

Métaprogramme HOLOFLUX : Appel à Manifestation d'Intérêt 2025

Proposition de parcours interdisciplinaire avec projet exploratoire - phase 2

Envoyez le fichier à holoflux@inrae.fr

Pour toute question scientifique, administrative ou financière, veuillez contacter : holoflux@inrae.fr

Partie A. Fiche d'identité

1. Acronyme

EINACT

2. Titre complet

Efficacité, Impact et extension d'une Nouvelle Approche d'ingénierie écologique des Communautés microbiennes

3. Résumé (max 1 500 caractères, espaces compris)

Les inoculants microbiens présentent un intérêt fort en agriculture et en bioremédiation car ils constituent une alternative durable à l'utilisation d'intrants chimiques et peuvent contribuer à décontaminer les environnements exposés de manière récurrente à des composés récalcitrants à la dégradation (pesticides/antibiotiques). Dans le cadre du projet INT-BXL nous avons validé un protocole innovant de construction de communautés microbiennes multi-dégradantes s'affranchissant de certains facteurs limitants leur utilisation. Le projet présenté ici a un double objectif : i) évaluer l'efficacité et l'impact écologique de l'inoculation de communautés microbiennes complexes, construites selon l'approche utilisée dans le projet INT-BXL, dans des sols et sédiments pollués, en comparaison à l'inoculation plus classique de souches isolées, et ii) évaluer l'applicabilité du protocole de construction de variants compositionnels de communautés microbiennes dans l'objectif d'identifier des consortiums microbiens favorisant la santé des plantes d'intérêt agronomique (modèle tomate).

A moyen terme, la capacité de manipuler et d'assembler les communautés microbiennes selon le protocole développé devrait permettre de construire des communautés microbiennes simplifiées multi-fonctionnelles *ad hoc* remplissant des objectifs fonctionnels pré-définis et durables (promotion de la croissance des plantes (PGP), biocontrôle, améliorant la fixation de l'azote atmosphérique et diminuant les émissions de N₂O, décontamination de l'environnement).

4. Mots-clés (5 maximum)

Bioremédiation, Impact Ecologique, Multifonctionnalité, Relation Composition-Fonction, Croissance et santé de la plante

5. Axes du métaprogramme dans le(s)quel(s) s'inscrit votre parcours interdisciplinaire

- Axe 1 : Mécanismes d'assemblage et d'interaction au sein des holobiontes
- Axe 2 : Flux microbiens et dynamiques au sein d'un système agri-alimentaire
- Axe 3 : Pilotage du microbiote et des flux microbiens : identification des leviers, performances et durabilité

6. Partenaires INRAE et expertises

Indiquez les noms de toutes les personnes impliquées dans le projet, **en donnant le même numéro de partenaire**, si les personnes font partie de la **même équipe**.

Partenaires INRAE N°	Nom Prénom	Département INRAE	N°codique Acronyme d'unité	Expertises apportées au projet *
Coordinateur = Partenaire 1	Spor Aymé	AgroEcoSystème	1347 Agroécologie	Ecologie Microbienne, Bioremédiation
Partenaire 1	Romdhane Sana	AgroEcoSystème	1347 Agroécologie	Ecologie Microbienne, Bioremédiation, Ecotoxicologie
Partenaire 1	Thieffry Sylvia	AgroEcoSystème	1347 Agroécologie	Ecologie Microbienne, Bioremédiation, Modélisation statistique
Partenaire 1	Devers Marion	AgroEcoSystème	1347 Agroécologie	Ecologie Microbienne, Bioremédiation
Partenaire 1	Martin-Laurent Fabrice	AgroEcoSystème	1347 Agroécologie	Ecologie Microbienne, Bioremédiation, Ecotoxicologie microbienne
Partenaire 1	Siol Mathieu	SPE	1347 Agroécologie	Génétique Végétale, sélection génomique
Partenaire 2	Pesce Stéphane	AQUA	RiverLy	Ecotoxicologie microbienne aquatique
Partenaire 3	Aubert Julie	MathNum	518 MIA Paris-Saclay	Modélisation statistique
Partenaire 4	Lépinay Clémentine	SPE	0407 Pathologie Végétale	Ecologie microbienne, Pathologie Végétale
Partenaire 4	Bardin Marc	SPE	0407 Pathologie Végétale	Ecologie microbienne, Pathologie Végétale, biocontrôle

7. Partenaires non-INRAE associés le cas échéant

Néant

8. Nouvelle(s) collaboration(s) : le parcours implique-t-il des partenaires qui n'avaient jamais travaillé ensemble auparavant ?

Le coordinateur a déjà travaillé en bilatéral avec tous les partenaires. Certains partenaires n'ont jamais collaboré directement ensemble au préalable.

9. Vous pouvez ajouter quelques lignes de description pour chaque partenaire afin d'aider à évaluer la qualité et les complémentarités (merci de vous en tenir à un format court, de type liste à puces).

