

Evaluation du résistome des communautés microbiennes des biofilms et sédiments comme indicateurs de vulnérabilité et/ou de résilience du milieu aux contaminants

Thierry Berthe¹, Lise Fechner², Olivier Barraud³, Christophe Dagot³, Marie Cécile Ploy³, Manon Michaut¹, Flora Cotellet¹, Margaux Gaschet³, Fabienne Petit^{1,4}

¹ Normandie Université UMR 6143 M2C, CNRS

² IFREMER, Issy-Les-Moulineaux

³ Université de Limoges, INSERM S-1092, Limoges

⁴ Sorbonne Universités, UMR METIS, CNRS

* fabienne.petit@univ-rouen.fr

Résumé

Ces travaux s'inscrivent dans la continuité de la phase VI du programme Piren-Seine (suivis de contamination et d'impacts écotoxicologiques sur l'axe Seine) et s'appuient sur des acquis d'études menées dans la partie aval du bassin de la Seine (GIPSA). Ils visent à évaluer les effets d'une exposition chronique et multiple aux contaminants chimiques et microbiologiques (gènes de résistances aux antibiotiques, intégrons cliniques) sur les communautés microbiennes de biofilms (premier niveau du réseau trophique), et de la couche superficielle des sédiments.

L'étude du résistome des biofilms et des sédiments est utilisée pour évaluer l'adaptation des communautés bactériennes, comme un indicateur de vulnérabilité / ou de résilience du milieu, à la contamination chimique ou microbiologique. Cette étude s'est intéressée à deux facteurs d'enrichissement du résistome (i) l'acquisition de gène de résistance aux métaux qui explique la tolérance des communautés bactériennes à l'échelle cellulaire (ii) à la présence des intégrons cliniques due à la contamination du milieu par des bactéries antibiorésistantes.

*Les résultats obtenus montrent un enrichissement du patrimoine génétique des bactéries en gènes de résistances aux métaux traces *cusA* et *czcA*, dans les communautés microbiennes présentes dans les biofilms ou les sédiments en fonction du gradient d'anthropisation ou d'urbanisation, le long du transect amont-aval de l'Orge ou en Seine (transect Marnay-Bougival-Triel). Ce résultat témoigne d'une adaptation de ces communautés bactérienne à une exposition chronique à ces métaux et confirme les résultats obtenus en laboratoire lors de la phase précédente du programme PIREN Seine.*

A cet enrichissement en gène de résistance aux métaux traces, s'ajoute un apport en intégrons cliniques. Dans les sédiments, l'abondance en intégrons de classe 1 reflète le niveau d'anthropisation du bassin versant, et notamment la contamination en bactéries fécales antibiorésistantes, qui reflète le degré d'urbanisation.

Les biofilms des végétaux sont aussi des zones de piégeages de ces intégrons. Dans les biofilms prélevés sur les dispositifs en cagette, le long du transect Marnay-Bougival-Triel, on observe une présence permanente d'intégrons de classe 1, dont l'abondance augmente avec le degré d'anthropisation du bassin versant, les valeurs maximales étant là aussi observées dans la zone la plus urbanisée (Triel), et ce quelle que soit la saison.

1 Contexte scientifique et rappels des acquis

Ces travaux s'inscrivent dans la continuité de la phase VI du programme Piren-Seine (suivis de contamination et d'impacts écotoxicologiques sur l'axe Seine) et s'appuient sur des acquis d'études menées dans la partie aval du bassin de la Seine (GIPSA). Ils visent à évaluer les effets d'une exposition chronique et multiple aux contaminants chimiques et biologiques (gènes de résistances aux antibiotiques) sur les communautés microbiennes de biofilms (premier niveau du réseau trophique), et de la couche superficielle des sédiments.

Dans le bassin versant de la Seine, les biofilms et les sédiments sont ainsi des niches écologiques (« hot spot »), où les communautés microbiennes sont exposées à une multi-exposition chronique aux contaminants chimiques (organiques ou métalliques) dont des antibiotiques (Chen et al., 2014, Su et al., 2014 ; Koczura et al., 2016 ; Calero-Caceres et al., 2017), à laquelle s'ajoute, sur certains sites, un apport continu en bactéries antibiorésistantes d'origine humaine ou animale. Les sédiments (vasières), ou biofilms (périphyton) constituent alors des zones de dépôts et/ou de piégeage où se concentrent des contaminants chimiques et organiques (Berthe et al., 2008 ; Tamtam et al., 2011), mais aussi des espèces bactériennes d'origine clinique qui perdent majoritairement leur cultivabilité, selon la capacité d'adaptation de ces souches aux stress environnementaux (Berthe, et al., 2013, Bergholz, et al., 2011). En parallèle, le génome des souches qui auront perdu leur cultivabilité, dont certaines hébergent des éléments génétiques mobiles, et/ou des intégrons impliqués dans la multi-résistance aux antibiotiques et /ou aux contaminants chimiques (Stadler et al., 2013 ; Gillings et al., 2015), persistent plus longtemps dans l'environnement. Parmi ces supports génétiques, un intérêt particulier est porté sur les intégrons cliniques car ces éléments génétiques, portant souvent plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques, sont impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques notamment en milieu clinique (Barraud et al., 2014; Leverstein-van Hall et al., 2002). Aujourd'hui les intégrons cliniques, considérés comme des contaminants xénogénétiques (Gillings, 2013), sont proposés comme des bioindicateurs du risque de dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement (Borruso, et al., 2016, Gillings et al., 2015).

Dans les sédiments superficiels de Seine, les bactéries fécales et les contaminants chimiques associés aux matières en suspension de la colonne d'eau se déposent sur les vasières, zones d'accumulation des sédiments (Kaci et al., 2016). Les bactéries fécales qui se déposent sur ces vasières, perdent rapidement leur cultivabilité, alors que leurs génomes restent détectables par des approches de biologie moléculaire (Berthe et al., 2008). Dans des archives sédimentaires (carotte Rhapsodis, GIPSA), la contamination en métaux traces et contaminants organiques qui reflètent la contamination des eaux pendant une période de 40ans, s'accompagne d'une augmentation de l'occurrence des gènes de résistances au mercure (*merA*) au cadmium zinc cobalt (gène *czcA*) dans les horizons les plus contaminés (Kaci et al., 2014). De même, la contamination en HAP, zinc et PCB modifie la diversité des communautés bactérienne (y compris les communautés métaboliquement actives) dans les sédiments les plus contaminés (Kaci et al., 2016). Sur une carotte de sédiments prélevée dans la partie amont du bassin versant de la Seine (Bouaffles, PIREN Seine), des antibiotiques persistent plus de trente années, à des concentrations pouvant atteindre 32 mg. Kg⁻¹ pour les quinolones, 15 mg.kg⁻¹ pour les sulfamides et 20 mg.kg⁻¹ pour l'acide nalidixique (Tamtam et al., 2011).

