Katipoglu-Yazan, T., Merlin, C., Pons, M.-N., Ubay-Cokgor, E., Orhon, D., 2016. Chronic impact of sulfamethoxazole on the metabolic activity and composition of enriched nitrifying microbial culture. *Water Res.* 100, 546–555. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.043>
- Katipoglu-Yazan, T., Merlin, C., Pons, M.-N., Ubay-Cokgor, E., Orhon, D., 2015. Chronic impact of tetracycline on nitrification kinetics and the activity of enriched nitrifying microbial culture. *Water Res.*, 72, 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.041>
- Kenzaka, T., Tani, K., Nasu, M., 2010. High-frequency phage-mediated gene transfer in freshwater environments determined at single-cell level. *ISME J.* 4, 648–659. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.145>
- Kenzaka, T., Tani, K., Sakotani, A., Yamaguchi, N., Nasu, M., 2007. High-Frequency Phage-Mediated Gene Transfer among *Escherichia coli* Cells, Determined at the Single-Cell Level. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3291–3299. <https://doi.org/10.1128/AEM.02890-06>
- Kiss, J., Papp, P.P., Szabó, M., Farkas, T., Murányi, G., Szakállas, E., Olasz, F., 2015. The master regulator of IncA/C plasmids is recognized by the *Salmonella* Genomic island SGI1 as a signal for excision and conjugal transfer. *Nucleic Acids Res.* 43, 8735–8745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv758>
- Klümper, U., Riber, L., Dechesne, A., Sannazzarro, A., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., Smets, B.F., 2015. Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. *ISME J.* 9, 934–945. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.191>
- Knapp, C.W., Dolfing, J., Ehlert, P.A.I., Graham, D.W., 2010. Evidence of Increasing Antibiotic Resistance Gene Abundances in Archived Soils since 1940. *Environ. Sci. Technol.* 44, 580–587. <https://doi.org/10.1021/es901221x>
- Kraker, M.E.A. de, Stewardson, A.J., Harbarth, S., 2016. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLOS Med.* 13, e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>
- Kuchta, S.L., Cessna, A.J., 2008. Lincomycin and Spectinomycin Concentrations in Liquid Swine Manure and Their Persistence During Simulated Manure Storage. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 1. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9229-z>
- Larrañaga, O., Brown-Jaque, M., Quirós, P., Gómez-Gómez, C., Blanch, A.R., Rodríguez-Rubio, L., Muniesa, M., 2018. Phage particles harboring antibiotic resistance genes in fresh-cut vegetables and agricultural soil. *Environ. Int.* 115, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.019>
- Larsson, D.G.J., Andremont, A., Bengtsson-Palme, J., Brandt, K.K., de Roda Husman, A.M., Fagerstedt, P., Fick, J., Flach, C.-F., Gaze, W.H., Kuroda, M., Kvint, K., Laxminarayan, R., Manaia, C.M., Nielsen, K.M., Plant, L., Ploy, M.-C., Segovia, C., Simonet, P., Smalla, K., Snape, J., Topp, E., van Hengel, A.J., Verner-Jeffreys, D.W., Virta, M.P.J., Wellington, E.M., Wernersson, A.-S., 2018. Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environ. Int.* 117, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.041>
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K.M., Wertheim, H.F.L., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar, F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D., Brown, E.D., Cars, O., 2013. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* 13, 1057–1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)

- Lee, L.H., Lui, D., Platner, P.J., Hsu, S.-F., Chu, T.-C., Gaynor, J.J., Vega, Q.C., Lustigman, B.K., 2006. Induction of temperate cyanophage AS-1 by heavy metal – copper. *BMC Microbiol.* 6, 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-17>
- Lekunberri, I., Subirats, J., Borrego, C.M., Balcázar, J.L., 2017. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environ. Pollut.* 220, Part B, 981–984. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.059>
- Levy, S.B., Marshall, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10, S122–S129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>
- Liu, M., Li, X., Xie, Y., Bi, D., Sun, J., Li, J., Tai, C., Deng, Z., Ou, H.-Y., 2019. ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements. *Nucleic Acids Res.* 47, D660–D665. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1123>
- Liu, P., Wu, Z., Xue, H., Zhao, X., 2017. Antibiotics trigger initiation of *SCCmec* transfer by inducing SOS responses. *Nucleic Acids Res.* 45, 3944–3952. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx153>
- Löhnis, F., 1874-, Fred, E.B., 1887-, 1923. Textbook of agricultural bacteriology.