- L'UMR1347 Agroécologie mobilisera des chercheurs de deux (MICSOL et ADVENSYS) des quatre pôles la constituant. Les chercheurs impliqués du pôle MICSOL mobiliseront leurs compétences en écologie microbienne terrestre et leurs connaissances des micro-organismes impliqués dans la biodégradation des pesticides et des antibiotiques (antibiotrophie). Le chercheur impliqué du pôle ADVENSYS adaptera les méthodes utilisées en sélection génomique aux données produites.
- L'équipe EMA de l'UR RiverLy étudie les réponses structurelles et fonctionnelles des communautés microbiennes aquatiques aux différents scénarios d'inoculation et de pression chimique. La participation à ce projet s'inscrit dans une volonté de mieux appréhender l'influence du continuum sol-eau-sédiment dans les petits bassins versants agricoles sur la diversité et le potentiel fonctionnel de ces communautés microbiennes.
- J. Aubert, IR au sein de l'UMR MIA Paris-Saclay, coencadre actuellement avec M. Siol et A. Spor la thèse de S. Thieffry qui a mis au point le protocole de construction de communautés multi-dégradantes. Elle est en charge de coordonner les développements statistiques pour l'analyse des données.
- Les membres de l'UR Pathologie Végétale impliqués dans le projet s'intéressent aux processus écologiques qui influencent l'efficacité du biocontrôle et notamment le rôle du microbiote végétal comme levier immunitaire. Spécialisés dans la conduite d'essais sur plantes grâce à leur pôle Installations Expérimentales (plateforme Prophyle), ils seront impliqués dans l'axe 2 du projet pour évaluer le lien entre communautés microbiennes sélectionnées et santé de la tomate (croissance, sensibilité à des agents phytopathogènes majeurs cryptogamiques).

10. Durée du parcours interdisciplinaire (24 mois maximum) :

Nombre de mois	Date de début	Date de fin
24	Février 2025	Janvier 2027

11. Financement demandé par ligne budgétaire

Financement du parcours avec projet exploratoire			
	TOTAL	€ en 2025	€ en 2026
Animation et construction de l'interdisciplinarité			
Retraites de réflexion, frais de missions associés Séminaires et frais de missions associés Gratifications de stages coencadrés		4k€ 1,3k€	1k€ 3,7k€ (stagiaire M2 Avignon)
Projet exploratoire montant total maximum = 50k€			
Missions Fonctionnement (consommables de biologie moléculaires, microbiologie et frais liés à l'utilisation des serres) Gratifications de stage Valorisation (frais de publications et de dissémination) Sous-traitance, prestation de service (séquençage de pools d'amplicons 16S et ITS)		12,5k€ 3,7k€ (stagiaire M2 Dijon) 8,5k€	12,5k€ 4,3k€ 8,5k€
Total demandé <i>montant maximum = 60k€</i>		30k€	30k€

12. Répartition par équipe du financement demandé

	€ en 2025	€ en 2026
Partenaire INRAE 1	24,5k€	4,3k€
Partenaire INRAE 2	4,5k€	0,5k€
Partenaire INRAE 3	0,5k€	0,5k€
Partenaire INRAE 4	0,5k€	24,7k€
Total	30k€	30k€

Remarque : en cas d'acceptation du parcours, une fiche détaillée par unité sera demandée pour affecter les crédits

13. Contact mail :

Coordinateur:
ayme.spor@inrae.fr

13. Court CV du coordinateur (15 lignes)

Aymé Spor (CR HDR) est responsable de l'équipe EMFEED (12 personnels permanents, 4 étudiant.e.s en thèse et 6 postdoctorant.e.s) au sein du pôle MICSOL de l'UMR1347 Agroécologie. Ses recherches visent à : i) étudier la biodiversité et l'écologie des communautés microbiennes impliquées dans la biodégradation de composés récalcitrants (pesticides et antibiotiques) et ii) évaluer l'impact de contaminants (pesticides notamment) mais aussi d'inoculants microbiens utilisés en bioremédiation ou en biocontrôle sur la diversité et la structure des communautés microbiennes terrestres, et leurs fonctionnements (cycle de l'azote et fonctions d'épuration). Il est actuellement responsable de Work Package dans 2 projets ANR PRCE (IMMINENT, EPURSOL), responsable d'un Lot dans un projet PIA ADEME (SCLEROZA) et participe à 2 projets européens d'envergure (ARISTO, MINAGRIS). Ses travaux ont conduit à la publication de 59 articles dont certains dans des revues renommées (Cell, Nature Biotechnology, Nature Microbiology Reviews, Nature Ecology & Evolution, PNAS, ISME J ...). Son rôle sera de coordonner les différentes actions prévues au cours du parcours, de s'assurer du respect du calendrier indiqué et de favoriser les échanges entre les différents partenaires du projet.

Partie B. Description scientifique de la proposition

Acronyme du parcours : EINACT

Titre long (en français) : *EFFICACITE, IMPACT ET EXTENSION D'UNE NOUVELLE APPROCHE D'INGENIERIE ECOLOGIQUE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES*

Titre long (en anglais) : Efficiency, Impact and extension of a New ecological engineering Approach of microbial Communities

Type de proposition

- nouveau parcours
- proposition issue d'un parcours antérieur
- [autre]

Rappel : en cas de proposition faisant suite à un parcours antérieur la plus-value en termes de construction interdisciplinaire devra être clairement justifiée.