De même dans des biofilms, des expositions en laboratoire ont démontré les capacités d'adaptation des communautés microbiennes de ces biofilms (ou périphyton), développés sur des dispositifs artificiels, positionnés le long du gradient d'anthropisation (Marnay, Bougival, Triel ; phase 6 du PIREN Seine/projet ANR Sequadapt). Cette acquisition de tolérance aux métaux traces des communautés bactériennes se traduit (i) à l'échelle cellulaire par l'acquisition et l'expression de gène de résistance à l'argent (gène *silA*) ou au cadmium/zinc/cobalt (gène *czcA*), suggérant une sélection de bactéries résistantes en réponse à une exposition chronique à des seuils toxiques en Ag⁺, Zn²⁺, Co²⁺ ou Cd²⁺; (ii) à l'échelle de la communauté microbienne par une modification de la diversité microbienne, avec une augmentation de l'abondance de genres bactériens capables de se multiplier en milieux contaminés comme les *Burkholderiales*, *Cytophagales* et *Sphingobacteriales* (Autret, 2016).

Dans ce contexte, le résistome (ensemble des gènes conférant la résistance aux antibiotiques et/ou aux métaux traces) des communautés microbiennes des biofilms et des sédiments sera étudié comme un indicateur de vulnérabilité / ou de résilience du milieu aux contaminants chimiques ou microbiologiques.

2 Objectifs

L'objectif de cette action est d'évaluer la réponse et l'adaptation des communautés microbiennes, à la pression anthropique exercée sur le bassin versant en considérant le résistome des communautés bactérienne des biofilms (premier maillon de la chaîne trophique) et des sédiments comme un indicateur de vulnérabilité / ou de résilience du milieu, à la contamination chimique ou microbiologique. La résilience étant définie ici comme (i) la capacité d'épuration à savoir la disparition des bactéries pathogènes, ou des gènes d'intérêt (intégrons cliniques) ; ii) une modification de la diversité spécifique avec maintien de la diversité fonctionnelle (à partir d'une approche de métagénomique / prélèvements *in situ*).

Dans le cadre de l'exercice 2016 du programme PIREN Seine, l'analyse approfondies des données de métagénomiques (obtenues dans le cadre de la phase 6 du programme PIREN Seine, Projet ANR Séquadapt) a confirmé une modification de la diversité spécifique de la communauté bactérienne des biofilms/périphyton exposées en laboratoire à une contamination métallique, avec un enrichissement sélectif en 5 genres bactériens caractéristiques des milieux fortement contaminés. Ces genres bactériens initialement présents dans les biofilms prélevés en Seine, pourraient constituer une empreinte génétique, témoin d'une exposition à des concentrations en métaux traces toxiques pour une partie de la communauté microbienne du périphyton.

En 2017, L'attribution du projet PANDORE (ANSES) dont une partie est consacrée à l'étude de la dissémination de l'antibiorésistance, nous a amené à modifier les actions prévues entre 2017 et 2019 car la recherche des bactéries antibiorésistantes fera l'objet d'une démarche d'inter-calibration entre les ateliers du PIREN Seine et ceux du SIPIBEL. En 2017, l'objectif est donc (i) de constituer une banque d'échantillons (biofilms) représentatifs du gradient d'anthropisation, dont la diversité microbienne sera analysée afin de valider l'utilisation du proxy (5 espèces bactériennes adaptées) pour évaluer l'exposition chronique à une contamination métallique ; (ii) suivi des marqueurs moléculaires d'exposition aux métaux traces et de dissémination de l'antibiorésistance (intégrons cliniques). Deux campagnes ont été réalisées en période basses eaux, complétées par une analyse rétroactive des biofilms prélevés sur les sites de l'axe Seine pour étudier l'effet saisonnier.

3 Stratégie d'échantillonnage et méthodologie

3.1 Stratégie d'échantillonnage et choix des sites

Les échantillons de sédiments ou biofilms ont été prélevés en suivant un gradient de pression anthropique le long de l'axe Seine (Marnay, Bougival Triel) et dans la rivière de l'Orge dont le bassin versant présente une occupation du sol très sectorisée avec une zone rurale en amont (45% d'agriculture et 31% de forêts) et une zone urbaine en aval (23% du territoire). Sur les 12 sites étudiés lors de la phase précédente du programme (Dinh et al, 2017), 6 sites ont été choisis sur la base de la densité démographique, l'occupation des sols de l'amont vers l'aval : 3- Saint Martin de Bréthencourt, 4- Dourdan, 5- Sermaise, 7-Saint-Germain-lès-Arpajon, 10-Savigny Sur Orge, 12-Viry-Châtillon. Dans les 6 sites du bassin versant de l'orge, des sédiments de rivière et des biofilms se développant sur végétaux ont été collectés le 30 mai 2017.

Sur l'axe Seine, des biofilms se développant sur des membranes en polyéthylène basse densité (LPD) ont été collectés en septembre 2011, avril 2012 et septembre 2012 (phase 6 du programme PIREN Seine, Projet ANR Séquadapt) ; et sur des végétaux aquatiques le 1^{er} juin 2017.

