



HAL
open science

Étude de la biominéralisation de carbonates intracellulaires et de silicates de magnésium hydratés dans des environnements lacustres alcalins

Alexis de Wever

► **To cite this version:**

Alexis de Wever. Étude de la biominéralisation de carbonates intracellulaires et de silicates de magnésium hydratés dans des environnements lacustres alcalins. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS480 . tel-02926312

HAL Id: tel-02926312

<https://theses.hal.science/tel-02926312>

Submitted on 31 Aug 2020

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.



SORBONNE
UNIVERSITÉ



Sorbonne Université

Ecole doctorale Géosciences, Ressources Naturelles et Environnement – ED 398

Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie / Equipe BIOMIN

**Etude de la biominéralisation de carbonates
intracellulaires et de silicates de magnésium hydratés
dans des environnements lacustres alcalins**

Par Alexis De Wever

Thèse de doctorat de Géobiologie

Dirigée par Karim Benzerara

Jury composé de :

Emmanuelle Gérard (Ingénieure de recherche, IPGP)

Rapporteur

Christophe Thomazo (Directeur de recherche CNRS)

Rapporteur

Purificación López-García (Directrice de recherche CNRS)

Examineur

Olivier Beyssac (Directeur de recherche CNRS)

Examineur

Karim Benzerara (Directeur de recherche CNRS)

Directeur de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>



SORBONNE
UNIVERSITÉ



Sorbonne Université

Ecole doctorale Géosciences, Ressources Naturelles et Environnement – ED 398

Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie / Equipe BIOMIN

**Etude de la biominéralisation de carbonates
intracellulaires et de silicates de magnésium hydratés
dans des environnements lacustres alcalins**

Par Alexis De Wever

Thèse de doctorat de Géobiologie

Dirigée par Karim Benzerara

Jury composé de :

Emmanuelle Gérard (Ingénieure de recherche, IPGP)

Christophe Thomazo (Directeur de recherche CNRS)

Maguy Jaber (Professeure à UPMC)

Purificación López-García (Directrice de recherche CNRS)

Olivier Beyssac (Directeur de recherche CNRS)

Karim Benzerara (Directeur de recherche CNRS)

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| 1. VERS UNE MEILLEURE COMPREHENSION DE LA FORMATION DES STROMATOLITES | 3 |
| 1.1. Les stromatolites, des dépôts organo-sédimentaires laminés..... | 3 |
| 1.2. Les processus microbiens menant à la formation des microbialites | 5 |
| 1.2.1. La minéralisation biologiquement induite | 8 |
| 1.2.2. La minéralisation biologiquement influencée..... | 8 |
| 1.2.3. La minéralisation biologiquement contrôlée | 8 |
| 1.3. Les métabolismes microbiens favorisant et défavorisant la précipitation des carbonates..... | 9 |
| 1.3.1. Les métabolismes favorisant la précipitation de carbonate | 9 |
| 1.3.2. Les métabolismes favorisant la dissolution de carbonates | 11 |
| 1.3.3. Des micro-organismes au métabolisme photosynthétique oxygénique impliqués dans la dissolution des carbonates | 13 |
| 1.4. Des silicates de magnésium hydratés, peu cristallisés et de basses températures décrites dans les microbialites..... | 15 |
| 1.4.1. L'importance de l'étude des silicates..... | 15 |
| 1.4.2. Des silicates de magnésiums retrouvés dans des microbialites | 17 |
| 1.4.3. Les silicates de magnésium des microbialites issus de l'activité métabolique des micro-organismes | 21 |
| 2. OBJECTIFS ET STRATEGIES DE LA THESE..... | 23 |
| CHAPITRE I. FORTE INCORPORATION DE CALCIUM PAR LES CYANOBACTERIES FORMANT DES CaCO_3 INTRACELLULAIRES ET IMPACT DES DIFFERENTS ALCALINO-TERREUX SUR LEUR CROISSANCE..... | 27 |
| 1. INTERET DE L'ETUDE..... | 29 |
| 2. MANUSCRIT..... | 31 |
| 3. IMPACT DES ALCALINO-TERREUX SUR LA CROISSANCE DES CYANOBACTERIES FORMANT DES ACC INTRACELLULAIRES | 68 |
| 3.1. Le Sr et Ba, des substituts au Ca pour la croissance des cyanobactéries ACC+ .. | 68 |
| 4. PERSPECTIVES | 72 |
| CHAPITRE II. FORMATION PRIMAIRE ET DIAGENETIQUE DE SILICATES DE MAGNESIUM DE FAIBLE CRISTALLINITE DANS LES LACS ALCALINS DU MEXIQUE | 77 |
| 1. INTRODUCTION | 79 |
| 1.1. Des silicates de magnésium hydratés, peu cristallisés et de basses températures comme indicateurs des conditions physico-chimiques..... | 79 |
| 1.2. Conditions géochimiques de formation des silicates-Mg peu cristallisés..... | 81 |
| 1.3. Objectifs..... | 82 |
| 2. MATERIEL ET METHODES..... | 83 |
| 2.1. Carottes sédimentaires prélevées dans les lacs alcalins mexicains..... | 83 |
| 2.2. Chimie des eaux porales, des colonnes d'eau et des sédiments..... | 86 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.1. Analyses chimiques globales des eaux porales et de la colonne d'eau par dosage multivarié par ICP-AES (Inductively coupled plasma - Atomic Emission Spectrometry) | 86 |
| 2.2.2. Dosage par colorimétrie en flux continue du H ₄ SiO ₄ , AxFlow Quattro | 88 |
| 2.2.3. Calculs de saturation par le logiciel de spéciation chimique - Visual MINTEQ ver. 3.0 | 88 |
| 2.2.4. Analyses chimiques globales des sédiments. | 89 |
| 2.3. Protocole de synthèse de kéroélite abiotique (résultats en annexe)..... | 91 |
| 2.4. Caractérisation minéralogique | 92 |
| 2.4.1. Préparation des échantillons | 92 |
| 2.4.2. Protocole de décarbonatation selon Ostrum, 1961 (résultats en annexe) | 92 |
| 2.4.3. DRX | 93 |
| 2.4.4. FTIR | 93 |
| 2.5. La microscopie électronique | 93 |
| 2.5.1. Enrobage des échantillons sédimentaires pour la préparation par polissage ionique | 93 |
| 2.5.2. Microscopie électronique à balayage..... | 94 |
| 2.5.3. Lame ultra-fine au FIB | 95 |
| 2.5.4. Microscopie électronique à transmission | 96 |
| 3. RESULTATS | 96 |
| 3.1. Analyses des sédiments du lac d'Alchichica | 96 |
| 3.1.1. Etude de la géochimie globale de la colonne d'eau et des eaux porales | 96 |
| 3.1.2. Caractérisation minéralogique globale par DRX et spectroscopie infrarouge | 100 |
| 3.1.3. Etude des sédiments par microscopies électroniques à balayage et en transmission et stœchiométrie des phases minérales | 105 |
| 3.1.4. Quantification de la teneur des phases minérales | 111 |
| 3.2. Analyses du sédiment du lac de La Preciosa | 114 |
| 3.2.1. Etude de la géochimie globale des eaux de surface et des eaux porales | 114 |
| 3.2.2. Caractérisation minéralogique globale par DRX et spectroscopie infrarouge | 116 |
| 3.2.3. Etude des phases minérales par microscopie électronique..... | 119 |
| 3.2.4. Quantification de la proportion relative des phases minérales dans les sédiments | 122 |
| 3.3. Analyses du sédiment du lac d'Atexcac | 124 |
| 3.3.1. Etude de la composition chimique de la colonne d'eau et des eaux porales des sédiments du lac d'Atexcac..... | 124 |
| 3.3.2. Caractérisation minéralogique par DRX et spectroscopie infrarouge | 126 |
| 3.3.3. Etude des phases minérales par microscopie électronique..... | 128 |
| 3.3.4. Quantification de la proportion relative des phases minérales dans les sédiments d'Atexcac | 130 |
| 4. DISCUSSION | 132 |

| | |
|--|------------|
| 4.1. Nature et distribution des phases silicatées magnésiennes dans les sédiments des lacs alcalins : implications environnementales | 132 |
| 4.2. Formation diagenétique dans le dépôt sédimentaire de silicates de magnésium de faible cristallinité par transformation de diatomées..... | 134 |
| 4.3. Implications de la distribution et précipitation des silicates de magnésium dans les lacs alcalins mexicains | 137 |
| 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... | 139 |
| CHAPITRE III. ETUDE AU LABORATOIRE DE LA FORMATION MICROBIENNE DE SILICATES MAGNESIENS HYDRATES, PEU CRISTALLISES..... | 143 |
| 1. INTERET DE L'ETUDE..... | 145 |
| 1.1. Mise en évidence de la possibilité d'une voie de formation biotique de silicates de magnésium | 145 |
| 1.2. L'impact des microorganismes sur la formation des silicates de magnésium.... | 146 |
| 1.3. Objectifs | 149 |
| 2. MATERIEL ET METHODES | 150 |
| 2.1. Protocole des expériences de biomérialisation de silicates par des souches axéniques..... | 150 |
| 2.2. Aquariums et expériences de laboratoire contenant des microbialites et biofilms issus de différents lacs alcalins du Mexique (La Preciosa, Alchichica)..... | 152 |
| 2.3. Analyses chimiques | 153 |
| 2.3.1. Dosage du calcium dissous par colorimétrie (Moorhead et Biggs, 1974) | 153 |
| 2.3.2. Titration à l'EDTA de Mg^{2+} / Ca^{2+} | 154 |
| 2.3.3. Dosage colorimétrie de l' H_4SiO_4 par la technique du « yellow silicomolybdate » (Knudson et al., 1940) | 155 |
| 2.3.4. Dosage colorimétrie de H_4SiO_4 en flux continue Axflow. | 157 |
| 2.3.5. Dosage multivarié par ICP-AES (Inductively coupled plasma - Atomic Emission Spectrometry)..... | 157 |
| 2.4. Caractérisations minéralogiques globales | 157 |
| 2.4.1. Préparation des échantillons | 158 |
| 2.4.2. DRX | 158 |
| 2.4.3. FTIR | 158 |
| 2.5. Observations et caractérisations en microscopie des assemblages minéraux / micro-organismes | 158 |
| 2.5.1. Séchage des échantillons par contournement du point critique du CO_2 | 158 |
| 2.5.2. Corrélatrice CLSM « confocal laser scanning microscopy »/MEB | 158 |
| 2.5.3. FIB | 160 |
| 2.5.4. Microscopie électronique à balayage couplée à la spectrométrie des rayons X en dispersion d'énergie | 160 |
| 2.5.5. Microscopie électronique en transmission couplée à la spectrométrie des rayons X en dispersion d'énergie | 160 |
| 3. RESULTATS | 160 |

| | |
|--|-----|
| 3.1. Test de biominéralisation des silicates de magnésium par des cultures axéniques de souches modèles de cyanobactéries | 160 |
| 3.1.1. Suivi des paramètres chimiques et microbiologiques | 160 |
| 3.1.2. Analyses en microscopie électronique des bio-minéraux formés | 166 |
| 3.2. Études de la géochimie des eaux de mésocosmes. | 169 |
| 3.3. Caractérisation minéralogique globale par DRX et spectroscopie infrarouge des biofilms | 171 |
| 3.4. Caractérisation par microscopie confocale à balayage laser, MEB-EDXS et MEB-FIB des assemblages minéraux/microorganismes. | 177 |
| 4. DISCUSSION | 183 |
| 4.1. Paramètres géochimiques de formation des silicates de magnésium dans les mésocosmes/expériences des lacs alcalins mexicains | 183 |
| 4.2. Rôle du vivant dans la formation des phases silicatées magnésiennes | 185 |
| 4.2.1. Capacité des microorganismes photosynthétiques à induire la formation de silicates de magnésium | 185 |
| 4.2.2. La minéralisation biologiquement influencée des silicates de magnésium dans les biofilms des mésocosmes des lacs alcalins mexicains | 187 |
| 4.2.3. Synthèse | 189 |
| 4.3. Autofluorescence de la référence de kérolite | 190 |
| 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 191 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES | 195 |
| BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE | 205 |
| ANNEXES | 225 |