Objectifs de la proposition, enjeux scientifiques et sociétaux concernés, pertinence par rapport aux priorités du métaprogramme (*une demi-page*)

Le parcours présenté ici constitue une suite au projet INT-BXL financé par le métaprogramme. L'objectif du projet INT-BXL, qui s'inscrivait dans l'axe 3 du métaprogramme, était de vérifier l'applicabilité d'un protocole innovant de construction de communautés microbiennes dégradant des composés récalcitrants (pesticides et antibiotiques) et de proposer son utilisation en bioremédiation des sols et sédiments pollués. Les premiers résultats de ce projet sont très prometteurs et la preuve de concept de la méthode développée a été faite et publiée dans la revue internationale *Journal of Hazardous Materials* (Thieffry *et al.*, 2024).

Ce parcours constitue à la fois une suite du projet INT-BXL, mais aussi un élargissement de la cible fonctionnelle : de la bioremédiation à la stimulation de la santé de la plante.

Il se positionne selon 2 axes:

- i) évaluer l'efficacité, la stabilité et les effets non-intentionnels de l'inoculation de communautés microbiennes complexes, construites selon l'approche utilisée dans le projet INT-BXL, dans des sols et sédiments pollués, en comparaison à l'inoculation plus classique de souches isolées et,
- ii) évaluer la possibilité de transposer le protocole de construction de variants compositionnels de communautés microbiennes dans l'objectif d'identifier des consortiums microbiens favorisant la santé des plantes cultivées (modèle tomate). Différents proxys seront évalués pour évaluer la santé de la plante (e.g. croissance, sensibilité à des agents pathogènes, induction des gènes de défense de la plante).

Le 1^{er} axe de ce nouveau parcours constitue donc une analyse de faisabilité, d'efficacité par rapport à l'existant, et une première évaluation des effets non-intentionnels par la méthode mise au point. Le 2nd axe constitue quant à lui une tentative de simplification des communautés microbiennes associées à la tomate et d'identification du lien de causalité entre composition du microbiote et phénotype de la plante.

Types d'actions prévues	
<input type="checkbox"/>	atelier
<input type="checkbox"/>	retraite d'écriture
<input checked="" type="checkbox"/>	retraite de réflexion
<input type="checkbox"/>	séminaire
<input checked="" type="checkbox"/>	stage M2
<input checked="" type="checkbox"/>	mission (consacrée à des visites entre équipes ou des séjours dans une autre équipe)
<input type="checkbox"/>	autre (préciser)

Rappel : La proposition attendue est un parcours constitué d'une **combinaison de plusieurs actions**. Elle pourra inclure des **séminaires**, ateliers, **retraites d'écriture** (par exemple pour produire un position paper), **retraites de réflexion** (produire une vision nouvelle, poser les bases d'un projet ambitieux, ...), **stages M2** (ou de durée inférieure), **missions** (visites entre équipes ou séjours dans une autre équipe), etc.

Liste des actions prévues				
n°	période ciblée	actions	objectifs	sorties attendues
1	1er trimestre 2025	Retraite de Réflexion Scientifique et Technique	<ul style="list-style-type: none"> ° Présentation détaillée du protocole de construction de communautés et des résultats obtenus à l'ensemble des membres du consortium (Tous les Partenaires) ° Définition du potentiel champ d'applications de ce protocole (Tous les Partenaires) ° Conception de l'expérience à mettre en place pour la preuve de concept (axe 2 du projet) (Tous les Partenaires) 	<p>Mise en place de l'expérience en 2026</p> <p>Premières bases d'un projet scientifique interdisciplinaire ambitieux à soumettre à l'ANR à l'automne 2026</p>
2	Sept 2025	Séminaire/Mission à l'UR de Pathologie Végétale	<ul style="list-style-type: none"> ° Présentation des outils et méthodes statistiques utilisées pour identifier les associations composition du microbiote/phénotype d'intérêt (Partenaire 3) ° Transfert des méthodes via la formation pratique (Utilisation de scripts R, Interprétation des résultats) (Partenaire 3) 	<p>Transfert de compétences et gain en autonomie dans l'analyse statistique</p>
3	Nov 2025	Séminaire/Mission à l'UR de Pathologie Végétale		<p>Planification de la rédaction article 1</p>

			<ul style="list-style-type: none"> ° Présentation des résultats obtenus lors de l'expérience 1 (Tous les Partenaires) ° Transfert du protocole de construction de variants compositionnels (Partenaire 1) 	Autonomie expérimentale
4	Jan-Juin 2026	Co-encadrement d'un stagiaire de M2	<ul style="list-style-type: none"> ° Mise en œuvre expérimentale du protocole (Stagiaire M2 co-encadré par Partenaires 1, 3 et 4) ° Identification des associations entre composition du microbiote et phénotype de la plante (Stagiaire M2 co-encadré par Partenaires 1, 3 et 4) 	<p>Preuve de concept de l'applicabilité du protocole de construction/simplification de communautés microbiennes</p> <p>Rédaction d'un article scientifique</p>
5	Sept 2026	Séminaire à l'UMR1347 Agroécologie	<ul style="list-style-type: none"> ° Présentation des résultats obtenus lors de l'expérience 2 (Partenaire 4) 	<p>Planification de la rédaction article 2</p> <p>Planification de la rédaction de la lettre d'intention en réponse à l'AAPG de l'ANR</p>

Lister les actions prévues (*n° = numéro de l'action ; période ciblée = mois et année ; actions = type d'action*)