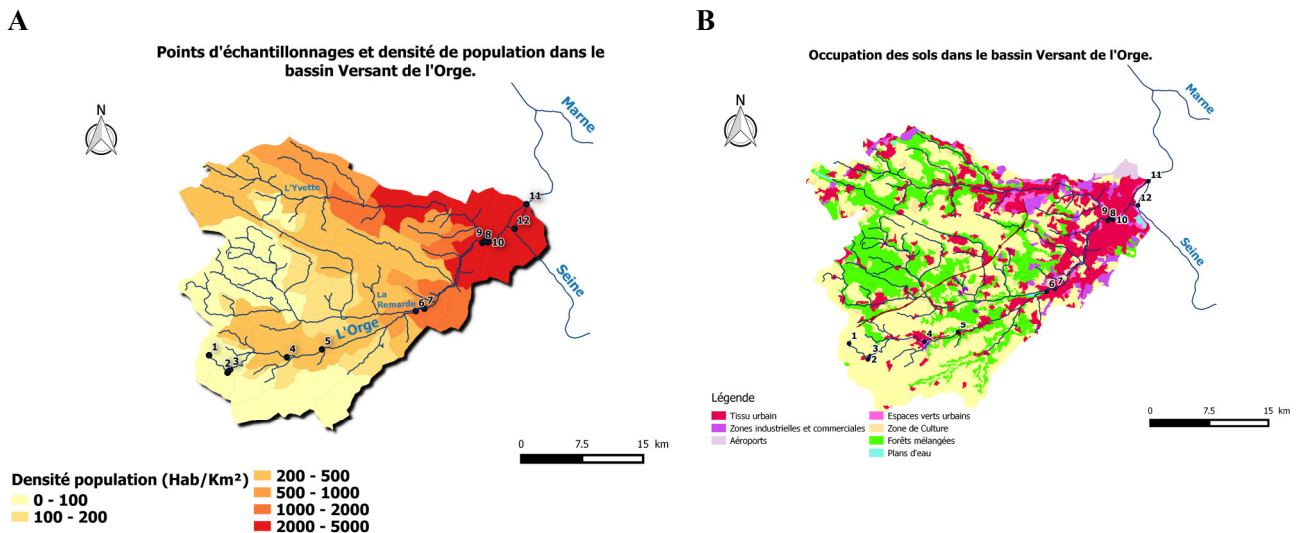


Figure 1 : Stratégie d'échantillonnage le long de l'Orge : les sédiments et périphytons naturels ont été prélevés sur 6 sites, (3- Saint Martin de Bréthencourt, 4- Dourdan, 5- Sermaise, 7-Saint-Germain-lès-Arpajon, 10-Savigny Sur Orge, 12-Viry-Châtillon) positionnés le long d'un gradient amont-aval fortement anthropisé en termes de densité humaine (A) et d'occupation des sols (B).

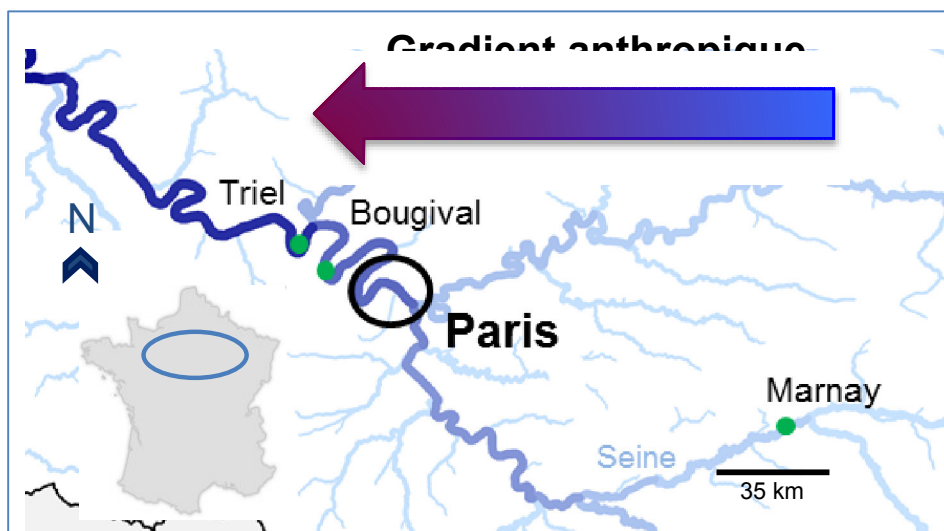


Figure 2 : Stratégie d'échantillonnage dans la partie amont du bassin versant de la Seine : le sédiment et biofilms (périphyton) ont été prélevés le long du transect Marnay, Bougival, Triel caractérisé par un important gradient anthropique (phases précédentes du programme PIREN SEINE).

3.2 Démarche méthodologique

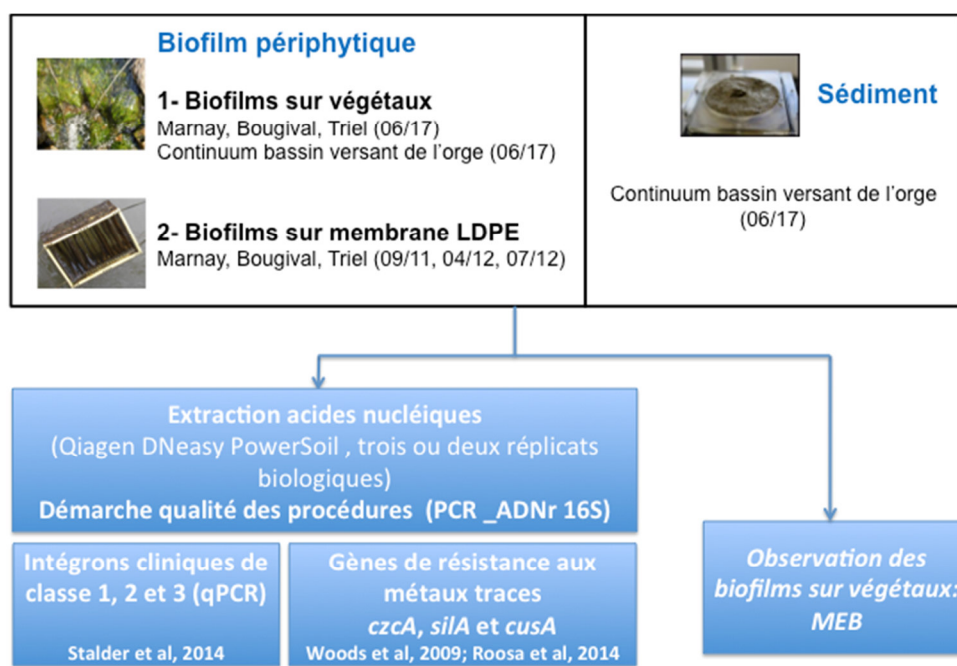


Figure 3 : Démarche méthodologique pour la détection moléculaire des gènes de résistances aux métaux traces (*czcA*, *silA* et *cusA*) ou des intégrons cliniques de classe 1, 2 et 3 dans les ADN extraits des biofilms ou sédiments prélevés dans l'Orge (Figure 1) ou en Seine (Figure 2).