Introduction

1. Vers une meilleure compréhension de la formation des stromatolites

1.1. Les stromatolites, des dépôts organo-sédimentaires laminés

Le terme stromatolite (Stromatolith) a été créé par Kalkowsky (1908) décrivant des structures carbonatées laminées du Trias inférieur (Bundsandstein) d'Allemagne. Cet auteur fut également l'un des premiers à associer ces structures à une origine microbienne, qui maintenant appartiennent à une forme laminée d'un groupe de structures plus large nommé microbialites. En effet, ce terme microbialite a été introduit par Burne et Moore (1987) pour décrire des « dépôts organo-sédimentaires qui se sont formés par l'action d'une communauté microbienne piégeant et agglomérant des grains détritiques (« trapping and binding ») ou formant le locus d'une précipitation minérale ». Une large gamme de structures est alors décrite à partir de leur fabrique interne, c'est-à-dire l'arrangement des grains dans ces roches. Les microbialites sont classés en trois catégories : (1) les stromatolites, qui sont des microbialites ayant une macro-fabrique laminée. (2) Les thrombolites, caractérisés par une macro-fabrique grumeleuse et (3) les léiolites, sans macro-fabrique bien définie (Dupraz et al., 2009). Les laminations font donc partie des principales caractéristiques des stromatolites, mais les mécanismes précis conduisant à leur formation restent encore très flous (Grotzinger et Knoll, 1999).

Il est possible de trouver et d'étudier des microbialites actuels « vivants », qui sont en cours de développement. On dénombre peu de microbialites dans des environnements côtiers marins, *a contrario* de nombreux microbialites décrits dans des environnements d'eau douce, et principalement dans des lacs (**Fig.1**). On peut citer par exemple, les microbialites marins actuels de Hamelin Pool situés dans la baie des requins (Shark Bay), sur la côte ouest de l'Australie (Logan, 1961 ; Walter, 1976 ; Grotzinger and Knoll, 1999) et de l'île de Highborne Cay aux Bahamas (Reid et al., 2003 ; Khodadad et Foster, 2012). Il a souvent été supposé que les microbialites marins actuels étaient de meilleurs analogues des microbialites anciens considérés comme marins. Cependant cette idée doit être relativisée. En effet, il a été montré que de nombreux microbialites anciens ont une origine lacustre (par exemple, Tettendorst et Moore, 1978 ; Lepot et al., 2009 ; Stüeken et al, 2015). De plus, au contraire des microbialites lacustres actuels qui se forment principalement par précipitation *in situ* comme de nombreux microbialites anciens, les microbialites marins actuels semblent se former beaucoup par « trapping and binding » (Grotzinger, 1990).

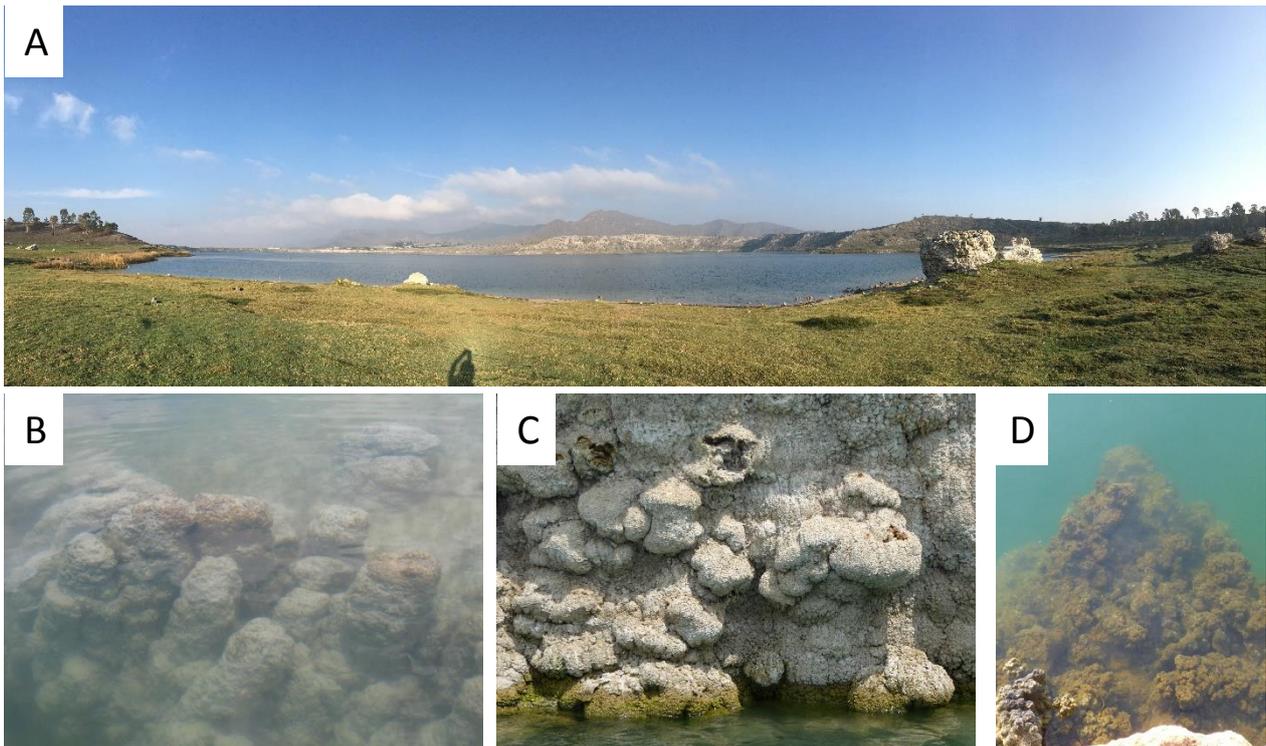


Figure 1. Microbialites vivants actuels de lacs de cratère mexicains. (A) Vue panoramique du lac de La Preciosa (image prise par Jena Johnson). (B) Microbialites actuels vivants sous l'eau sur le bord du lac d'Alchichica montrant des biofilms verts à sa surface (Image prise par Didier J.). (C) Microbialites formant une paroi abrupte superposée aux parois du cratère d'Atexcac (image prise par Karim B.). (D) Microbialites actuels vivants sous l'eau sur le bord du lac d'Alchichica montrant des biofilms verts à sa surface (image prise par Karim B.).

Enfin, comme cela a été mentionné, les microbialites peuvent être qualifiés de « vivants ». On y trouve à leur surface une communauté de micro-organismes organisée avec une certaine diversité biologique. Ces micro-organismes se développent et se maintiennent ensemble par l'intermédiaire d'une matrice organique extracellulaire protectrice formant ainsi un biofilm (Decho, 2010). La cohabitation de ces micro-organismes est à l'origine de la précipitation ou au contraire de la dissolution des carbonates constituant le microbialite. Le passage du biofilm au microbialite (lithification) est permis par l'intermédiaire de divers processus microbiologiques. En outre, on trouve des micro-organismes qui favorisent essentiellement la cohésion du biofilm, alors que d'autres participent juste à la vie de l'ensemble, via des échanges métaboliques.

On trouve 5 groupes principaux de micro-organismes procaryotes à la surface des microbialites marins ou lacustres (van Gemerden, 1993 ; Visscher et Stolz, 2005 ; Couradeau et al., 2011 ; Saghai et al., 2015): (i) les photolithoautotrophes : les phototrophes oxygéniques (principalement les cyanobactéries) et les phototrophes anoxygéniques (bactéries sulfureuses pourpres et vertes), (ii) les (chimioorgano-) hétérotrophes aérobies, (iii) les fermenteurs (à lieu pendant la nuit), (iv) les hétérotrophes anaérobies (bactéries sulfato-réductrices (SRB)) et (v)

les bactéries sulfo-oxydantes («sulfide oxidizing bacteria») oxydant le soufre (SOB) (développé dans la **section 1.3**). Les analyses des séquences de l'ARNr 16S récupérées à partir des stromatolites de Shark Bay montrent que les archées sont assez présentes (Burns et al., 2004 ; Papineau et al., 2005). De plus, certains auteurs considèrent que les archées jouent un rôle important au sein des stromatolites modernes (par exemple, Foster et Green, 2011). *A contrario* les archées sont rares et avec une très faible diversité dans le lac alcalin d'Alchichica et sont donc considérées comme peu importantes (Couradeau et al., 2011 ; Saghai et al., 2015). Seules quelques études plus récentes se sont penchées sur l'analyse de la diversité des eucaryotes qui se base sur le séquençage d'amplicons des gènes de l'ARNr 18S dans divers environnements (Allen et al., 2009 ; Myshrall et al., 2010 ; Couradeau et al., 2011 ; Farías et al., 2014 ; Saghai et al., 2015). Le faible intérêt d'étudier les eucaryotes associés aux microbialites pourrait être lié au fait que les stromatolites du Précambrien les plus anciens ne pourraient provenir que de l'activités des procaryotes et donc après l'apparition des eucaryotes (Allwood et al., 2006) et de l'idée générale selon laquelle les cyanobactéries sont les contributeurs biologiques exclusifs à la formation de microbialites (Reid et al., 2000 ; Foster et al., 2009). Cependant, les eucaryotes ont peut-être bien contribué à la formation de microbialites anciens depuis leur apparition il y a environ 2 Ga (Javaux, 2007 ; Parfrey et al., 2011). En effet, la diversité des eucaryotes microbiens est plus grande qu'on ne le pense actuellement et beaucoup de ces eucaryotes peuvent avoir des fonctions cohésives et/ou calcifiantes. Par exemple, les algues associées aux stromatolites peuvent piéger les grains (Awramik et Riding, 1988) et peuvent favoriser la précipitation de carbonates via leur activité photosynthétique (Riding, 2000), ou encore les foraminifères qui peuvent stabiliser les particules (Bernhard et al., 2013).