<p>Description et cohérence du parcours envisagé (une page maximum)</p> <p><i>Expliciter la démarche vers l'interdisciplinarité, la dimension fédératrice de la proposition, les principales étapes du projet, son originalité, la complémentarité des actions proposées et, le cas échéant, l'articulation avec un parcours antérieur</i></p>
<p>Travailler en interdisciplinarité est toujours un exercice difficile car cette démarche nécessite un investissement important et équilibré de chacun des acteurs impliqués. L'interdisciplinarité demande à chacun de sortir de sa zone de confort « disciplinaire » et repose sur l'acceptation des participants à se sentir en inconfort intellectuel et parfois démunis. En conséquence, la première action conduite dans ce nouveau projet sera d'organiser une retraite de réflexion scientifique et technique délocalisée sur 2 jours à laquelle l'ensemble des membres du projet sera convié et au cours de laquelle nous travaillerons à adopter un langage commun et un socle de connaissance partagé. Au cours de cette retraite, les résultats obtenus au cours du projet INT-BXL seront présentés et nous chercherons à définir le champ d'applications potentielles du protocole de construction de communautés microbiennes développé. Nous affinerons les designs expérimentaux des expériences conduites selon les 2 axes proposés et définirons les modalités de co-encadrement des 2 stagiaires M2. Cette retraite de réflexion devrait aussi permettre de poser les bases et la structure d'une demande de financement d'un projet interdisciplinaire ambitieux pour l'AAPG de l'ANR en 2026.</p> <p>Suite à cette retraite réflexive organisée tôt dans le projet, l'expérience évaluant l'efficacité, la stabilité et l'impact écologique de l'inoculation de communautés microbiennes complexes dans des sols et</p>

sédiments contaminés sera mise en place dans les locaux de l'UMR1347 Agroécologie (axe 1). Le stagiaire M2 (financé sur la partie Projet) en charge de l'expérience sera co-encadré par les Partenaires 1 et 2. En fin d'année 1, deux séminaires/missions seront organisés chez le Partenaire 4 avec pour ambition de présenter les résultats de l'expérience 1, mais aussi de transférer à la fois les outils et méthodes d'analyses statistiques développés (transfert assuré par le Partenaire 3) et les méthodes de construction de variants compositionnels des communautés microbiennes (transfert assuré par le Partenaire 1). Ces séminaires/missions de courte durée (quelques jours) devraient conférer une autonomie forte au Partenaire 4 pour la mise en place de l'expérience 2 dans le cadre d'un stage de M2 co-encadré par les Partenaires 1, 3 et 4.

Enfin, dans la seconde moitié de l'année 2, un séminaire sera organisé chez le Partenaire 1 pour faire le point sur l'ensemble des résultats acquis au cours du projet, affiner la stratégie de valorisation, mais aussi définir les contours d'un projet ambitieux dont la lettre d'intention sera soumise à l'AAPG de l'ANR.

Il s'agit ici d'explicitier la cohérence d'ensemble du parcours envisagé, la manière dont il se propose de progresser vers l'interdisciplinarité. Les motivations et contributions (concepts et approches) de chaque discipline impliquée dans le consortium devront être explicitées.

Synergie avec des projets déjà financés, le cas échéant (5-10 lignes)

Le parcours présenté ici fait suite au projet INT-BXL financé par le métaprogramme qui a permis d'établir une preuve de concept. Le 1^{er} axe du parcours vise à évaluer expérimentalement l'efficacité et l'impact de l'inoculation de consortia microbiens construits selon le protocole mis au point dans INT-BXL. Ces approches d'écotoxicologie microbienne sont actuellement mises en œuvre par les partenaires 1 et 2 dans le cadre de différents projets financés (ANR EPURSOL, PIA ADEME SCLEROZA, ANSES PharmOneHealth). Le 2nd axe du parcours vise à simplifier les communautés microbiennes associées à la plante et identifier un lien de causalité entre composition du microbiote et phénotype de la tomate. Cette approche peut être considérée comme la réciproque (complémentaire) de l'approche développée par le partenaire 4 qui explore l'effet de leviers immunitaires (résistance variétale et application de produit de biocontrôle) sur la dynamique du microbiote de la tomate au cours de l'infection par le mildiou (ANR PPR CapZeroPhyto, dépôt du projet IMMIC au département SPE).

Projet exploratoire complet détaillé (5 pages maximum)

Etat de l'art

*Présentez l'état de l'art, les défis et les questions majeures posées par le projet. Soulignez l'originalité du projet, la prise de risque et les avancées attendues par rapport aux connaissances actuelles. Exposez la **pertinence de votre projet par rapport aux enjeux et priorités du métaprogramme.***

Les inoculants microbiens présentent un intérêt fort en agriculture car ils peuvent être considérés comme une alternative durable aux intrants chimiques. Ils peuvent offrir des avantages en termes d'amélioration du rendement des cultures et de l'efficacité de l'utilisation des nutriments (Schütz et al., 2018), de tolérance des plantes aux stress biotiques et abiotiques (Porter et al., 2020), de résistance aux agents pathogènes (O'Brien, 2017). Ils présentent aussi un intérêt fort et croissant en bioremédiation car l'exposition récurrente à certains pesticides et antibiotiques détectés fréquemment dans les

agroécosystèmes contribue dans certaines conditions à sélectionner au sein des communautés microbiennes des populations dégradantes capables d'utiliser ces composés xénobiotiques comme une source de nutriment et d'énergie pour leur croissance (Haney et al., 2000).