Les membranes en LPDE recouvertes de biofilm sont grattées et la biomasse périphytique est obtenue après centrifugation puis stockée à -80°C (Fechner et al, 2011). Les biofilms collectés à partir des végétaux ont été prélevés à l'aide d'un scalpel, puis remis en suspension dans de l'eau physiologique stérile avant d'être filtrés sur membrane (Durapore, Millipore). Les extractions des acides nucléiques ont été réalisées à partir de 0,25 g de sédiments (masse humide) ou de biofilms (sous forme de culot) ou à partir d'un demi-filtre. Ces extractions ont été réalisées en triplicats à l'aide du kit DNeasy PowerLyzer Power Soil (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. Les ADN ont été quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre à micro-volume (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific). La détection/quantification des gènes conférant la résistance au $\text{Co}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$, au Cu^{2+} et à l' Ag^{+} ont été réalisés en ciblant respectivement les gènes *czcA* (Roosa et al, 2014), *cusA* (Besaury et al, 2013) et *silA* (Woods et al, 2009). La quantification des intégrons cliniques de classe 1, 2 et 3 a été réalisée comme indiqué dans Barraud et al (2010) et les abondances ont été normalisées par le nombre total de bactéries via la quantification du gène codant l'ADNr 16S (Stalder et al, 2012). Des observations en microscopie environnementale ont été réalisées sur la plateforme de l'UMR MONARIS de l'UPMC.

4 Résultats- Discussion

4.1 Suivi des marqueurs moléculaires d'exposition aux métaux traces au sein du résistome bactérien des biofilms et des sédiments

Au sein des biofilms qui colonisent les végétaux aquatiques dans l'Orge et sur les 3 sites de la Seine on observe, dans le génome des communautés microbiennes, une présence permanente du gène *czcA*, marqueur moléculaire d'une exposition au cadmium et/ou au cobalt et/ou au zinc (Figures 3A), et du gène *cusA*, marqueur moléculaire d'une exposition au cuivre (Figure 5). L'abondance relative de ces gènes augmente en fonction du gradient anthropique (Figure 5). En Seine, le gène *czcA* (Figure 4A) et le gène *cusA* sont toujours

détectés dans les ADN extraits des biofilms qui se développent sur les dispositifs de cagettes (transect Seine), pour les 3 périodes échantillonnées entre Septembre 2011 et juillet 2012.

L'analyse des sédiments conduite sur le site de l'Orge montre, tout comme dans les biofilms, une présence permanente des gènes *czcA* (Figure 3B) et *cusA*. Ces résultats sont cohérents avec l'augmentation de la contamination en cuivre décrite par Le Pape et al (2012) dans le bassin versant de l'Orge, et les valeurs mesurées sur les sites de Bougival et Triel par Fechner et al. (2012).

En revanche, le gène *silA* marqueur moléculaire d'une exposition à l'argent, n'a jamais été détecté dans les ADN bactériens extraits des biofilms qui se développent sur les végétaux aquatiques ou sur les cagettes en Seine quelle que soit la campagne. Dans l'Orge, le gène *silA* est présent dans les ADN bactériens extraits des biofilms des sites de Sermaise, de Saint-Germain-lès-Arpajon et Viry-Châtillon, et seulement dans les sédiments des végétaux aquatiques du site de Viry-Châtillon (Figure 6).

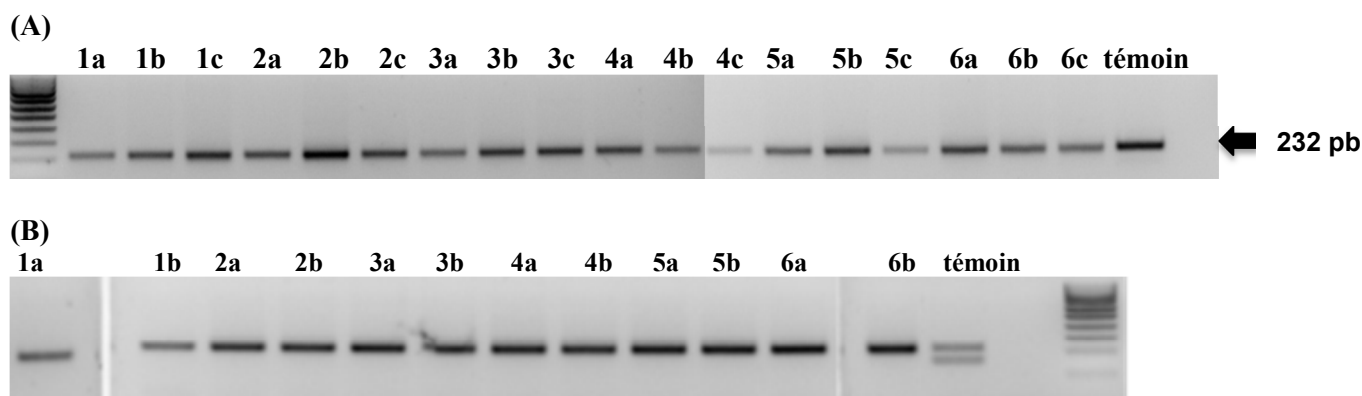


Figure 3 : Analyse électrophorétique des amplicons (gel à 2%) obtenus après l'amplification des gènes de résistance au cadmium, zinc et/ou cobalt (*czcA*) dans les ADN extraits des biofilms développés sur des végétaux (3A triplicat) ou sédiments (3B duplicat) : 1- Saint Martin de Bréthencourt, 2- Dourdan, 3- Sermaise, 4-Saint-Germain-lès-Arpajon, 5-Savigny Sur Orge, 6-Viry-Châtillon. Campagne du 30 mai 2017.