1.2. Les processus microbiens menant à la formation des microbialites

En général, la formation des microbialites actuels est possible selon 4 mécanismes principaux (Burne et Moore, 1987) : (i) Le piégeage et l'agglomération (« trapping and binding ») de sédiments détritiques semble être un mécanisme important dans les environnements marins actuels (Riding, 1991 ; Corkeron et al., 2012). (ii) La précipitation *in situ* de minéraux authigènes sous l'influence de micro-organismes. Cela constitue un autre processus majeur, en particulier dans les microbialites lacustres actuels. Ce processus a été nommé organominéralisation par Dupraz et al. (2009) pour englober la précipitation passive sur la matière organique dans des solutions sursaturées (minéralisation biologiquement influencée, section 1.2.1) mais également la précipitation résultant de l'augmentation de la saturation de la solution par l'activité métabolique de micro-organismes (minéralisation biologiquement induite section

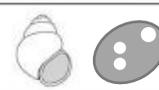
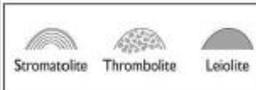
| | Organomineralization s.l. ¹ - This study | | Mineralization |
|--|--|--|--|
| Process and players | Biologically-controlled mineralization <i>Intrinsic</i> Enzymatic controlled - Active pump Biological pump Endo- or exoskeleton Organism Eukaryotes | Biologically-induced mineralization <i>Intrinsic</i> Microbial metabolisms - Diffusion Prokaryotes | Inorganic mineralization <i>Extrinsic</i> Environmentally-driven (e.g. degassing, evaporation) - Diffusion Lacking organic matter Abiotic substrate |
| Nucleation site | Genetically controlled macromolecular matrix Mineral Carbonate layer | Randomly organized matrix EPS Acidic groups (SO ₃ ⁻ , COO ⁻ , PO ₃ ⁻ , NH ₂) | Variety of nuclei |
| Nomenclature (non-exhaustive) | Biom mineralization - Biomineral (e.g., Mann 2002, Perry et al. 2007) | Organomineral (Perry et al. 2007) | Mineral |
| | Biom mineralization - Biomineral, e.g., Dove and Weiner 2003 | Organomineralization s.s. ² (Trichet and Défarge 1995) | |
| | BIOMINERAL - This study Clear morphology (specific organism) | ORGANOMINERAL - This study Difficult to determine the exact origin of the alkalinity engine responsible in the fossil record | |
| Living organisms required | YES | YES | NO |
| Level of control on precipitation | Strict Cellular activities control nucleation, growth, morphology, final location | Induced Metabolic activities induce conditions for precipitation The organic matrix influences crystal morphology and composition | Passive Passive mineralization of organic matter The organic matrix influences crystal morphology and composition |
| Products | External & Internal skeleton Intracellular CaCO ₃  | Microbialite Consists of "Organomineral" Indirect evidence of life  |  e.g. Speleotem - Stalagmite - Scalagite |
| | | <i>Macrometer scale</i> | <i>Micro to nanometer scale</i> |

Figure 2. Classification des termes et processus de minéralisation indiquant les différents types de minéralisation lorsque le vivant est impliqué (biotiques) ou non (abiotiques). Les produits (en bas) sont quelques-uns des exemples résultant de la précipitation biogénique (D'après, Dupraz et al., 2009).

1.2.2) (**fig. 2**). (iii) La précipitation *in situ* de minéraux authigènes sans aucune influence des micro-organismes (ou de leurs polymères). Ce processus est difficile à distinguer du précédent dans les environnements biotiques : on parle alors de minéralisation inorganique (**fig. 2**). (iv) Enfin, la précipitation de minéraux peut être biologiquement contrôlée par les micro-organismes eucaryotes par la formation de « squelettes internes ou externes » (Knoll, 2003 ;

Dupraz et al., 2009), mais également procaryotiques comprenant par exemple les cyanobactéries formant des CaCO₃ amorphes intracellulaires (Couradeau et al., 2012) (**fig. 2**).

Les carbonates de calcium et/ou de magnésium composent majoritairement les microbialites. Il est possible d'évaluer l'état de saturation d'une solution par rapport aux différentes phases minérales de carbonate, c'est-à-dire la capacité d'une solution à permettre ou non la précipitation de phases spécifiques carbonatées. On utilise alors l'indice de saturation (IS) vis à vis d'une phase minérale donnée. On peut définir l'IS comme le logarithme du rapport du produit d'activité ionique (IAP) sur la constante de solubilité de la phase minérale correspondante (K_s).

$$IS = \log \frac{IAP}{K_s}$$

Où dans le cas des carbonates de calcium, l'IAP s'écrit :

$$IAP = a(\text{Ca}^{2+}) \times a(\text{CO}_3^{2-})$$

Ici, les activités des ions Ca²⁺ et CO₃²⁻ sont désignées par a(Ca²⁺) et a(CO₃²⁻). Ainsi, la solution est dite sursaturée par rapport à une phase minérale lorsque l'IS est positif. Dans ce cas la précipitation de la phase minérale est thermodynamiquement possible. Cependant, il faut comprendre que la précipitation pourrait être très lente et parfois ne finalement pas avoir lieu. On peut également ajouter que plus la sursaturation est importante, plus la précipitation est rapide (Yoreo et Vekilov, 2003). Les ions CO₃²⁻ est un paramètre clé dans la précipitation des carbonates. Dans les environnements alcalins, la concentration de carbonate CO₃²⁻ et HCO₃⁻ constitue majoritairement l'alcalinité. Le moteur de l'alcalinité désigne les processus qui vont augmenter l'alcalinité. On distingue 2 sources influençant l'alcalinité. (i) Elle peut être influencée par les métabolismes microbiens. (ii) elle peut être modifiée par des facteurs externes comme l'évaporation donnant lieu à des précipitations de carbonates ou d'évaporites dans les biofilms (Warren, 2006) ; ou bien le dégazage de CO₂ qui par exemple joue un rôle majeur dans la formation des travertins thermogènes (Pentecost, 2005). L'alcalinité est alors extrinsèque car dépendante de facteurs environnementaux, la précipitation est dans ce cas biologiquement influencée (Dupraz et al., 2009).

A priori, il existe un autre paramètre important dans la précipitation des phases minérales dans un milieu biotique. En effet, les micro-organismes peuvent diminuer (ou augmenter) la barrière thermodynamique de précipitation d'une phase minérale, par la présentation (ou non) de sites de nucléation accélérant (ou décélérant) les cinétiques de précipitation (Giuffrè et al., 2013). Il n'est plus question ici de l'action des métabolismes primaires, mais plutôt de la chimie de surface des cellules et des polymères extracellulaires. On

trouve par exemple les substances polymères extracellulaires (EPS) (Linares et Huertas, 1971 ; Lèveillé et al., 2002 ; Souza-Egipsy et al., 2005 ; Bontognali et al., 2010). Les EPS englobent une grande variété de molécules organiques et sont excrétées par les micro-organismes (Decho, 1990). Les EPS peuvent se lier à des cations, ce qui entraîne une augmentation locale des concentrations d'éléments spécifiques, induisant une sursaturation et finalement une précipitation de la phase minérale (Dupraz et al., 2009 ; Bontognali et al., 2014). *A contrario*, la fixation des cations par des groupements chimiques type carboxyls dans les EPS diminue l'activité du Ca^{2+} dans la solution et par extension la saturation des carbonates de Ca. Puis, la concentration de Ca^{2+} augmente lors de l'hydrolyse des EPS qui pourrait relarguer les cations.

1.2.1. La minéralisation biologiquement induite

Le processus de précipitation minérale résultant d'interactions entre l'activité biologique et l'environnement est appelé minéralisation biologiquement induite (McConnaughey, 1989 ; Franke et Bazylinski, 2003 ; Weiner et Dove, 2003 ; **Fig. 2**). La minéralisation biologiquement induite est un type spécifique de la minéralisation produite par les micro-organismes en référence aux précipitations qui résultent exclusivement des activités métaboliques.

1.2.2. La minéralisation biologiquement influencée

La minéralisation biologiquement influencée a été introduite par Dupraz et al. (2009) et fait référence à la minéralisation passive de la matière organique (**Fig. 2**). Dans la minéralisation biologiquement influencée ce sont bien les paramètres environnementaux externes, et non les activités métaboliques, qui sont responsables de la création des conditions favorables à la précipitation des minéraux. La présence d'organismes vivants n'est donc pas requise. Cependant, la matrice organique est toutefois impliquée dans les précipitations biologiquement influencées, modifiant la morphologie des cristaux formés par le biais d'interactions entre le minéral qui se forme et la matière organique (Dupraz et al., 2009).

1.2.3. La minéralisation biologiquement contrôlée

Enfin, la minéralisation biologiquement contrôlée est un processus où la nucléation, la croissance, la morphologie, la composition et/ou la localisation d'un minéral sont dirigés par les micro-organismes via des gènes spécifiquement impliqués.

1.3. Les métabolismes microbiens favorisant et défavorisant la précipitation des carbonates

Des métabolismes primaires comme les photosynthèses oxygénique et anoxygénique ainsi que la sulfato-réduction ont été listés par Dupraz et al. (2009), pour leur capacité à augmenter le pH ou $[\text{CO}_3^{2-}]$. Gallagher et al. (2014), ont nuancé le rôle des SRB dans l'augmentation des paramètres influençant la précipitation. En effet, les SRB peuvent utiliser différents donneurs d'électrons, comme l'hydrogène, le formiate, l'acétate, le propionate, le butyrate, l'éthanol, le méthanol et le lactate (par exemple, Rabus et al., 2006). En effet, l'utilisation de l'hydrogène et du formiate comme donneurs d'électrons entraînent des augmentations spectaculaires du pH et de l'IS de la calcite. En outre, l'utilisation de l'éthanol et glycolate comme donneur d'électron montre une plus faible augmentation du pH (Gallagher et al., 2012, 2014). *A contrario*, le lactate et la matière organique (CH_2O) ne donnent que peu d'augmentation du pH (Gallagher et al., 2012, 2014). Des métabolismes ont au contraire tendance à diminuer le pH et/ou $[\text{CO}_3^{2-}]$ tels que la respiration sur l'oxygène, les métabolismes oxydant les sulfures et les fermentations, (Visscher et Stolz, 2005 ; Dupraz et al., 2009). Cependant, il est possible de trouver des bactéries sulfoxydante dans les sédiments d'eau douce et saumâtre, tels qu'*Achromatium oxaliferum* qui sont capables de former des CaCO_3 intracellulaires (Gray, 2006). Ainsi, la capacité d'un biofilm à favoriser la formation d'un microbialite résulte de l'équilibre entre les activités métaboliques favorisant à la précipitation et celles favorisant la dissolution.

1.3.1. Les métabolismes favorisant la précipitation de carbonate

La photosynthèse oxygénique est essentiellement réalisée par les bactéries autotrophes aérobies représentées par les cyanobactéries utilisant la lumière comme source d'énergie pour oxyder l'eau et réduire le gaz carbonique (CO_2) afin de synthétiser des substances organiques. La réaction de la photosynthèse couplée à celle de la précipitation de CaCO_3 s'exprime par (Dalrymple, 1964 ; Visscher et al., 1998 ; **Fig. 3**) :



Il a été suggéré que cela se produisait par la carbonatogenèse extracellulaire (par exemple Lee et al., 2004, Riding, 2006, Kamennaya et al., 2012, Bundelva et al., 2014). Ce processus peut être associé à des mécanismes de concentration du CO_2 , qui incluent un ensemble de mécanismes moléculaires contribuant à la concentration de carbone inorganique dans les cellules (Riding 2006, Jansson et Northern 2010, Jiang et al., 2013). Plus spécifiquement, les bicarbonates (HCO_3^-) sont incorporés dans des carboxysomes par la fixation à la ribulose-1,5-

bisphosphate carboxylase / oxygénase (RuBisCO) (Price et al., 2002). Les HCO_3^- sont transformés en CO_2 dans le carboxysome par des anhydrases carboniques. Cette transformation de HCO_3^- en CO_2 libère des ions hydroxyles (OH^-) qui sont compensés par l'importation de H^+ à l'intérieur de la cellule (l'effet est le même que d'exporter des OH^- (**Fig. 3**)) de sorte que le pH intracellulaire des cellules soit régulé à une valeur presque neutre (par exemple, Belkin et Boussiba, 1991, Jiang et al., 2013). L'export de OH^- augmente localement le pH extracellulaire, induisant une précipitation de CaCO_3 (Merz, 1992 ; Dupraz et al., 2009). De plus, l'importation intracellulaire de H^+ est associée à une exportation de Ca^{2+} chez certaines cyanobactéries, ce qui favorise également la précipitation de CaCO_3 extracellulaire (Waditee et al., 2004). L'activité photosynthétique des cyanobactéries n'est réalisée que le jour.