Au cours de la dernière décennie, les inoculants microbiens ont suscité une attention croissante, reflétée à la fois par une augmentation des études sur le sujet (Santos et al., 2019) et par des investissements substantiels pour leur développement (Waltz, 2017). Cependant, la transposition de leurs effets bénéfiques des conditions contrôlées aux applications sur le terrain présente de nombreux défis (Kaminsky et al., 2019), notamment en lien avec une survie et/ou une fonctionnalité incertaine dans le sol après application (Parnell et al., 2016), probablement dépendant d'une variété de facteurs biotiques et abiotiques, impactant ainsi drastiquement leur efficacité.

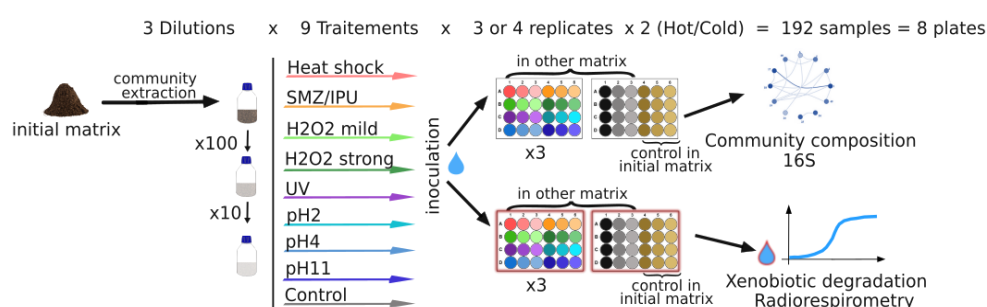


Figure 1. Construction de variants compositionnels, « génotypage » et « phénotypage ».

L'objectif du **projet INT-BXL** était de mettre au point un protocole innovant de construction de communautés bactériennes simplifiées multi-dégradantes, s'affranchissant des facteurs limitants que sont les filtres biotiques et abiotiques, à l'aide des concepts et méthodes utilisés en sélection génomique, et d'évaluer leur utilisation en bioremédiation.

Un sol (dispositif CA-SYS domaine d'Epoisses) et un sédiment (rivière du Tillet) présentant respectivement des bons potentiels de dégradation pour l'Isoproturon (IPU, herbicide) et la Sulfaméthazine (SMZ, antibiotique) ont été choisis. Une approche combinée de dilutions/perturbations a permis la construction de variants compositionnels, pour chacune des communautés sources, dont nous avons mesuré les capacités de minéralisation dans l'autre environnement préalablement stérilisé (sédiment pour IPU et sol pour SMZ) (Figure 1). Nous observons à la fois pour l'IPU et la SMZ une gamme de variation relativement large pour les capacités de minéralisation, que ce soit en termes de dynamique de minéralisation que de potentiels maximums cumulés (valeur maximale atteinte : entre ~0 et ~70% de minéralisation pour l'IPU dans le sédiment et entre ~0 et ~40% de minéralisation pour la SMZ dans le sol). Nous montrons de plus que les dynamiques de minéralisation pour chacune des molécules étudiées pouvaient être groupées en trois types de dynamique : i) les minéralisations rapides et qui atteignent un maximum élevé, ii) les minéralisations plus lentes atteignant un maximum cumulé élevé ou moyen et iii) les minéralisations qui ne démarrent pas (perte du potentiel de dégradation). L'étude des structures des communautés bactériennes associées nous indique de même une structuration de ces groupes fonctionnels en lien avec des variations de composition des communautés (Figure 2).

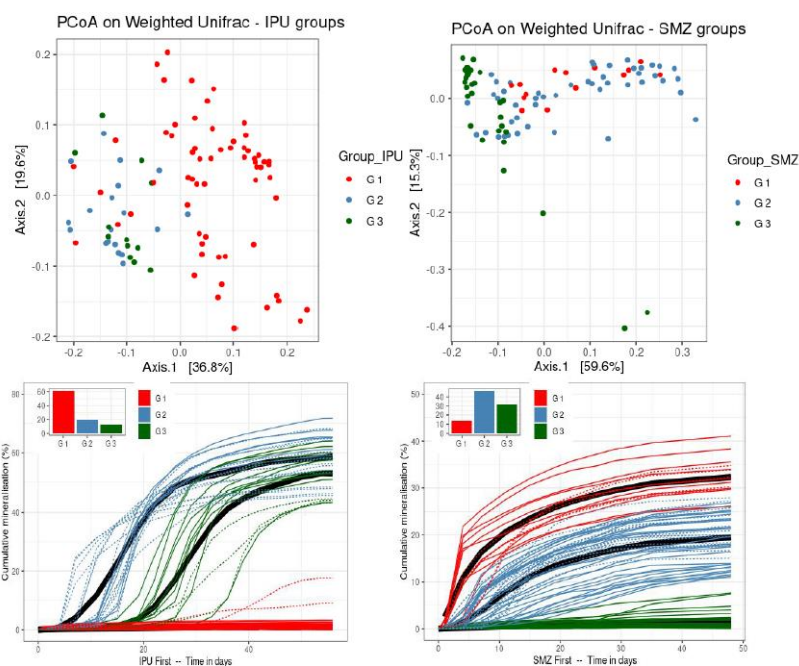


Figure 2. Associations entre structure des variants compositionnels et potentiel de minéralisation de l'IPU et de la SMZ.