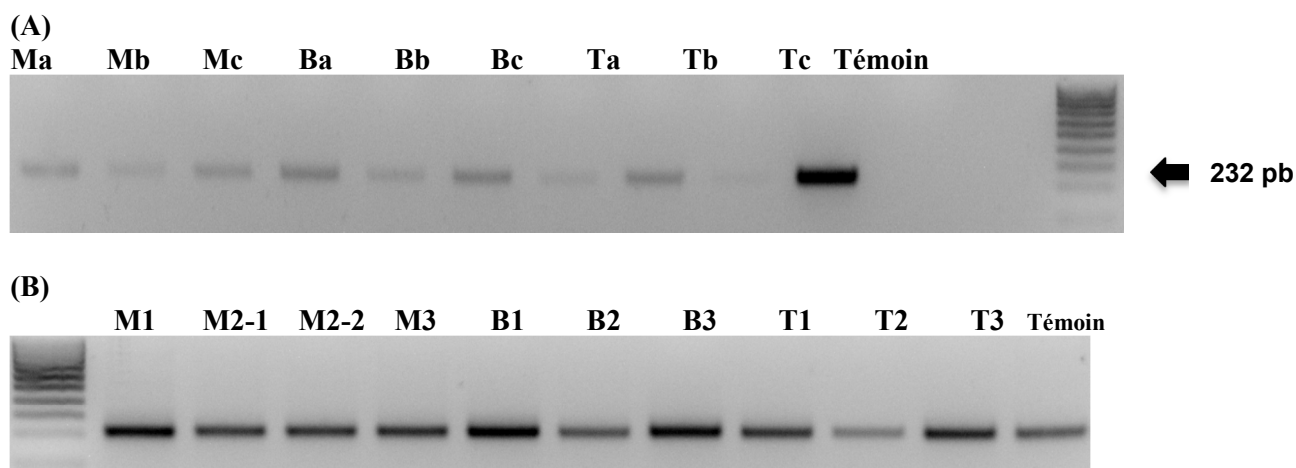


Figure 4 : Analyse électrophorétique des amplicons (gel à 2%) obtenus après l'amplification des gènes de résistance au cadmium, zinc et/ou cobalt (*czcA*) dans les ADN extraits des biofilms développés le long du transect Marnay (M), Bougival (B), Triel (T) : 4A, sur des végétaux aquatiques (juin 2017 ; analyse en triplicat (a, b, c), 4B sur des biofilms développés sur dispositif de cagette (1, 09/2011 ; 2, 04/2012 ; 3, 07/2012). M2-1/M2-2 ; duplicat technique.

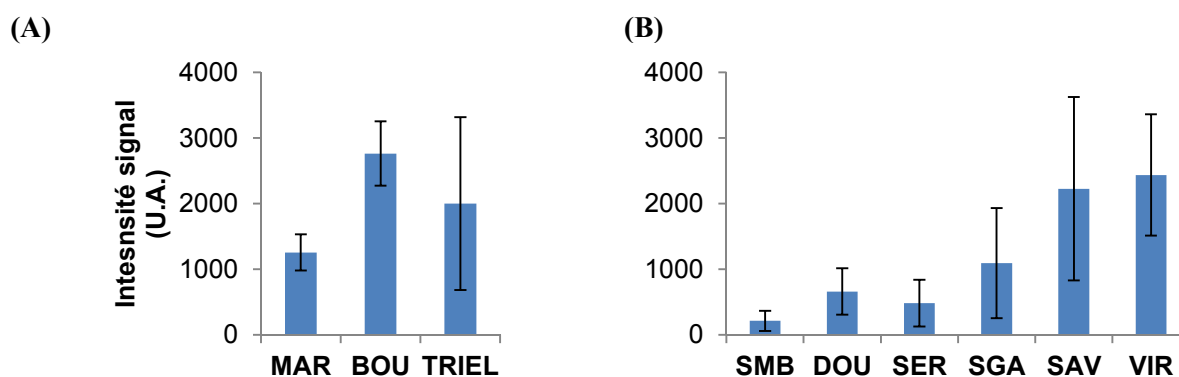


Figure 5 : Quantification moléculaire du gène de résistance au cuivre *cusA* dans les ADN extraits de biofilms (triplicat) qui se développent sur des végétaux prélevés sur les 3 sites du transect de Seine : 5A ; Marnay (MAR); Bougival (BOU); Triel ou sur les sites de l'Orge : Saint Martin de Bréthencourt (SMB); Dourdan (DOU); Sermaise (SER) ; Saint-Germain-lès-Arpajon (SGA); Savigny Sur Orge (SAV); Viry-Châtillon (VIR). Campagnes des 30 mai et 1^{er} juin 2017.

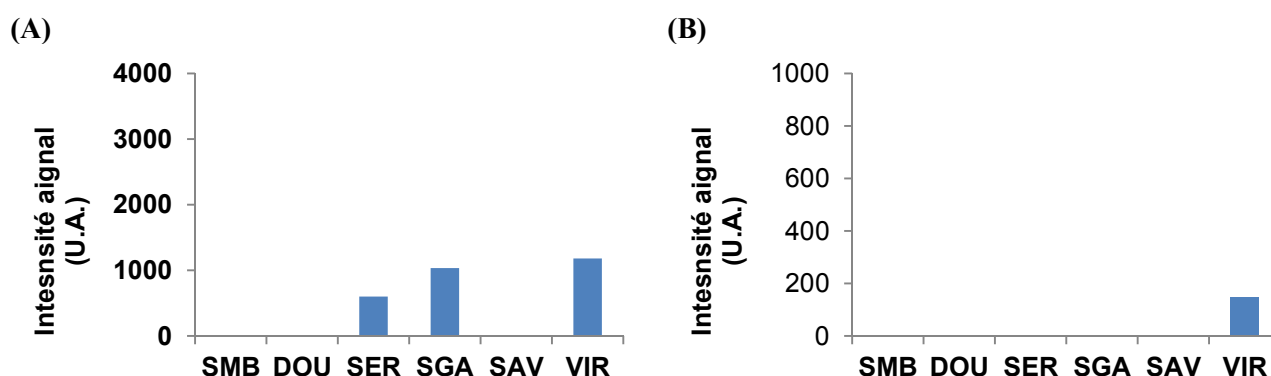


Figure 6 : Quantification moléculaire du gène de résistance à l'argent *silA* dans les ADN extraits de biofilms (triplicat) qui se développent sur des végétaux prélevés sur les sites de l'Orge : Saint Martin de Bréthencourt (SMB); Dourdan (DOU); Sermaise (SER) ; Saint-Germain-lès-Arpajon (SGA); Savigny Sur Orge (SAV); Viry-Châtillon (VIR). Campagne du 30 mai 2017.