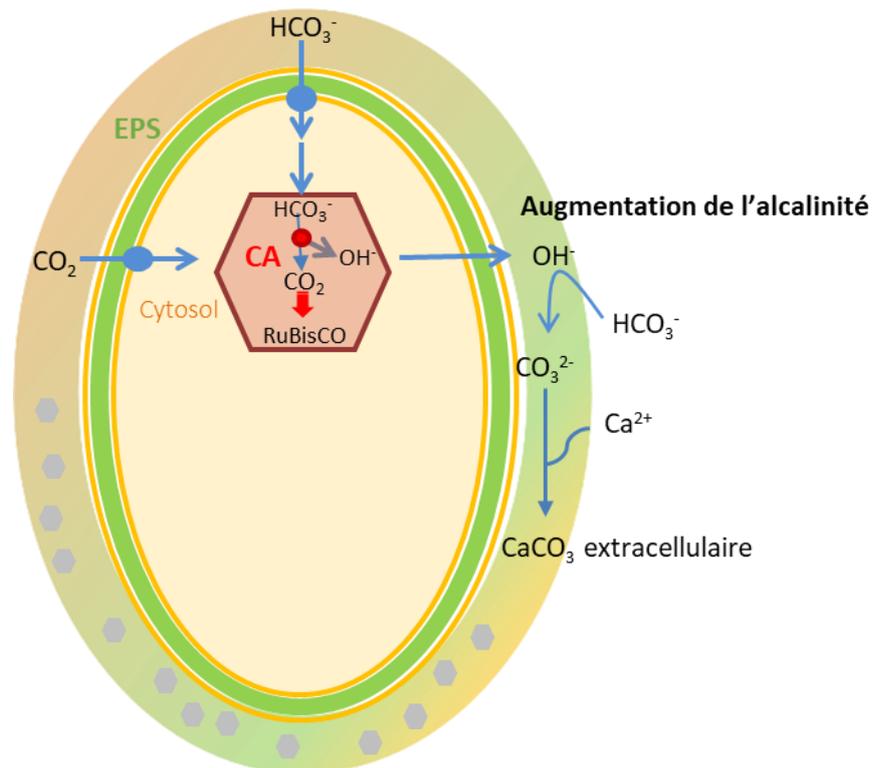
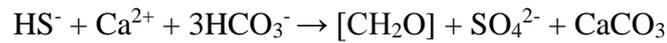


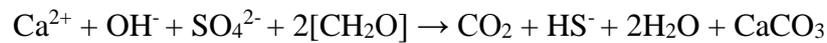
Figure 3. Modèle de précipitation des carbonates par la photosynthèse. Le CO_2 se dissout dans l'eau pour former des ions HCO_3^- . HCO_3^- est absorbé par les cellules ; dans le carboxysome qui contient la RuBisCO, l'anhydrase carbonique (CA) produit du CO_2 (utilisé pour la photosynthèse) à partir de HCO_3^- . La libération d'ions OH^- augmente l'alcalinité dans la zone environnante des cyanobactéries et induit la précipitation de CaCO_3 intracellulaire (à condition que des ions Ca^{2+} soient disponibles). Les polygones gris représentent des cristaux de CaCO_3 .

La photosynthèse anoxygénique est quant à elle réalisée par des bactéries autotrophes anaérobies. En général, ce sont les bactéries vertes ou pourpres sulfureuses qui réalisent cette photosynthèse. Elles utilisent la lumière comme source d'énergie pour oxyder le sulfure d'hydrogène (H_2S) en soufre élémentaire. L'équation bilan de ce processus couplé à celui de la précipitation de carbonate donne (**Fig. 4**) :



La précipitation de carbonate est due à la fixation de CO_2 qui entraîne un déplacement de l'équilibre vers la production d'ions carbonates. Ce mécanisme de fixation contribue sans doute faiblement à la production de carbonate dans les biofilms actuels mais il a été montré expérimentalement qu'il peut l'induire (Bosak et al., 2007). De la même manière que pour la photosynthèse oxygénique, l'effet est moins perceptible la nuit car la respiration des bactéries a un pouvoir de fermentation et de dénitrification (Dupraz et al., 2011).

La sulfato-réduction est un processus consistant en l'oxydation de la matière organique couplée à la réduction des sulfates en sulfures. Cette réaction est en particulier produite par les bactéries sulfato-réductrices (SRB) qui sont des bactéries hétérotrophes anaérobies. La réaction bilan de la sulfato-réduction peut s'écrire comme ceci (**Fig. 4**) :



La sulfato-réduction agit doublement sur la production de carbonates : tout d'abord en augmentant la $p\text{CO}_2$, puis en dégradant de petites et simples molécules organiques composant le biofilm qui potentiellement libère des ions Ca^{2+} (Visscher et al., 2000).

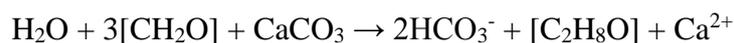
1.3.2. Les métabolismes favorisant la dissolution de carbonates

La respiration aérobie est effectuée par les bactéries chimio-organohétérotrophes qui oxydent la matière organique. Cela est couplé à la réduction de l'oxygène. L'équation bilan peut s'écrire (**Fig. 4**) :



Ces bactéries sont actives le jour et la nuit, mais le bilan total de leur activité l'emporte la nuit perceptible la nuit lorsque l'activité photosynthétique cesse (Dupraz et Visscher, 2005). À noter que par exemple des micro-organismes photosynthétiques comme les cyanobactéries respirent la nuit.

La fermentation est aussi un processus qui oxyde la matière organique. Voici l'équation de la fermentation alcoolique (d'autres réaction de fermentation sont possibles dans les biofilms, Visscher et Stolz, 2005, **Fig. 4**) :



Dans le cas de cette réaction, l'impact de la fermentation n'a que très peu d'effet sur la dissolution totale des carbonates dans un biofilm car elle entraîne la perte de 1 mole de CaCO_3 pour 3 moles de CH_2O utilisé (Visscher et Stolz, 2005).

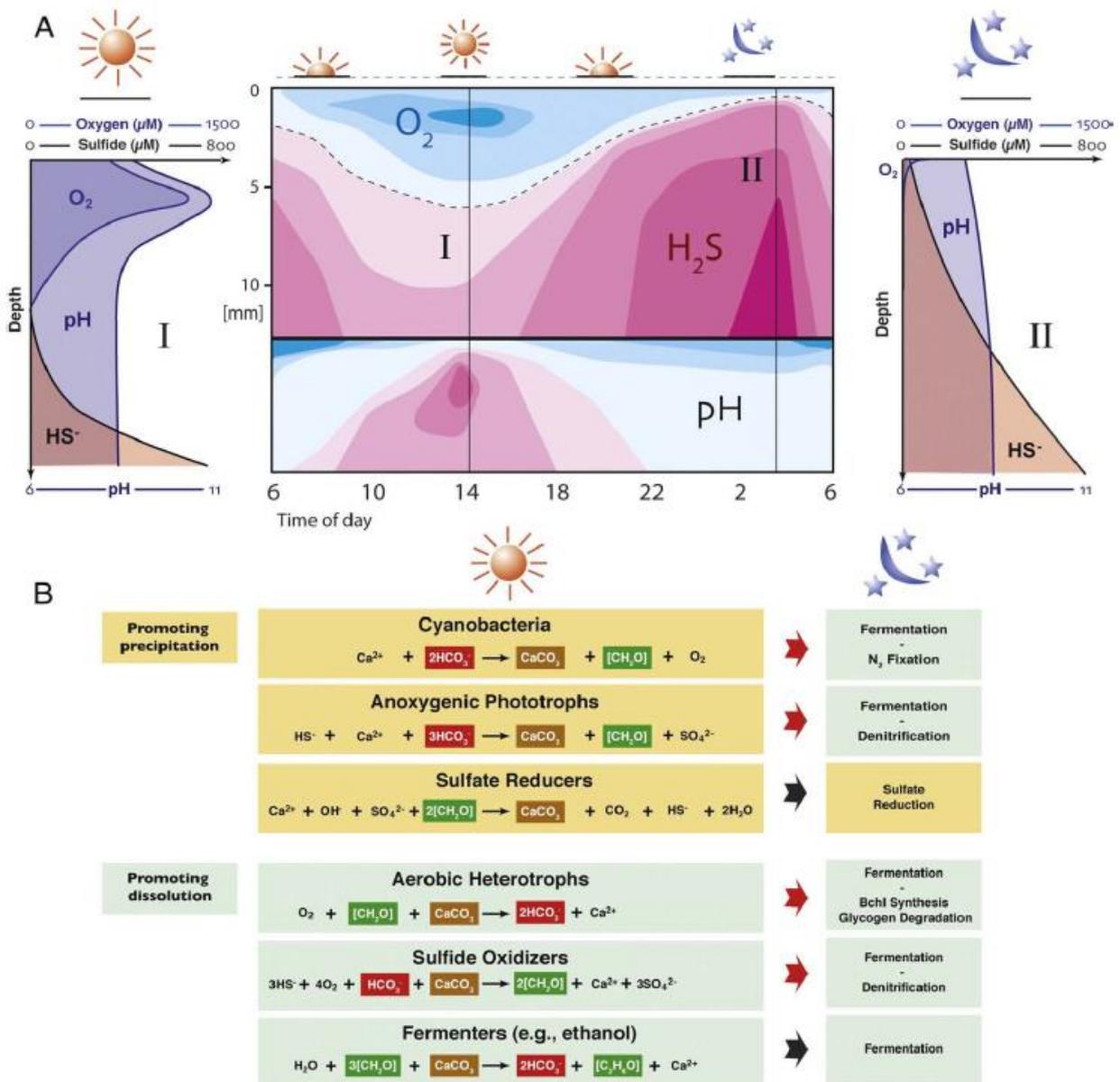
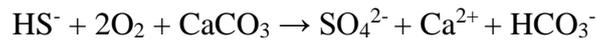


Figure 4. Fluctuations verticales journalières des gradients géochimiques dans un biofilm et réactions biogéochimiques contribuant à la précipitation ou dissolution des carbonates dans le système. (A) Profil de O_2 , HS^- et du pH dans un biofilm durant une journée de 24h (modifié d'après Visscher et al., 2002) en fonction de la profondeur du tapis. Les panneaux I et II sont des zooms du panneau central à respectivement 14 h et 3 h représentant les différences des profils jour et nuit. (B) Réactions métaboliques effectuées par les six groupes majeurs de micro-organismes qui composent un biofilm classique, organisées selon leur effet sur les processus de précipitation des carbonates. Les équations sont des combinaisons des équations métaboliques et géochimiques (d'après Visscher et Stolz, 2005). La précipitation dépend de l'équilibre entre les activités métaboliques ainsi que de la répartition dans le temps et dans l'espace des différents groupes des micro-organismes fonctionnels (Dupraz et al., 2009).

L'oxydation des sulfures est réalisée par les bactéries sulfo-oxydantes qui oxydent le sulfure (HS^-) en sulfate (SO_4^{2-}) (également d'autres sources comme les polythionates ($\text{S}_8\text{O}_6^{2-}$)) tout en fixant le dioxyde de carbone (Dupraz et al., 2009). La réaction peut s'écrire (**Fig. 4**) :



Comme dans le cas précédent, son impact sur cette dissolution est très faible (Visscher et Stolz, 2005). La précipitation des carbonates se ferait le jour essentiellement grâce à l'action des cyanobactéries réalisant la photosynthèse et pendant la nuit par le biais de la réduction des sulfates réalisée par les SRB. C'est ce que suggèrent Dupraz et al. (2009) en proposant un modèle intégrant tous les métabolismes en jeu dans la production d'un biofilm (**Fig. 4**).