Six variants compositionnels présentant de fortes capacités de minéralisation (appelés 'Parents') ont été choisis pour chacun des xénobiotiques (6 Parents_SMZ et 6 Parents_IPU). De plus, ces 'Parents' ont été choisis selon leur proximité compositionnelle avec le 2^{ème} parent (celui dégradant l'autre xénobiotique) et mélangés. Les résultats de ces mélanges ont ainsi été dénommés 'Enfants' et classés en 3 catégories : 'Proche', 'Moyen', 'Distant' (2 mix par catégories). Enfin, la capacité de ces 'Enfants' à minéraliser les 2 composés a été évaluée et comparée aux capacités de minéralisation de leur 'Parents' (Figure 3).

Nous montrons ainsi que la proximité compositionnelle entre les 'Parents' a un impact sur la capacité des 'Enfants' à minéraliser les 2 composés : les 'Enfants' issus de 'Parents' plus proches en terme de composition présentant des capacités de minéralisation plus élevées et équivalentes à celles de leurs 'Parents' (ratios Enfants/Parents proche de 1).

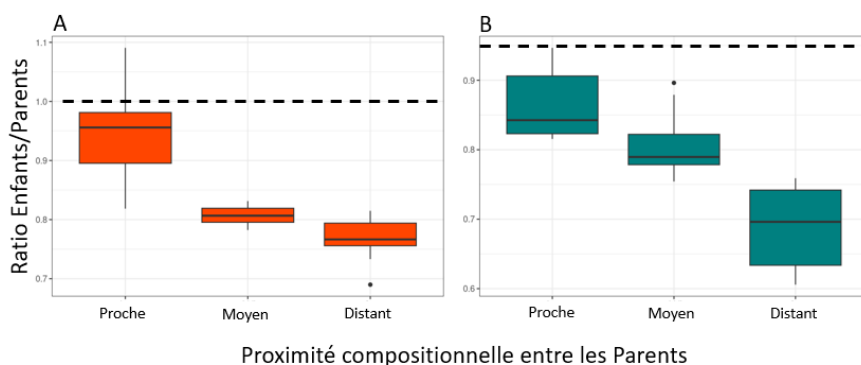


Figure 3. Effet de la proximité compositionnelle des communautés 'Parents' sur les capacités de minéralisation des communautés 'Enfants'. Ratio Enfants/Parents des potentiels de minéralisation maximal de l'IPU (A) et de la SMZ (B) en fonction de la proximité compositionnelle des communautés Parentales (évaluées par la distance UniFrac pondérée et classée en 3 groupes : 'Proche', 'Moyen' et 'Distant'). Un ratio proche de 1 signifie que les communautés 'Enfants' présentent les mêmes capacités à minéraliser le composé en question que leurs 'Parents'.

Les résultats du projet INT-BXL nous montrent donc que nous sommes capables de manipuler des communautés bactériennes complexes et de les assembler de façon à ce qu'elles assurent des fonctions d'intérêt, en l'occurrence la dégradation d'un herbicide et d'un antibiotique aux caractéristiques pourtant très différentes.

Le projet présenté ici, décliné en 2 axes, est à la fois une suite du projet INT-BXL, et un élargissement de la cible fonctionnelle : il s'étend ainsi de la bioremédiation à la stimulation de la santé de la plante, un enjeu majeur en agriculture.

Ce projet de recherche s'insère parfaitement dans l'axe 3 du métaprogramme HoloFlux « Maîtrise et pilotage des flux microbiens, impact sur les performances, la durabilité et la santé ». Les environnements étudiés seront des sols agricoles et des sédiments de rivière. Nous chercherons dans un 1^{er} temps à **évaluer l'efficacité, la stabilité et l'impact écologique de l'inoculation de consortia microbiens**, construit selon le protocole développé au cours du projet INT-BXL, dans des sols et sédiments contaminés par des pesticides (Isoproturon, IPU) et antibiotiques (Sulfaméthazine, SMZ), en comparaison avec une approche classique d'inoculation de souches dégradantes (*Sphingomonas* sp. strain SH3 pour IPU et *Microbacterium* sp. C448 pour SMZ). Ce 1^{er} axe s'inscrit donc dans une démarche **d'analyse coûts** (impact écologique sur les communautés microbiennes autochtones)/**bénéfices** (amélioration de l'efficacité et de la stabilité) de notre protocole de construction de consortia microbiens et de son utilisation en bioremédiation, en comparaison avec une stratégie classique d'inoculation de souche isolée.

Dans un 2nd temps, nous appliquerons le protocole développé dans le cadre du projet INT-BXL pour d'une part **simplifier des communautés microbiennes du sol associées à la plante** (en l'occurrence la tomate) et d'autre part constituer des variants compositionnels de ces communautés microbiennes afin d'**identifier**, à l'aide de modèles statistiques utilisés en sélection génomique, **un lien de causalité entre composition du microbiote et phénotype de la plante**.

Dans ce 2nd axe de recherche, la démonstration du lien de causalité entre composition du microbiote et phénotype de l'hôte, ainsi que l'identification de cortèges microbiens associés à ce phénotype, sont des préalables indispensables à la mise en place de stratégies d'amélioration variétale via la manipulation du microbiote, selon la démarche complète décrite et mise en œuvre dans INT-BXL.