4.2 Suivi des marqueurs moléculaires de dissémination de l'antibiorésistance au sein du résistome bactérien des biofilms et des sédiments

Les intégrons sont des supports génétiques de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Ils sont répandus dans le monde bactérien et jouent un rôle majeur dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques, principalement chez les bactéries à Gram négatif. On distingue 3 classes d'intégrons « cliniques » appelés classes 1, 2 et 3, définies par la séquence en acides aminés de l'intégrase *IntI*.

En Seine, le long du transect Marnay, Bougival, Triel, les intégrons de classe 1 sont présents dans les biofilms des trois sites, et quelle que soit la période de prélèvement. Leur abondance augmente en fonction de la pression anthropique (Figure 7A). Les intégrons de classe 3 sont fréquemment détectés mais uniquement quantifiables sur Marnay et Triel (campagne Avril 2012 ; Figure 3B).

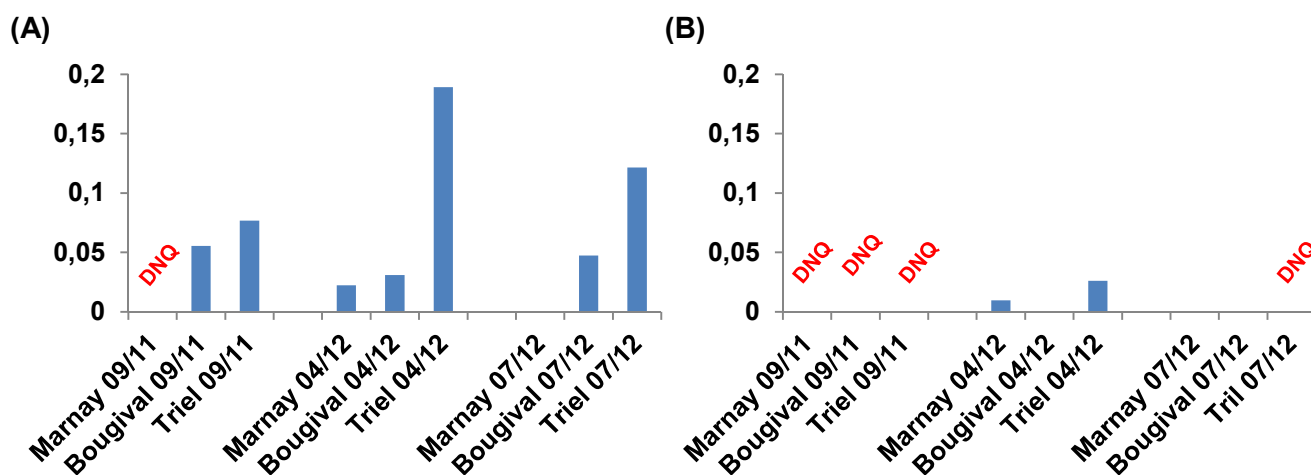
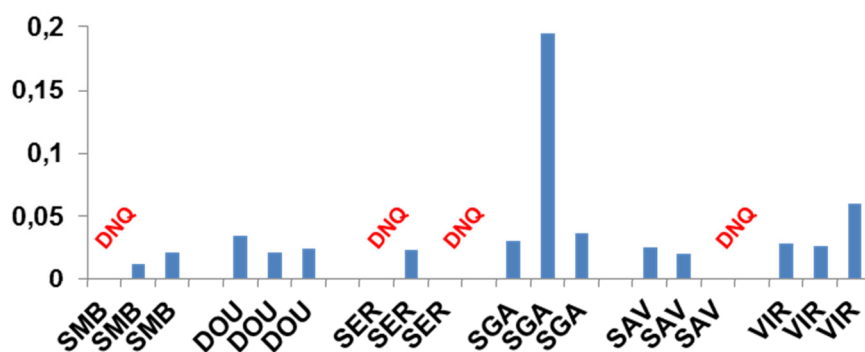


Figure 7 : Evolution saisonnière de l'abondance relative des intégrons cliniques en Seine le long du transect Marnay, Bougival, Triel. A ; intégron clinique de classe 1 (copies intl1/bactérie) et B ; intégrons cliniques de classe 3 (copies intl3/bactérie). DNQ signifie: Détectable mais Non Quantifiable.

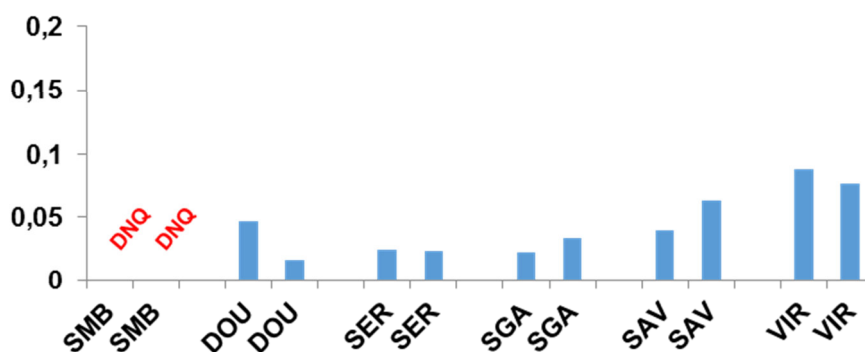
Le long du transect amont-aval de l'Orge, les intégrons cliniques de classe 1 sont détectables dans les ADN bactérien extraits des sédiments, sur tous les sites avec une abondance relative qui augmente pour les sites les plus anthropisés à l'aval 5 (Savigny sur orge et Viry-Chatillon ; Figure 8B). Dans les biofilms, les intégrons sont présents sur tous les sites, avec un maximum d'abondance observée sur un des biofilms prélevé sur le site de Saint Germain lès Arpajon, site impacté par un affluent ou se rejettent des effluents hospitaliers. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Dinh et al (2017), qui montre une contamination de l'eau par des antibiotiques sur ce même site. Aucun intégron clinique de classe 2 n'a été détecté, les intégrons de classe 3 sont détectés sur presque tous les sites dans les sédiments et les biofilms de végétaux, mais à des concentrations souvent trop faibles pour être quantifiés.

Pour un même site, on observe une variabilité des quantités entre les échantillons, qui pourrait être attribuable à l'espèce végétale. En effet, les bactéries fécales, allochtones aux milieux peuvent avoir plus de difficultés à se fixer sur certains biofilms présents dans le milieu aquatique.