1.3.3. Des micro-organismes au métabolisme photosynthétique oxygénique impliqués dans la dissolution des carbonates

Depuis quelques années, certains auteurs proposent que des micro-organismes photolithoautotrophes (cyanobactéries principalement) ont la capacité de dissoudre les carbonates de calcium des microbialites (Guida et Garcia-Pichel, 2016) ou sont susceptibles de favoriser leur dissolution (Cam et al., 2018).

Certaines cyanobactéries, appelées euendolithes, creusent et se développent dans les carbonates de calcium, leur activité entraînant une érosion des carbonates marins (Aline, 2008) et continentaux (Golubic et al., 2015) importante. Les mécanismes qui leur permettent de creuser les carbonates de calcium sont encore mal compris et paradoxaux. En effet, en tant que phototrophes oxygéniques, les cyanobactéries ont tendance à alcaliniser leur environnement, ce qui favorise la précipitation du carbonate, et non la dissolution (Garcia-Pichel, 2006). Une étude menée sur l'euendolithe filamenteux, *Mastigocoleus testarum*, a montré que l'excavation nécessiterait à la fois de l'énergie cellulaire et un transport du calcium transcellulaire, médiés par des ATPases de type P (Guida et Garcia-Pichel, 2016). L'excavation des CaCO_3 par *M. testarum* implique deux adaptations cellulaires uniques : (1) Le transport du calcium à longue distance est basé sur le pompage actif de multiples cellules le long des filaments de forage, orchestré par la localisation préférentielle des ATPases de calcium sur un pôle cellulaire. (2) *M. testarum* se différencie en cellules spécialisées appelées calcicytes. Ces cellules spécialisées accumuleraient le calcium intracellulairement à des concentrations très élevées (Guida et Garcia-Pichel, 2016). Guida et Garcia-Pichel (2016) suggèrent que les calcicytes permettent un écoulement rapide du calcium à des concentrations faibles et non toxiques à travers des cellules indifférenciées en offrant un stockage tampon pour l'excès de calcium avant l'excrétion finale vers le milieu extérieur (Guida et Garcia-Pichel, 2016).

De plus, la bioprécipitation du CaCO_3 par les cyanobactéries a traditionnellement été considérée comme un processus non contrôlé et extracellulaire (Riding, 2006). Pourtant, ce dogme a récemment été remis en question par la découverte de plusieurs espèces de

cyanobactéries collectées dans divers milieux et formant des carbonates de calcium amorphes (ACC) intracellulaires (Couradeau et al., 2012 ; Ragon et al., 2014 ; Benzerara et al., 2014) (**Fig. 5**). Les études en métagénomique sur, par exemple le lac alcalin d'Alchichica montrent que les souches produisant des CaCO₃ intracellulaires sont peu abondantes (Saghai et al., 2015) alors qu'elles sont abondantes dans les sources chaudes localisées principalement dans l'Est de l'Algérie (Amarouche-Yala et al., 2014) ou à Little Hot Creek (Californie) (Bradley et al., 2017). Cette capacité de former des inclusions d'ACC est notamment un caractère biologique partagé dans le groupe de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 dont les ACC précipitent au niveau du septum de division, se retrouvant aux pôles cellulaires une fois la cellule divisée (Benzerara et al., 2014). Fait intéressant, *Gloeomargarita lithophora*, qui forme des ACC intracellulaires, est le parent actuel le plus proche des plastes et porte des informations sur l'évolution de la photosynthèse chez les eucaryotes par l'endosymbiose d'une cyanobactérie, qui aurait eu lieu au Protérozoïque (Ponce-Toledo et al., 2017).

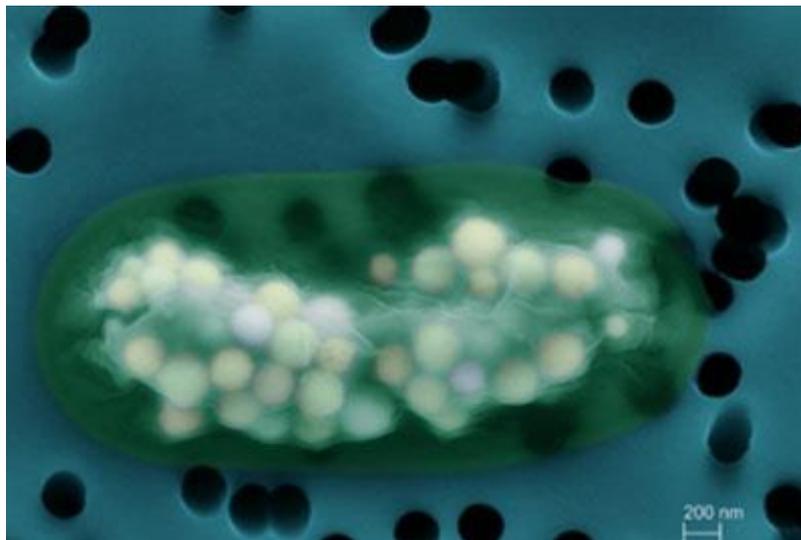


Figure 5. Image colorisée de *Gloeomargarita lithophora* obtenues en microscopie électronique à balayage. On peut les ACC à l'intérieur du cytoplasme de la cyanobactérie (Karim Benzerara et Stefan Borensztajn©).

La formation d'ACC intracellulaire dans ces cyanobactéries est surprenante. En effet, compte tenu du pH et des concentrations de HCO₃⁻ et Ca²⁺ dans le cytoplasme des cyanobactéries, tels que déterminés par des études antérieures (Badger et Andrews, 1982 ; Belkin et Boussiba, 1991 ; Barrán-Berdón et al., 2011 ; Müller et al., 2015), la précipitation n'est pas possible thermodynamiquement dans le cytoplasme (Cam *et al.*, 2015). Une manière de rendre la précipitation intracellulaire possible est d'augmenter, par exemple la concentration en calcium que ce soit dans le cytoplasme ou bien dans un compartiment intracellulaire (Cam *et al.*, 2015). Une étude récente s'est penchée sur cette question par l'analyse par microscopie

électronique à transmission de 6 souches de cyanobactéries formant des ACC intracellulaires (Blondeau et al., 2018a). Par CEMOVIS il a été mis en évidence une enveloppe dense aux électrons d'environ 2,5 nm qui a été systématiquement observée autour des granules d'ACC chez toutes les souches de cyanobactéries étudiées. Cette enveloppe peut être composée d'une enveloppe protéique ou d'une monocouche lipidique, mais pas d'une bicouche lipidique. Cette étude a donc montré que des inclusions d'ACC se sont formées et se sont stabilisées dans un microcompartiment bactérien qui n'a encore jamais été identifié chez les cyanobactéries.

Enfin, il a été montré par des cultures bactériennes que *G. lithophora* C7 incorporent préférentiellement le baryum, puis le strontium et enfin le calcium sans affecter sa croissance (Cam et al., 2016). *A contrario*, *Cyanothece* sp. PCC 7425 ne montre pas d'accumulation préférentielle de métaux alcalino-terreux plus lourds. Ainsi, le fractionnement entre métaux alcalino-terreux n'est pas inhérent aux cyanobactéries produisant des ACC, mais est probablement un trait d'origine génétique chez *G. lithophora* (Cam et al., 2016). La capacité de *G. lithophora* à incorporer fortement et séquestrer préférentiellement le Sr et le Ba à des taux élevés pourrait présenter un intérêt considérable pour la conception de nouvelles stratégies de remédiation et la compréhension des cycles géochimiques de ces éléments. En outre, il a également été proposé que la capacité à incorporer les alcalino-terreux serait un trait commun à toutes les cyanobactéries formant des ACC intracellulaire (Cam et al., 2018). Il est admis que les cyanobactéries favorisent la précipitation de CaCO_3 extracellulaire, mais ici on peut voir un paradoxe car elles appauvrissent potentiellement le milieu extracellulaire en Ca en formant des ACC intracellulaires défavorisant ainsi la formation de CaCO_3 extracellulaire.

1.4. Des silicates de magnésium hydratés, peu cristallisés et de basses températures décrites dans les microbialites

1.4.1. L'importance de l'étude des silicates

Le silicium est le deuxième élément le plus abondant de la croûte terrestre. Le cycle géochimique de la silice, est bien connu dans les environnements marins, et inclut des processus géologiques, tels que l'érosion/altération des roches silicatées et l'apport par les fluides hydrothermaux, ainsi que l'implication des organismes vivants (Ragueneau et al., 2000 ; Tréguer et De La Rocha, 2013). La silice est un élément nutritif clé dans l'océan requis pour la croissance des diatomées et quelques éponges et utilisé par les radiolaires, les silicoflagellés, plusieurs espèces de choanoflagellés et potentiellement des picocyanobactéries (Tréguer et De La Rocha, 2013). Les diatomées sont apparues au cours de l'ère secondaire. Les plus anciens

fossiles de diatomées connus datent du début du Jurassique (~185 millions d'années) (Kooistra et Medlin, 1996) bien que des analyses génétiques (Kooistra et Medlin, 1996) et sédimentaires (Schieber et al., 2000) suggèrent une origine plus ancienne. Medlin et al. (1997) suggèrent que leur origine pourrait dater de la fin du Permien (~250 millions d'années).

La silice est le constituant de nombreuses familles de minéraux. En effet, les argiles désignent une famille de minéraux silicatés regroupant une diversité de phases minérales variant d'un point de vue structurale et chimique (**Tableau 1**). Elles sont très abondantes à la surface de la Terre (Meunier et al., 2010), ont un impact crucial sur les propriétés physiques et chimiques des sols (Wilson, 1999), peuvent catalyser de nombreuses réactions chimiques et sont ainsi utilisées pour de nombreux procédés industriels (Vaccari, 1999). Enfin, leur formation a un rôle important dans les grands cycles géochimiques à la surface de la Terre (Michalopoulos et al., 1995). Ces phases silicatées ont aussi reçu une attention particulière car elles fournissent des informations précieuses sur les conditions (paléo)environnementales prévalant lors de leur formation. Elles ont ainsi aidé à reconstruire les paléoclimats sur Terre (Thiry, 2000) ou les conditions qui ont existé à la surface d'autres planètes comme Mars il y a plusieurs milliards d'années (Chevrier et al., 2007 ; Bristow et al., 2011).

Tableau 1. Présentation des types de feuillet, groupes, géométries moléculaires et des différentes espèces d'argiles.

| Type de feuillet | Groupe | Octaédrique | Espèces |
|-------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|---|
| 1:1 | serpentine kaolinite | dioctaédrique trioctaédrique | kaolinite, dickite, nacrite, halloysite antigorite, chrysolite, lizardite, berthiérine |
| | pyrophyte talc | dioctaédrique trioctaédrique | pyrophyllite talc, kérolyte |
| 2:1 non fibreux | micas | dioctaédrique trioctaédrique | muscovite, illite, glauconite biotite |
| | smectite | dioctaédrique trioctaédrique | montmorillonite, beidellite, nontronite saponite, stévensite |
| | vermiculine | trioctaédrique | vermiculite |
| 2:1 structure fibreuse | sépiolite attapulгите | trioctaédrique trioctaédrique | sépiolite attapulгите |
| | 2:1:1 | chlorite | dioctaédrique |
| trioctaédrique di-trioctaédrique | | | chinocllore, chamosite sudoite, cookéite |

De nombreuses études ont déterminé les voies de formation des argiles. Certaines se forment au cours de processus post-magmatiques, d'autres dans des fluides hydrothermaux lors de l'altération de roches silicatées (Peretyazhko *et al.*, 2016). D'autres enfin se forment par précipitation dans des solutions à température ambiante (Tosca *et al.*, 2011 ; Tosca et Materson,

2014). Millot (1964) a décrit trois processus principaux dans la genèse des minéraux argileux, qui peuvent se produire à différents moments du cycle géochimique, y compris l'altération des roches ou la formation des sols sur la surface de la Terre. Ces processus sont : (i) un héritage détritique dans lequel les minéraux argileux sont hérités de la roche parentale préexistante ou des matériaux résistant à l'altération ; (ii) la transformation pour laquelle a lieu des changements majeurs dans la région intercalaire du silicate ; et enfin (iii) la néoformation, où la phase d'argileuse se forme par la précipitation de gels ou de solutions sursaturées.