Description du projet, hypothèses et démarche

Décrivez les questions, approches et méthodes relevant des différentes disciplines impliquées. Précisez la plus-value apportée par les compétences des participants. Présentez les étapes principales et les tâches du projet, identifiez les points critiques et risques

Ce projet s'appuie sur une construction interdisciplinaire faisant appel aux compétences de chercheurs issus de 4 départements INRAE différents (AgroEcoSystem, AQUA, MathNum et SPE).

Le 1^{er} axe du projet concerne le continuum sol-eau-sédiment, et est donc centré sur deux matrices environnementales très différentes mais fortement connectées dans les agro-écosystèmes, le sol et les sédiments, et nécessite de mobiliser des compétences spécifiques en écologie microbienne et écotoxicologie terrestre (Partenaire 1) et aquatique (Partenaire 2).

Plus spécifiquement, il s'agira de : **i) définir les scénarii de contamination et de bioremédiation** : trois sols et trois sédiments, choisis selon des propriétés physico-chimiques contrastées, seront inoculés avec des consortia microbiens issus d'une expérience précédente (3 types de consortia microbiens), un mélange de deux souches dégradantes (*Sphingomonas* sp. strain SH3 et *Microbacterium* sp. C448) ou une solution contrôle stérile. Le scénario d'exposition sera une double contamination des microcosmes à l'IPU et à la SMZ à des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental. Chaque traitement sera répliqué 5 fois et les microcosmes seront échantillonnés après 15 et 55 jours pour évaluer l'efficacité, la stabilité et l'impact des modes d'inoculation à temps court et long. **ii) évaluer la biodégradation de l'IPU et de la SMZ dans les différents traitements** : les capacités de minéralisation de l'IPU et de la SMZ dans les différents microcosmes traités et contrôles seront évaluées par radiorespirométrie au moment de l'inoculation, et après 15 et 55 jours. **iii) Suivre la dynamique des communautés dégradantes dans les différents traitements** : l'abondance des communautés microbiennes impliquées dans la minéralisation de l'IPU et de la SMZ sera évaluée après 15 et 55 jours par QPCR des gènes *pdmA* et *sadA*, respectivement marqueurs des voies de dégradation de l'IPU et de la SMZ. **iv) Evaluer l'impact des différentes méthodes d'inoculation sur les communautés microbiennes résidentes** : l'impact écologique de l'inoculation de consortia microbiens sur la diversité et la structure des communautés bactériennes autochtones sera évalué par séquençage d'amplicons d'ADNr 16S après 15 et 55 jours.

Cet axe ne présente pas de risques particuliers dans son exécution car plusieurs consortia microbiens multi-dégradants construits lors du projet INT-BXL (décrits plus haut), ainsi que les souches isolées dégradant l'IPU et la SMZ, sont disponibles au laboratoire. Nous faisons l'hypothèse que les consortia multi-dégradants seront plus efficaces et stables que les souches isolées.

Le 2nd axe du projet reposera quant à lui sur des interactions fortes entre les partenaires, via le transfert de compétences en manipulation des communautés microbiennes (partenaire 1) et d'outils statistiques développés pour la sélection génomique animale ou végétale (partenaire 3) vers le partenaire 4 qui apportera son expertise de l'étude du lien entre écologie microbienne et croissance/santé de la plante.

Plus spécifiquement, il s'agira de : **i) échantillonner du sol d'une parcelle** conduite en culture de tomate sur le site expérimental de Montfavet **ii) construire les variants compositionnels** selon le protocole établi dans INT-BXL **iii) inoculer un substrat de culture** (type terreau) préalablement stérilisé avec ces variants compositionnels et y transplanter de jeunes plantules **iv) évaluer le phénotype de la tomate au cours de la croissance** : hauteur, diamètre de la tige, surface foliaire, nombre de feuilles, date d'apparition des 1^{ères} feuilles, biomasses aérienne et racinaire et sa **résistance aux pathogènes** : tests de résistance à *Botrytis cinerea* et *Oidium neolycopersici* **v) réaliser les associations entre phénotypes de la plante et composition du microbiote** (prélèvement du microbiote à 6-8 semaines quand toutes les plantes auront eu leurs 1^{ères} fleurs et séquençage amplicons ADNr 16S et ITS) via l'utilisation du package R en cours de développement (package Bioremed) **vi) identifier les cortèges microbiens associés** à la croissance de la tomate et à sa résistance aux pathogènes.

Il est critique que le transfert des outils et méthodes se fasse dans les meilleures conditions. En effet, nous montrons que les associations composition/phénotype peuvent être sensibles à des choix méthodologiques: phénotype considéré (quantitatif, qualitatif, dynamique); nombre d'OTUs incluses

dans l'analyse (filtre sur la prévalence, sur la contribution à la covariance, stringence de ces filtres); prétraitement des données de comptage (abondance relative vs présence/absence, transformations, types de transformation); modèles d'association (linéaires: Lasso ou Elastic net, non-linéaires: random forest ou XGboost). Le coordinateur sera particulièrement vigilant sur ce point. Par ailleurs, il existe un faible risque que les manipulations des communautés microbiennes n'aient pas un impact suffisamment fort sur la santé de la plante. Notre expérience passée sur un système blé-pois inoculé avec différentes communautés microbiennes (Raynaud et al., 2021) et d'autres études démontrent un lien entre niveau de diversité des communautés microbiennes et productivité végétale. Nous faisons l'hypothèse que certains assemblages microbiens seront associés avec une stimulation significative de la croissance et de la santé de la tomate.