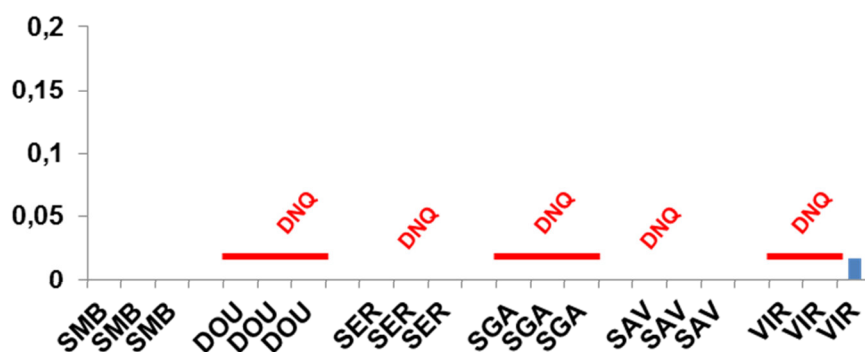
(A)



(B)



(C)



(D)

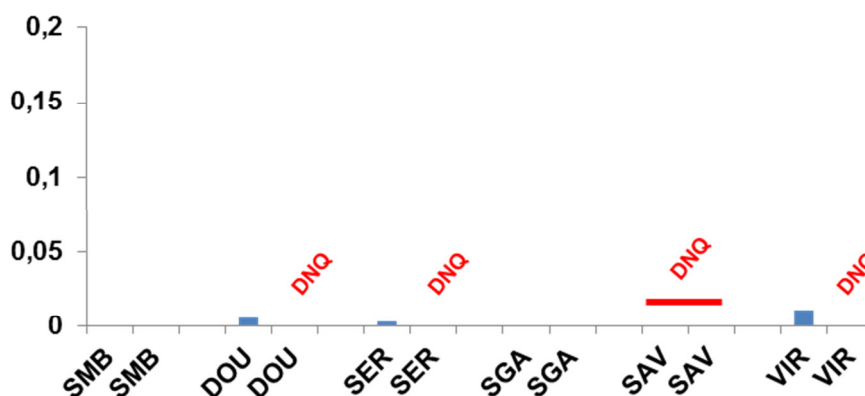


Figure 8 : Evolution saisonnière de l'abondance relative des intégrons cliniques le long d'un transect amont – aval de l'Orge : intégrons cliniques de classe 1 (copies intl1/bactérie) dans les biofilms (A) ou dans les sédiments (B) ; intégrons cliniques de classe 3 (copies intl3/bactérie) dans les biofilms (C) ou dans les sédiments (D). Les sites échantillonnés sont : Saint Martin de Bréthencourt (SMB), Dourdan (DOU), Sermaise (SER), Saint-Germain-lès-Arpajon (SGA), Savigny Sur Orge (SAV), Viry-Châtillon (VIR).
DNQ signifie : Détectable mais Non Quantifiable.

Des résultats préliminaires obtenus en microscopie électronique montrent une abondance très importante de micro-algues au niveau des biofilms se développant sur les végétaux aquatiques à Marnay et Bougival (Figure 9), alors que la composante algale n'est pas étudiée dans ce projet.

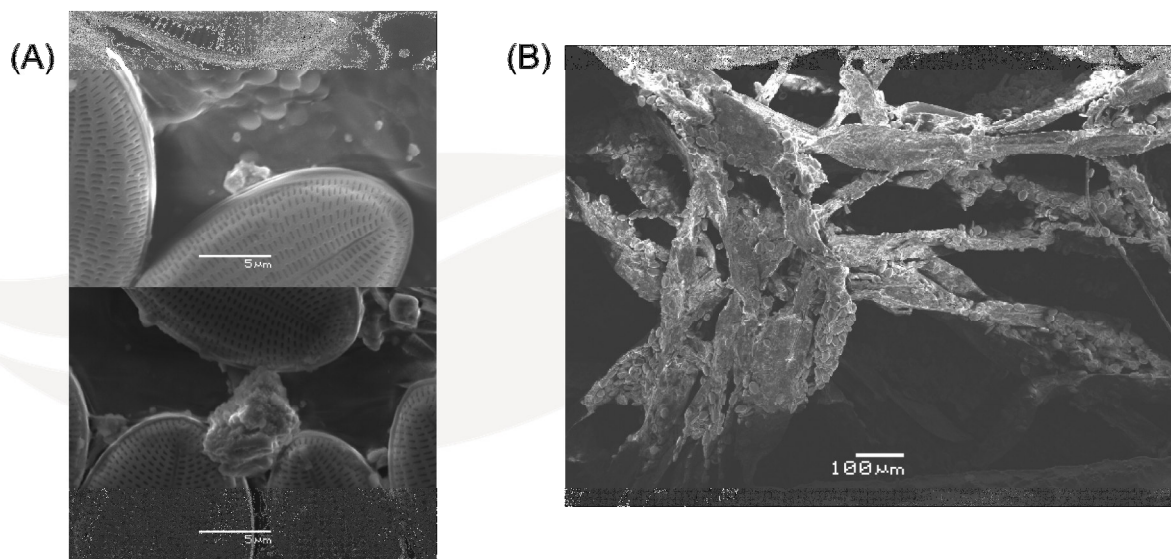


Figure 9 : Observations en microscopie électronique de biofilms se développant sur des végétaux aquatiques à Marnay (A) et Bougival (B). Campagne du 01 juin 2017.

5 Conclusions

L'enrichissement du patrimoine génétique des bactéries en gènes de résistances aux métaux traces dans les communautés microbiennes présentes dans les biofilms ou les sédiments en fonction du gradient d'anthropisation ou d'urbanisation, le long du transect amont-aval de l'Orge, ou en Seine (transect Marnay-Bougival-Triel), témoigne d'une adaptation de ces communautés bactérienne à une exposition chronique à ces métaux.

A cet enrichissement en gène de résistance aux métaux traces, s'ajoute un apport en intégrons cliniques. Dans les sédiments, l'abondance en intégrons de classe 1 reflète le niveau d'anthropisation du bassin versant, et notamment la contamination en bactéries fécales antibiorésistantes, qui reflète le degré d'urbanisation.