1.4.2. Des silicates de magnésiums retrouvés dans des microbialites

La formation des argiles a ainsi été et reste souvent considérée comme un processus purement abiotique. Les silicates de magnésium peu cristallisés, hydratés et de basses températures (silicates-Mg) (par exemple la stévensite, la kérolite, le talc, la sépiolite) sont de plus en plus observés dans de nombreux environnements à travers le monde, notamment au sein des microbialites actuels et anciens (Arp et al., 2003 ; Rosen et al., 2004 ; Souza-Egipsy et al., 2005 ; Benzerara et al., 2010 ; Burne et al., 2014 ; Zeyen *et al.* 2015 ; Pace et al., 2016), et ont plus fréquemment été décrits dans d'autres faciès sédimentaires tels que des sols et les sédiments de systèmes lacustres alcalins (Badaut et Risacher, 1979 ; Milesi et al., 2018), salins à hypersalins (Gac et Tardy, 1980 ; Deocampo, 2005). Ainsi, des auteurs ont proposé que des micro-organismes pourraient être impliqués dans la formation de ces phases dans les microbialites (Burne et al., 2014 ; Zeyen et al., 2015). L'étude des coupes polies de microbialites du lac alcalin mexicain d'Atexcac, en utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microanalyse par spectrométrie des rayons X en dispersion d'énergie (EDXS), a montré qu'une phase de silicate de magnésium était abondante et authigène (Zeyen et al., 2015). Cette phase minérale est similaire à la kérolite, une phase hydratée de type talc peu cristalline ($Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O$). Divers microfossiles ont été perminéralisés par cette phase de silicate. La tomographie FIB a montré que leur morphologie était préservée de manière exceptionnelle jusqu'à l'échelle nanométrique. Zeyen et al. (2015) suggèrent que la kérolite présente un fort potentiel de fossilisation des micro-organismes. De plus, la présence fréquente d'une telle phase de silicate de magnésium authigène dans les microbialites lacustres modernes appelle à une évaluation de sa présence potentielle dans les roches anciennes (Zeyen et al., 2015). Enfin, dans les microbialites actuels mexicains, la croissance des cristaux d'aragonite pourrait être liée au remplacement progressif du silicate de magnésium qui est faiblement cristallisé d'après des analyses en MET (Zeyen et al., 2015).

Des études précédentes se sont particulièrement intéressées aux conditions chimiques de formation des silicates de magnésium (Wollast et al., 1968 ; Stoessel, 1988 ; Tosca et al., 2011 ; Tosca et Masterson, 2014). Cependant, la nature des phases précipitant et les cinétiques de précipitation ne sont pas très claires. Stoessel et al. (1988) ont calculé les constantes de solubilité, à 25 °C et 1 bars, de la kérolite ($\text{Log}(K_{\text{sp}}) = 25,79$) et sépiolite cristalline ($\text{Log}(K_{\text{sp}}) = 15,76$) provenant de sédiments lacustres à Amboseli, au Kenya. On peut également lire dans la littérature l'existence d'une « sépiolite amorphe » qui a été synthétisée en condition marine à 25°C et 1 bar par Wollast et al. (1968). De la même manière une constante de solubilité pour cette « sépiolite amorphe » a pu être déterminée ($\text{Log}(K_{\text{sp}}) = 18,78$). Christ et al., (1973) ont montré que cette « sépiolite amorphe » a également une solubilité supérieure à la sépiolite cristalline à plus haute température (51°C). Il a été suggéré que cette faible cristallinité était une explication partielle à la solubilité plus grande de la « sépiolite amorphe » (Stoessel et al., 1988). Cependant, l'augmentation de la solubilité avec une cristallinité décroissante est moins significative à des températures plus élevées (Stoessel et al., 1988). Tosca et al. (2011) ont montré par des calculs thermodynamiques qu'à un pH au-dessus de 8,6 l'espèce H_4SiO_4 se déprotone favorisant l'espèce H_3SiO_4^- . Ainsi, à des pH plus élevé la concentration de complexe silice-Mg (par exemple $\text{MgH}_3\text{SiO}_4^+$) augmente. Le complexe silice-Mg permet par la suite de potentiellement former des précipités de silicate-Mg. Dans la littérature, les phases de silicate-Mg ont été observées dans les lacs d'Atexcac et La Preciosa ayant des pH supérieurs à 8,6 (Zeyen *et al.*, 2015). Cependant, on retrouve également la présence de silicates de magnésium à des pH inférieurs comme par exemple le lac de Clifton (Australie) et le grand lac salé (Utah, USA) dont le pH est similaire à celui de l'eau de mer à savoir 8,2 (Burne *et al.*, 2014 ; Pace *et al.*, 2016). Ainsi on comprend bien que le pH n'est pas le seul paramètre important dans la formation de ces phases. En compilant les différentes données géochimiques de différents lac alcalins mexicains Zeyen et al. (2017) ont proposé que la présence de ces silicates-Mg ne pouvait pas avoir lieu dans un système lacustre si la concentration en H_4SiO_4 était inférieure à 0,16 mM, permettant d'utiliser la présence de silicate-Mg comme un indicateur paléogéochimique.

Tosca et Masterson (2014) ont plus particulièrement caractérisé les facteurs chimiques contrôlant l'identité des silicates de magnésium précipitant. Ces auteurs montrent qu'à des valeurs de salinité identiques à celle de l'eau de mer (i.e., salinité de 35 psu et NaCl de 460 mM) et un rapport Mg/Si de 5-7, la stévensite précipite à de forts pH (9,4) alors que la kérolite est dominante à des pH plus bas que 8,7 ; tandis qu'à des salinités basses (inférieures à 1 mM) la kérolite domine à de forts rapports Mg/Si (5-7) et à fort pH (9,4), alors que de la sépiolite se

forme à des plus bas pH (8,7) et Mg/Si (~ 0,7). Ces expériences ont révélé l'importance de la salinité comme contrôle de la nature des silicates formés, mais surtout la complexité des paramètres chimiques intervenant dans la précipitation des silicates de magnésium et leur importance dans la détermination de leur structure.

Enfin, il a été proposé par Pace et al. (2016) un modèle conceptuel de formation des silicates de magnésium dans les microbialites et leur remplacement par les carbonates de Ca proposé par Zeyen et al. (2015) dans l'environnement hypersalin du grand lac salé (GSL) (Utah, USA) (**Fig. 6**). Le modèle de minéralisation comporte quatre étapes. (*Step 1*) Pendant la phase initiale, le biofilm se développe sur le substrat. (*Step 2*) La nucléation de la phase silicate-Mg commence à l'intérieur de la matrice organique extracellulaire. Bien entendu ceci est possible si les différents paramètres tels que $a(\text{Mg}^{2+})$, $a(\text{H}_4\text{SiO}_4)$ et le pH permettent à la solution d'être sursaturé par rapport aux silicates de magnésium. (*Step 3*) L'étape suivante montre la précipitation d'aragonite à l'intérieur des poches où a lieu la dégradation de la matrice organique extracellulaire réalisées par les micro-organismes hétérotrophes. L'aragonite perminéralise notamment la paroi des bactéries, et participe ainsi à la lithification du biofilm. (*Step 4*) La dernière étape est caractérisée par la transformation du biofilm en microbialite. La phase de silicate-Mg évolue chimiquement, le taux de Mg est plus faible que dans la deuxième étape. L'aragonite est en partie dissoute, de la dolomite précipite à l'interface de la matrice organique extracellulaire et dans les patches composés d'aragonite et de silicate-Mg. Des cations Ca^{2+} sont libérés et remis en solution par la dissolution de l'aragonite, ainsi que des cations Mg^{2+} par le changement chimique de la phase de silicate-Mg. Les cations de Ca^{2+} et Mg^{2+} libres, en excès dans la solution, vont permettre la précipitation de dolomite.

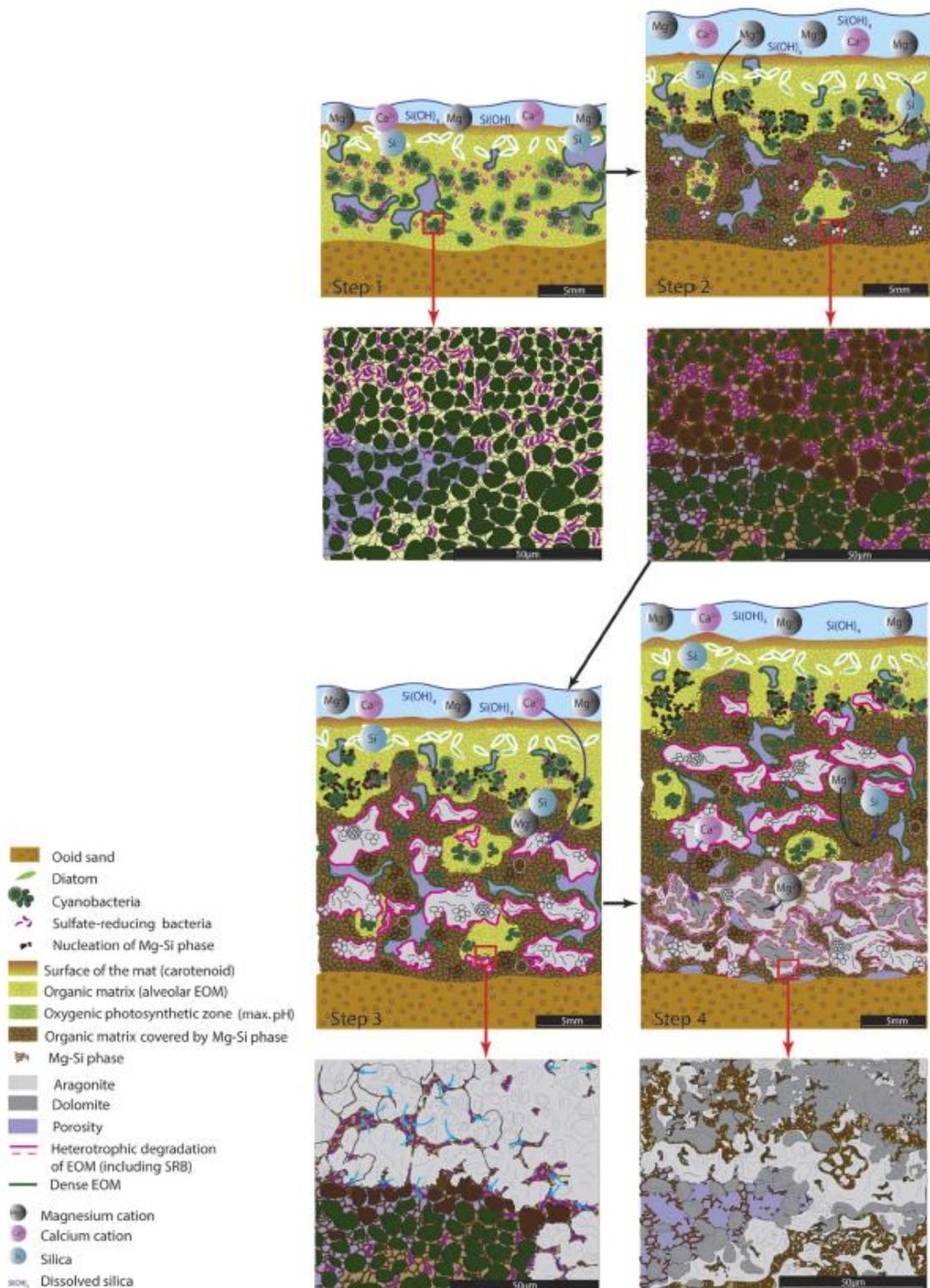


Figure 6. Modèle conceptuel de la minéralisation en microbialite dans le GSL (Pace et al., 2016). Étape 1 : Développement d'un tapis microbien sur un substrat dur. Étape 2 : nucléation de la phase silicate-Mg sur la matrice organique extracellulaire dans la zone de photosynthèse oxygénique active. Deux sources de silice peuvent être identifiées : la silice dissoute dans l'eau de lac et la silice provenant de la dissolution des frustules de diatomées dans la zone de photosynthèse maximale ($\text{pH} > 10$). Étape 3 : Dégradation de la matrice organique extracellulaire par les hétérotrophes, notamment les SRB, permettant la nucléation de l'aragonite. L'aragonite précipite d'abord au niveau des cellules mortes, puis s'étend dans la