Agenda, étapes clés et livrables

Décrire la chronologie du projet, avec les étapes clés et les livrables.

Décrire la gestion du projet en termes de management, communication, réseautage, publications...

La 1^{ère} année du projet consistera à la mise en œuvre expérimentale de l'axe 1 du projet, ainsi qu'à la planification de l'expérience qui aura lieu en année 2, et à la définition des bases d'un projet ambitieux à déposer à l'ANR en 2026. La 2^{ème} année s'articulera principalement autour de l'expérience 2 et devrait permettre la rédaction d'une lettre d'intention pour l'AAPG de l'ANR.

M1-M4 : Etape Clé 1 : Retraite de réflexion – Livrable : *Validation planification expérimentale Expérience 2*

M1-M6 : Expérience 1 = Stage M2 « efficacité et impact de l'inoculation de consortiums microbiens complexes dans des sols et sédiments pollués » réalisé à UMR1347 Agroécologie, co-encadrement Partenaires 1 & 2. – Livrable : *Rapport de stage M2*

M6-M12 : Livrable : *Rédaction d'un article scientifique*

M8-M12 : Etape Clé 2 : Séminaires (Présentation des résultats de l'expérience 1 + Présentation des outils statistiques développés pour les analyses d'association chez le partenaire UR Pathologie Végétale)

M13-M19 : Expérience 2 = Stage M2 « Identification de consortiums microbiens rhizosphériques simplifiés associés aux paramètres de croissance et de santé chez la tomate » réalisé à UR Pathologie Végétale, co-encadrement Partenaires 1, 3 et 4 – Livrable : *Rapport de stage M2*

M20-M24 : Livrable : *Rédaction d'un article scientifique*

M20-M22 : Etape Clé 3 : Séminaire (Présentation des résultats de l'expérience 2 chez le partenaire UMR1347 Agroécologie)

M22 : Livrable : *Dépôt d'une lettre d'intention à l'AAPG de l'ANR*

Implication de partenaires socio-économiques, le cas échéant

Le coordinateur et plusieurs partenaires du parcours présenté ici sont déjà en contact avec des partenaires socio-économiques dans le cadre d'autres projets. Par exemple, A. Spor collabore avec GERME SA et GreenCell, deux sociétés spécialisées dans le développement d'inoculants microbiens dans le cadre de 2 projets ANR PRCE. En outre, A. Spor et M. Bardin collaborent actuellement avec Eléphant Vert, Capsulae et Lipofabrik dans le cadre d'un projet PIA ADEME (SCLEROZA). L'un ou l'autre de ces partenaires privés pourront être sollicités quand la technologie développée sera jugée suffisamment mature.

<p>International</p> <p><i>Présentez la dimension internationale de votre projet : implication des partenaires internationaux dans la mise en œuvre du projet et stratégie de positionnement international du projet (visibilité, partenariat, réponse aux appels internationaux, perspectives en cas de succès, etc.).</i></p>
<p>La dimension internationale de ce projet et notamment sa stratégie de positionnement sera l'une des thématiques abordées lors de la retraite de réflexion organisée au cours du 1^{er} trimestre. Ces réflexions devraient conduire à l'identification d'un appel d'offres européen adéquat. Le caractère international de ce projet sera principalement assuré par la présentation régulière des résultats obtenus dans le cadre de congrès internationaux. Par exemple, les premiers résultats du projet INT-BXL avaient été présentés lors de 2 conférences internationales (BioRemid et EcotoxicoMic en 2023).</p>
<p>Impact attendu et perspectives du projet</p> <p><i>Indiquez les résultats et l'impact attendu du projet, la valeur ajoutée pour le métaprogramme, les connexions et synergies avec des projets déjà financés. Présentez les perspectives et la stratégie à long terme (prochaines phases, appels auxquels le groupe des partenaires pourrait répondre, etc.).</i></p>
<ul style="list-style-type: none"> • A court terme, les résultats des approches d'écotoxicologie microbienne mises en œuvre dans l'axe 1 viendront alimenter la Déclaration d'Invention relative au protocole de construction de communautés microbiennes multi-dégradantes (DIRV-21-0113) et devraient permettre d'étayer nos prochaines demandes de financement à des appels d'offre plus finalisés que nous co-construisons avec INRAE-Transfert (AAP RDI INRAE, AAP RDI ADEME). • A moyen terme, si les résultats de l'expérience 2 sont concluants, et sur la base de l'interdisciplinarité construite au cours du projet, il sera temps de proposer une lettre d'intention à l'AAPG de l'ANR dans le but d'obtenir un financement conséquent pour construire des communautés microbiennes simplifiées multi-fonctionnelles <i>ad hoc</i> remplissant des objectifs fonctionnels pré-définis et durables (promotion de la croissance des plantes, biocontrôle, amélioration de la fixation de l'azote atmosphérique, diminution des émissions de N₂O, participation à la décontamination de l'environnement).