- Manganelli, R., Romano, L., Ricci, S., Zazzi, M., Pozzi, G., 1995. Dosage of Tn916 Circular Intermediates in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* 34, 48–57. <https://doi.org/10.1006/plas.1995.1032>
- McGrath, B.M., O’Halloran, J.A., Pembroke, J.T., 2005. Pre-exposure to UV irradiation increases the transfer frequency of the IncJ conjugative transposon-like elements R391, R392, R705, R706, R997 and pMERPH and is *recA+* dependent. *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 461–465. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.013>
- Merlin, C., Bonot, S., Courtois, S., Block, J.-C., 2011. Persistence and dissemination of the multiple-antibiotic-resistance plasmid pB10 in the microbial communities of wastewater sludge microcosms. *Water Res.* 45, 2897–2905. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.002>
- Michael, I., Rizzo, L., McCardell, C.S., Manaia, C.M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Res.* 47, 957–995. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.027>
- Miller, R.V., 1992. Methods for evaluating transduction: an overview with environmental considerations, in: *Microbial Ecology. Principles, Methods, and Applications*. McGraw- Hill, Inc., New York, N.Y.
- Modi, S.R., Lee, H.H., Spina, C.S., Collins, J.J., 2013. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* 499, 219–222. <https://doi.org/10.1038/nature12212>
- Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 255–261. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00036-3)
- Muniesa, M., Colomer-Lluch, M., Jofre, J., 2013. Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiol.* 8, 739–751. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.32>
- Murooka, Y., Harada, T., 1979. Expansion of the host range of coliphage P1 and gene transfer from enteric bacteria to other gram-negative bacteria. *Appl Env. Microbiol* 38, 754–757.
- Novick, R.P., Christie, G.E., Penadés, J.R., 2010. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 541–551. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2393>
- O’Neill, J., 2014. Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.
- Osono, T., Umezawa, H., 1985. Pharmacokinetics of macrolides, lincosamides and streptogramins. *J. Antimicrob. Chemother.* 16, 151–166. https://doi.org/10.1093/jac/16.suppl_A.151
- Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D.J., Larsson, D.G.J., Hobman, J.L., 2017. Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. *Adv. Microb. Physiol.* 70, 261–313. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.02.001>

- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O., 2018. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Paul, E.A., 2014. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Academic Press.
- Pavlovic, G., Burrus, V., Gintz, B., Decaris, B., Guédon, G., 2004. Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICESt1-related elements from *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology* 150, 759–774. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26883-0>
- Poulin-Laprade, D., Carraro, N., Burrus, V., 2015. The extended regulatory networks of SXT/R391 integrative and conjugative elements and IncA/C conjugative plasmids. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00837>
- Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., Carlson, K.H., 2006. Antibiotic Resistance Genes as Emerging Contaminants: Studies in Northern Colorado. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7445–7450. <https://doi.org/10.1021/es060413l>
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., Michael, I., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Sci. Total Environ.* 447, 345–360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>
- Roberts, L., Simpson, S., 2008. Deadly Defiance. *Science* 321, 355–355. <https://doi.org/10.1126/science.321.5887.355>
- Ross, J., Topp, E., 2015. Abundance of Antibiotic Resistance Genes in Bacteriophage following Soil Fertilization with Dairy Manure or Municipal Biosolids, and Evidence for Potential Transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7905–7913. <https://doi.org/10.1128/AEM.02363-15>
- Scornec, H., Bellanger, X., Guilloteau, H., Groshenry, G., Merlin, C., 2017. Inducibility of Tn916 conjugative transfer in *Enterococcus faecalis* by subinhibitory concentrations of ribosome-targeting antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 2722–2728. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx202>
- Shousha, A., Aawaiwanont, N., Sofka, D., Smulders, F.J.M., Paulsen, P., Szostak, M.P., Humphrey, T., Hilbert, F., 2015. Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 4600–4606. <https://doi.org/10.1128/AEM.00872-15>
- Spencer, S.J., Tamminen, M.V., Preheim, S.P., Guo, M.T., Briggs, A.W., Brito, I.L., A Weitz, D., Pitkänen, L.K., Vigneault, F., Virta, M.P., Alm, E.J., 2016. Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers. *ISME J.* 10, 427–436. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.124>
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2012. Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Front. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>
- Stalder, T., Barraud, O., Jové, T., Casellas, M., Gaschet, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2014. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J.* 8, 768–777. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.189>
- Stokes, H.W., Gillings, M.R., 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 790–819. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x>
- Storrs, M.J., Poyart-Salmeron, C., Trieu-Cuot, P., Courvalin, P., 1991. Conjugative transposition of Tn916 requires the excisive and integrative activities of the transposon-encoded integrase. *J. Bacteriol.* 173, 4347–4352.