matrice organique extracellulaire (flèches bleues). La dégradation de la matrice organique crée une zone de faible pH dans les parties les plus profondes du biofilm, induisant une dissolution partielle de l'aragonite. Étape 4 : Des poches de matrice organique extracellulaire partiellement dégradée se lient aux Mg^{2+} (de l'eau des pores et éventuellement de la phase de silicate-Mg) et aux Ca^{2+} (à partir de la dissolution de l'aragonite), conduisant à la nucléation de la dolomite à l'interface entre la matrice organique extracellulaire dégradée et des patches préalablement précipités d'aragonite/silicate-Mg.

1.4.3. Les silicates de magnésium des microbialites issus de l'activité métabolique des micro-organismes

On sait que dans les biofilms actuels, les différents micro-organismes et les métabolismes associés permettent la formation des microbialites actuels (Visscher et Stolz, 2005 ; Dupraz *et al.*, 2009 ; Saghāi *et al.*, 2015). Cependant, peu d'étude ont proposé des mécanismes impliquant des micro-organismes dans la formation des silicates de magnésium (Pace *et al.*, 2016). Il est difficile de quantifier les facteurs chimiques clés contrôlant la précipitation de silicates de magnésium. *A priori*, si l'on considère par exemple la réaction de précipitation de la kérolite :



On peut se rendre compte que les facteurs chimiques contrôlant l'état de saturation des solutions vis-à-vis de cette phase dépendent i) de l'activité des ions Mg^{2+} , ii) de l'activité de H_4SiO_4 et iii) du pH de la solution. Il est ainsi possible d'observer le champ de stabilité thermodynamique de la phase dans un diagramme de solubilité (**Fig. 7**).

Des micro-organismes pourraient induire la formation de ces phases en augmentant le pH comme le font un certain nombre de métabolismes (e.g., photosynthèse oxygénique) (Visscher et Stolz, 2005 ; Dupraz *et al.*, 2009). Ainsi, l'état de saturation du milieu serait déplacé vers le haut dans ce diagramme de solubilité (**Fig. 7**). Tosca *et al.* (2011) ont montré que les silicates-Mg se forment à des pH supérieurs ou égaux à 8,6. La déprotonation de H_4SiO_4 à pH élevé semble être « l'interrupteur » qui permet la complexation de silicate-Mg, entraînant à son tour la nucléation et la précipitation du silicate-Mg. Cependant, ces phases ont été observées dans des lacs alcalins mexicains ayant des pH supérieurs ($pH \approx 9$) (Zeyen *et al.*, 2015) et inférieurs ($pH = 8,2$) (Burne *et al.*, 2014 ; Pace *et al.*, 2016) au pH de 8,6 (Tosca *et al.*, 2011). Par conséquent, le métabolisme photosynthétique oxygénique pourrait être impliqué dans la précipitation de silicate-Mg, mais le pH ne semble pas être le seul paramètre chimique important pour la précipitation de ces minéraux. D'autre part, la $[H_4SiO_4]$ peut aussi être modulée indirectement par des micro-organismes, comme les diatomées. Une fois mortes, les frustules siliceuses pourraient se dissoudre dans des solutions sous-saturées par rapport à la

silice amorphe. De la même manière que pour le pH, cela se traduirait par un déplacement de l'état de saturation de la solution vers la droite dans un microenvironnement tel qu'un biofilm (**Fig. 7**). Le biofilm en incorporant des ions Mg^{2+} et de la silice dissoute provenant des eaux lacustres imbibant le biofilm, de la dégradation de la matrice organique par les micro-organismes hétérotrophes et potentiellement de la dissolution des frustules de diatomées permettrait de précipiter des silicates-Mg peu cristallisés et hydratés (Pace et al., 2016 ; 2018). Une autre possibilité qui ne dépendrait pas de l'état de saturation de la solution environnante, serait que les micro-organismes fournissent des surfaces qui abaissent l'énergie d'activation de la nucléation (effet template, Giuffrè *et al.*, 2013) et donc diminuent la solubilité apparente des silicates-Mg (**Fig. 7**). Ces surfaces de nucléation pourraient être la surface de cellules et/ou les substances polymériques extracellulaires (EPS) formées en abondance dans les biofilms (Léveillé *et al.*, 2002 ; Souza-Egipsy *et al.*, 2005 ; Bontognali *et al.*, 2010, 2014).

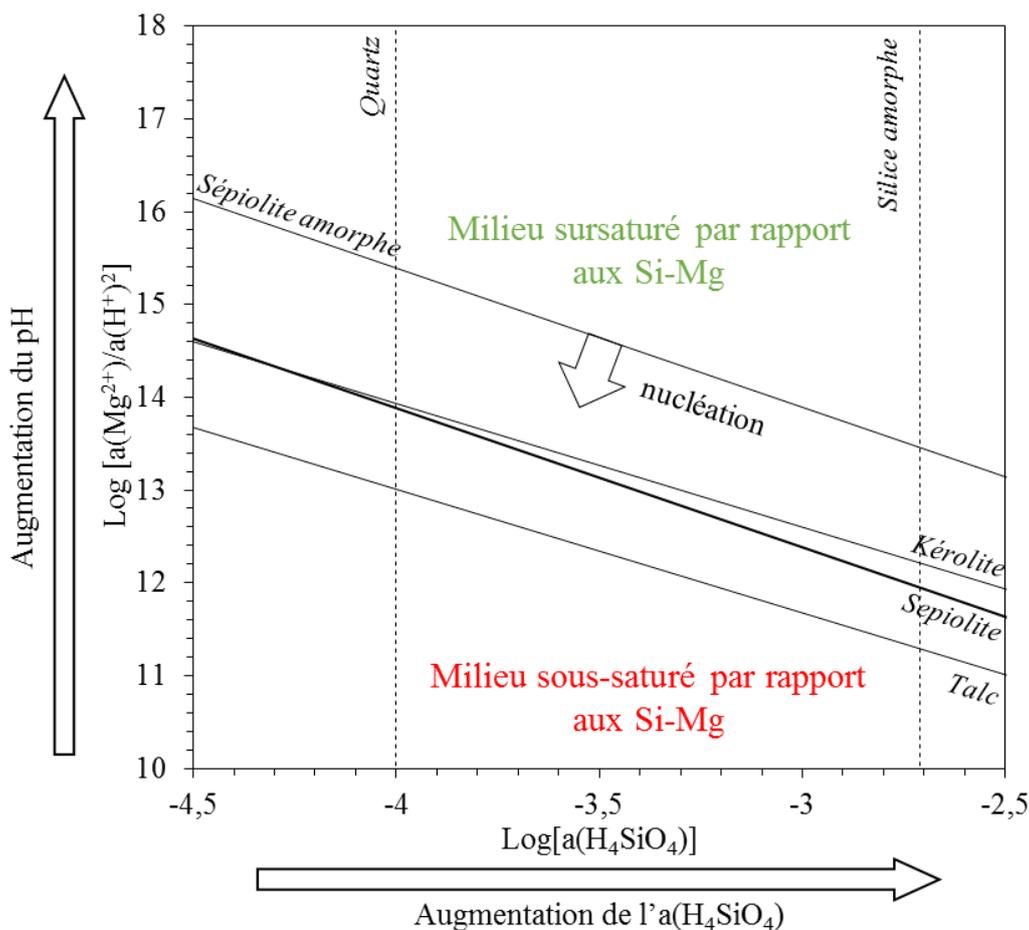


Figure 7. Diagramme de solubilité montrant les solubilités apparentes de différentes phases de silicates de magnésium. Ici, sont représentés les possibles voies d'influence sur la précipitation des silicates de magnésium que peuvent avoir les micro-organismes. Les traits pleins représentent les lignes de solubilité de la kérolite et sépiolite (Stoessel, 1988), sépiolite amorphe (Wollast *et al.*, 1968).

En effet, Bontognali et al. (2014) ont montré que l'acide succinique qui est un acide aminé produit dans les biofilms favorise la nucléation de smectite. Cependant, des observations claires montrant l'implication des EPS, de la surface cellulaire ou même de micro-organismes restent à être démontrées.

2. Objectifs et stratégies de la thèse

L'objectif central de mon travail de thèse a été de mieux comprendre les processus géochimiques et géomicrobiologiques permettant de favoriser ou au contraire de défavoriser la formation des carbonates et silicates de magnésium dans des environnements lacustres alcalins ou des conditions qui ressemblent à celles de ces environnements lacustres alcalins, mais également dans des milieux contrôlés.

Je me suis dans un premier temps intéressé à la capacité des cyanobactéries formant les carbonates de calcium amorphes intracellulaires à fortement incorporer le Ca et l'impact des alcalino-terreux sur leur croissance. Le but étant de déterminer si elles incorporaient plus de Ca que les autres cyanobactéries. Dans ce cas on pourrait imaginer que ces cyanobactéries sont un « puit » de Ca dans un biofilm et pourrait peut-être défavoriser la formation de CaCO_3 extracellulaire. J'ai étudié l'incorporation du Ca sur 52 souches de cyanobactéries formant ou non des carbonates de calcium intracellulaires amorphes et l'impact d'un milieu carencé puis additionné d'alcalino-terreux sur la croissance de certaines souches de cyanobactéries afin de répondre aux questions suivantes : *est-ce que la forte incorporation de Ca est corrélée à la présence de carbonates de calcium intracellulaires ? Quelle est l'impact du calcium et des autres alcalino-terreux sur la croissance des cyanobactéries formant des carbonates de calcium intracellulaires par rapport aux autres cyanobactéries ? Peut-on favoriser la croissance des cyanobactéries formant des ACC intracellulaires en ajoutant des alcalino-terreux ? Peut-on identifier des transporteurs potentiels de Ca dans ces souches et communs aux cyanobactéries formant des carbonates intracellulaires ?*

Dans une deuxième partie, nous nous sommes focalisés sur les silicates de magnésium hydratés, peu cristallisés et de basse température. Dans le premier axe de cette étude nous avons analysé des échantillons naturels de sédiments recueillis lors d'une mission au Mexique en 2016 dans les lacs alcalins de La Preciosa, Atexcac et Alchichica. L'objectif étant de caractériser les phases minérales, notamment les silicates de magnésium, afin d'évaluer les paramètres chimiques et biologiques permettant la formation silicates de magnésium dans les sédiments et de déterminer potentiel origines : soit ils se sont formés dans la colonne d'eau et/ou dans le sédiment. Nous avons ainsi travaillé sur ces questions suivantes : *Ces silicates sont-ils présents*

dans les sédiments ? Est-ce que la chimie des eaux porales et de la colonne d'eau module la nature du silicate de magnésium ? Sont-ils en lien avec des micro-organismes ? Quelles pourraient être les mécanismes associés à leur formation ?