Les biofilms des végétaux sont aussi des zones de piégeages de ces intégrons. Dans les biofilms prélevés sur les dispositifs en cagette, le long du transect Marnay-Bougival-Triel, on observe une présence permanente d'intégrons de classe 1, dont l'abondance augmente avec le degré d'anthropisation du bassin versant, les valeurs maximales étant là aussi observées dans la zone la plus urbanisée (Triel), et ce quelle que soit la saison.

Une réflexion devra être menée sur la représentativité des biofilms échantillonnés sur les végétaux aquatiques, analysés à l'échelle de la rivière afin de développer une approche quantitative.

Les biofilms ont été stabilisés à -80°C, afin de constituer une collection représentative d'échantillons pour faire une analyse de la diversité sur la base du séquençage de l'ADNr 16S.

Une campagne hautes-eaux est prévue en décembre 2017, et des pièges à sédiments seront disposés sur les sites. Ce projet, bénéficiera en 2018 et 2010 de financements complémentaires dans le cadre d'un projet ANSES « PANDORE » qui seront mis à profit pour le volet bactériologique (recherche d'espèce bactérienne pathogène d'intérêt clinique).

Bibliographie

- Su et al., 2014 ; Koczura et al., 2016 ;
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F., and Ploy, M.C. (2010). Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 1642–1645.
- Barraud, O., François, B., Chainier, D., Vignau, M., Ploy, M.-C. (2014) Value of integron detection for predicting antibiotic resistance in patients with Gram-negative septicemia, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44, 351–353
- Bergholz, P.W., Noar, J.D., and Buckley, D.H. (2011). Environmental Patterns Are Imposed on the Population Structure of *Escherichia coli* after Fecal Deposition. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 211–219.
- Berthe, T., Touron, A., Leloup, J., Deloffre, J., and Petit, F. (2008). Faecal-indicator bacteria and sedimentary processes in estuarine mudflats (Seine, France). *Marine Pollution Bulletin* 57, 59–67.
- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., and Petit, F. (2013). Evidence for Coexistence of Distinct *Escherichia coli* Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 4684–4693.
- Besaury, L., Bodilis, J., Delgas, F., Andrade, S., De la Iglesia, S., Ouddane, B., and Quillet, L. (2013). Abundance and diversity of copper resistance genes *cusA* and *copA* in microbial communities in relation to the impact of copper on Chilean marine sediments. *Marine Pollution Bulletin* 67, 16–25.
- Borruso, L., Harms, K., Johnsen, P.J., Nielsen, K.M., and Brusetti, L. (2016). Distribution of class 1 integrons in a highly impacted catchment. *Science of The Total Environment* 566–567, 1588–1594.
- Calero-Cáceres, W., Méndez, J., Martín-Díaz, J., and Muniesa, M. (2017). The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environmental Pollution* 223, 384–394.
- Chen, Y., Dinh, Q.T., Chevreuil, M., Garnier, J., Roose-Amsaleg, C., Labadie, P., and Laverman, A.M. (2013). The effect of environmental and therapeutic concentrations of antibiotics on nitrate reduction rates in river sediment. *Water Research* 47, 3654–3662.
- Fechner, L., Gourlay-Francé, C., and Tusseau-Vuillemin M.H. (2011). Low exposure levels of urban metals induce heterotrophic community tolerance: a microcosm validation. *Ecotoxicology* 20, 793–802.
- Fechner, L.C., Dufour, M., and Gourlay-Francé, C. (2012). Pollution-induced community tolerance of freshwater biofilms: measuring heterotrophic tolerance to Pb using an enzymatic toxicity test. *Ecotoxicology* 21, 2123–2131.
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., and Zhu, Y.-G. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal* 9, 1269–1279.
- Kaci, A., Petit, F., Lesueur, P., Boust, D., Vrel, A., and Berthe, T. (2014). Distinct diversity of the *czcA* gene in two sedimentary horizons from a contaminated estuarine core. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 10787–10802.
- Kaci, A., Petit, F., Fournier, M., Cécillon, S., Boust, D., Lesueur, P., and Berthe, T. (2016). Diversity of active microbial communities subjected to long-term exposure to chemical contaminants along a 40-year-old sediment core. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 4095–4110.
- Koczura, R., Mokracka, J., Taraszewska, A., and Łopacińska, N. (2016). Abundance of Class 1 Integron-Integrase and Sulfonamide Resistance Genes in River Water and Sediment Is Affected by Anthropogenic Pressure and Environmental Factors. *Microbial Ecology* 72, 909–916.
- Leverstein-Van Hall, M.A., Paauw, A., Box, A.T., Blok, H.E., Verhoef, J., and Fluit A.C. (2002). Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J Clin Microbiol* 40, 3038–40.
- Le Pape, P., Ayrault, S., Michelot, J.L., and Quantin . (2012). Trace element behavior and partition versus urbanization gradient in an urban river (Orge River, France). *Journal of Hydrology* 472–473, 99–110.

- Roosa, S., Wattiez, R., Prygiel, E., Lesven, L., Billon, G., and Gillan D.C. (2014). Bacterial metal resistance genes and metal bioavailability in contaminated sediments. *Environmental pollution* 189, 143-151.
- Quoc Tuc, D., Elodie, M.-G., Pierre, L., Fabrice, A., Marie-Jeanne, T., Martine, B., Joelle, E., and Marc, C. (2017). Fate of antibiotics from hospital and domestic sources in a sewage network. *Science of The Total Environment* 575, 758–766.
- Su, H.-C., Pan, C.-G., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Zhou, L.-J., Liu, Y.-S., Tao, R., Zhang, R.-Q., and He, L.-Y. (2014). Contamination profiles of antibiotic resistance genes in the sediments at a catchment scale. *Science of The Total Environment* 490, 708–714.
- Tamtam, F., Le Bot, B., Dinh, T., Mompelat, S., Eurin, J., Chevreuil, M., Bonté, P., Mouchel, J.-M., and Ayrault, S. (2011). A 50-year record of quinolone and sulphonamide antimicrobial agents in Seine River sediments. *Journal of Soils and Sediments* 11, 852–859.
- Woods, E.J., Cochrane, C.A., and Percival S.L. (2009). Prevalence of silver resistance genes in bacteria isolated from human and horse wounds. *Veterinary Microbiology* 138, 325-329.