- Thurber, R.V., Haynes, M., Breitbart, M., Wegley, L., Rohwer, F., 2009. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nat. Protoc.* 4, 470–483. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.10>
- Toleman, M.A., Bennett, P.M., Walsh, T.R., 2006. ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 296–316. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00048-05>

- Torres-Barceló, C., 2018. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerg. Microbes Infect.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0169-z>
- von Wintersdorff, C.J.H., Penders, J., van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H.M., Wolfs, P.F.G., 2016. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
- Wang, J., Wang, J., Zhao, Z., Chen, J., Lu, H., Liu, G., Zhou, J., Guan, X., 2017. PAHs accelerate the propagation of antibiotic resistance genes in coastal water microbial community. *Environ. Pollut.* 231, 1145–1152. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.067>
- Wang, M., Liu, P., Zhou, Q., Tao, W., Sun, Y., Zeng, Z., 2018. Estimating the contribution of bacteriophage to the dissemination of antibiotic resistance genes in pig feces. *Environ. Pollut.* 238, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.024>
- Wang, Y., Rotman, E.R., Shoemaker, N.B., Salyers, A.A., 2005. Translational Control of Tetracycline Resistance and Conjugation in the *Bacteroides* Conjugative Transposon CTnDOT. *J. Bacteriol.* 187, 2673–2680. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2673-2680.2005>
- Whittle, G., Shoemaker, N.B., Salyers, A.A., 2002. Characterization of Genes Involved in Modulation of Conjugal Transfer of the *Bacteroides* Conjugative Transposon CTnDOT. *J. Bacteriol.* 184, 3839–3847. <https://doi.org/10.1128/JB.184.14.3839-3847.2002>
- World Health Organization, 2015. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*.
- Yang, Yanxian, Shi, W., Lu, S.-Y., Liu, J., Liang, H., Yang, Yifan, Duan, G., Li, Y., Wang, H., Zhang, A., 2018. Prevalence of antibiotic resistance genes in bacteriophage DNA fraction from Funan River water in Sichuan, China. *Sci. Total Environ.* 626, 835–841. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.148>
- Yu, P., Mathieu, J., Li, M., Dai, Z., Alvarez, P.J.J., 2016. Isolation of Polyvalent Bacteriophages by Sequential Multiple-Host Approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 808–815. <https://doi.org/10.1128/AEM.02382-15>
- Yue, W.-F., Du, M., Zhu, M.-J., 2012. High Temperature in Combination with UV Irradiation Enhances Horizontal Transfer of *stx2* Gene from *E. coli* O157:H7 to Non-Pathogenic *E. coli*. *PLOS ONE* 7, e31308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031308>
- Zhou, L.-J., Ying, G.-G., Liu, S., Zhang, R.-Q., Lai, H.-J., Chen, Z.-F., Pan, C.-G., 2013. Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China. *Sci. Total Environ.* 444, 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.087>