Enfin le troisième axe vise à montrer la capacité des micro-organismes à former des silicates de magnésium hydratés, peu cristallisés et de basses températures en laboratoire et d'étudier la précipitation de ces phases minérales dans des aquariums du laboratoire, contenant i) des microbialites des lacs alcalins mexicains et ii) une diversité microbienne relativement importante provenant de ces lacs. Le but est de mettre en évidence des micro-organismes en lien étroit avec des phases silicatées magnésiennes. Les questions posées dans cette partie sont : *Y a-t-il des microorganismes jouant un rôle plus important que d'autres dans la formation des silicates de magnésium ? Quelle importance ont les EPS dans la nucléation des phases silicatées ? Est-ce qu'au sein des compositions chimiques variées des aquariums il y avait formation ou non des silicates de Mg ?*

Chapitre I. Forte incorporation de calcium par les cyanobactéries formant des CaCO_3 intracellulaires et impact des différents alcalino-terreux sur leur croissance

1. Intérêt de l'étude

Les cyanobactéries jouent depuis des milliards d'années un rôle important dans la formation de dépôts sédimentaires carbonatés tels que les stromatolites (Golubic et Seong-Joo, 1999 ; Altermann et al., 2006). Il a généralement été suggéré que cela se produisait par la carbonatogenèse extracellulaire (Lee et al., 2004 ; Riding, 2006 ; Kamennaya et al., 2012 ; Bundeleva et al., 2014). Ce processus peut être associé à des mécanismes de concentration de CO₂, comprenant un ensemble de mécanismes moléculaires contribuant à la concentration de carbone inorganique dans les cellules (Riding, 2006 ; Jansson et Northern, 2010 ; Jiang et al., 2013). Dans l'ensemble, la biominéralisation du CaCO₃ par les cyanobactéries a traditionnellement été considérée comme un processus non contrôlé et extracellulaire (Riding, 2006).

Cependant, ce dogme a récemment été remis en cause par la découverte de *Gloeomargarita lithophora* et de plusieurs espèces de cyanobactéries formant des carbonates de calcium amorphes intracellulaires (ACC) (Couradeau et al., 2012 ; Benzerara et al., 2014 ; Moreira et al., 2017). Ces cyanobactéries ont été trouvées dans divers environnements à travers le monde (Ragon et al., 2014). Cette capacité de formation d'ACC intracellulaire est au moins partagée dans le groupe de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 et peut être apparue il y a plusieurs centaines de millions d'années (Benzerara et al., 2014). Fait intéressant, *G. lithophora* est le parent le plus proche des plastes permettant de réaliser la photosynthèse chez les eucaryotes chlorophylliens (Ponce-Toledo et al., 2017).

Les différences dans la capacité à gérer le Ca entre les souches de cyanobactéries formant un ACC intracellulaire et les autres souches de cyanobactéries sont encore floues. Le calcium est messenger intracellulaire essentiel pour tous les eucaryotes et procaryotes (Dominguez et al., 2015). Il intervient dans de multiples processus biologiques, notamment dans la motilité, l'expression des gènes, le cycle cellulaire et les processus de différenciation cellulaire, tels que le développement d'hétérocystes chez les cyanobactéries (par exemple, Dominguez, 2004). Dans les microalgues, le calcium est également un cofacteur essentiel du complexe du photosystème II évoluant en oxygène (Debus, 1992). Le Ca peut également être substitué par le Sr²⁺ dans le photosystème II (Boussac et al., 2004). En revanche, le Ca est toxique à des concentrations cytosoliques élevées (Clapham, 2007). Dans l'ensemble, on considère actuellement que la concentration intracellulaire de Ca²⁺ dissous est régulée finement dans une gamme de concentration très faible autour d'environ 100 nM, impliquant des tampons généralement composés de protéines à forte affinité de liaison au Ca, qui peuvent libérer ou

piéger le Ca^{2+} (par exemple, Gilabert, 2012 ; Dominguez et al., 2015). L'ACC intracellulaire pourrait servir de tampon inorganique supplémentaire non négligeable pour le Ca ce qui sera discuté dans le manuscrit.

Il a été démontré chez trois cyanobactéries formant des inclusions d'ACC, une forte incorporation du Ca^{2+} dissous, alors que *Gloeocapsa* sp. PCC 73106, qui ne forme pas d'ACC intracellulaire, n'incorpore que des quantités limitées de Ca par voie intracellulaire (Cam et al., 2018). Dans cette première partie de ma thèse nous avons testé l'hypothèse émise par Cam et al. (2018) que la capacité à incorporer fortement le Ca pourrait être une spécificité des souches de cyanobactéries formant des inclusions de CaCO_3 et que les différences d'homéostasie du Ca pourraient donc expliquer pourquoi certaines cyanobactéries forment des ACC intracellulaires alors que d'autres ne le font pas. Nous avons testé cette hypothèse en sondant l'incorporation de Ca dissous chez 52 de souches de cyanobactéries, comprenant des souches de cyanobactéries formant des ACC intracellulaires et d'autres ne formant pas d'ACC intracellulaire. De plus, nous avons cherché à savoir si les cyanobactéries formant des ACC intracellulaires ont besoin de quantités plus importantes de Ca pour leur croissance. Ces expériences ont été réalisées sur 3 souches de cyanobactéries formant des inclusions d'ACC et 2 n'en produisant pas. Cette partie du manuscrit est passée par plusieurs stades de conception d'expérience. En effet, au départ nous avons voulu expérimenter le besoin en Ca sur au moins 10 souches de cyanobactéries avec 3 réplicat par conditions. Ceci étant très compliqué avec des erlenmeyers de 250 ml, habituellement utilisés, au vu du grands nombres d'échantillons nous avons utilisé des plaques avec 24 puits (2 mL de culture). Les résultats obtenus étaient extrêmement variables au sein des réplicat à cause de la durée de l'expérience (40 jours) et la forte évaporation dans le temps à cause du faible volume de culture. Nous avons utilisé des erlenmeyers de 50 mL avec des volumes de culture de 20 mL, mais encore une fois les résultats étaient très variables au sein des réplicats à cause de l'évaporation. Cependant, en réalisant les cultures avec 100 mL de culture dans un erlenmeyer de 250 mL, l'évaporation influençait moins les résultats. Enfin, nous avons recherché dans les génomes de ces cyanobactéries des gènes potentiellement partagés codant pour des protéines impliquées dans le transport du calcium.

Ce travail a conduit à l'écriture d'un manuscrit intitulé « Preuve de la forte incorporation de Ca par les cyanobactéries formant des CaCO_3 intracellulaires et impact sur leur croissance », qui a été soumis et accepté dans le journal *Geobiology*. Le rôle des ACC intracellulaires a ensuite été discuté. Je présenterai également des résultats supplémentaires non publiés de l'impact de Ba et Sr sur la croissance de souches formant des ACC intracellulaires réalisée sans réplicat. Enfin, plusieurs perspectives de travail seront présentées à la fin de ce chapitre.

2. Manuscrit

Evidence of high Ca uptake by cyanobacteria forming intracellular CaCO₃ and impact on their growth

De Wever Alexis¹, Benzerara Karim^{1*}, Coutaud Margot¹, Caumes Géraldine¹, Poinot Mélanie¹, Skouri-Panet Fériel¹, Laurent Thierry², Duprat Elodie¹, Gugger Muriel²

¹Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

²Collection des Cyanobactéries, Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France

Abstract

Several species of cyanobacteria biomineralizing intracellular amorphous calcium carbonates (ACC) were recently discovered. However, the mechanisms involved in this biomineralization process and the determinants discriminating species forming intracellular ACC from those not forming intracellular ACC, remain unknown. Recently, it was hypothesized that the intensity of Ca uptake (i.e., how much Ca was scavenged from the extracellular solution) might be a major parameter controlling the capability of a cyanobacterium to form intracellular ACC. Here, we tested this hypothesis by systematically measuring the Ca uptake by a set of 52 cyanobacterial strains cultured in the same growth medium. The results evidenced a dichotomy among cyanobacteria regarding Ca sequestration capabilities, with all strains forming intracellular ACC incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC. Moreover, Ca provided at a concentration of 50 μM in BG-11 was shown to be limiting for the growth of some of the strains forming intracellular ACC, suggesting an overlooked quantitative role of Ca for these strains. All cyanobacteria forming intracellular ACC contained at least one gene coding for a mechanosensitive channel which might be involved in Ca in-flux as well as at least one gene coding for a Ca²⁺/H⁺ exchanger and membrane proteins of the UPF0016 family which might be involved in active Ca transport either from the cytosol to the extracellular solution or the cytosol towards an intracellular compartment. Overall, massive Ca sequestration

may have an indirect role by allowing the formation of intracellular ACC. The latter may be beneficial to the growth of the cells as a storage of inorganic C and/or a buffer of intracellular pH. Moreover, high Ca scavenging by cyanobacteria biomineralizing intracellular ACC, a trait shared with endolithic cyanobacteria, suggests that these cyanobacteria should be considered as potentially significant geochemical reservoirs of Ca.

Keywords: calcium; intracellular biomineralization; cyanobacteria; ACC

1. Introduction

Cyanobacteria have played an important role in mediating the formation of carbonate sedimentary deposits such as stromatolites for billions of years (Golubic & Lee, 1999; Altermann, Kazmierczak, Oren, & Wright, 2006). It has been usually suggested that this occurs through extracellular carbonatogenesis (e.g., Lee, Apel, & Walton, 2004; Riding, 2006; Kamennaya, Ajo-Franklin, Northen, & Jansson, 2012; Bundeleva et al., 2014). This process may be associated with CO₂-concentrating mechanisms, which comprises a set of diverse molecular mechanisms contributing to the concentration of inorganic carbon within cells (Riding, 2006; Jansson & Northen, 2010; Jiang, Cheng, Gao, & Qiu, 2013). More specifically, bicarbonates (HCO₃⁻) are incorporated actively and transformed into CO₂ within carboxysomes for fixation by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Price, Maeda, Omata, & Badger, 2002). This transformation releases OH⁻ which are balanced by the import of H⁺ so that the intracellular pH of the cells keeps regulated at a near neutral value (e.g., Belkin & Boussiba, 1991; Jiang, Cheng, Gao, & Qiu, 2013). This locally raises the extracellular pH, inducing CaCO₃ precipitation (Merz, 1992). Moreover, the intracellular import of H⁺ is associated with an export of Ca²⁺ in some cyanobacteria, which also favors extracellular CaCO₃ precipitation (Waditee et al., 2004). Overall, biomineralization of CaCO₃ by cyanobacteria has been traditionally considered as a non-controlled and extracellular process (Riding, 2006).

However, this dogma has been recently challenged by the discovery of several cyanobacterial species forming intracellular amorphous calcium carbonates (ACC) (Couradeau et al., 2012; Benzerara et al., 2014). These cyanobacteria were found in diverse environments all around the world (Ragon, Benzerara, Moreira, Tavera, & Lopez-Garcia, 2014). This ACC formation capability is a synapomorphy at least in some cyanobacterial groups and may have appeared several hundred million years ago (Benzerara et al., 2014). Interestingly, *Gloeomargarita lithophora*, which forms intracellular ACC, is the closest modern relative of plastid and bears information on the evolution of photosynthesis in eukaryotes by

endosymbiosis of a cyanobacterium sometimes during the Proterozoic (Ponce-Toledo et al., 2017). Yet, the formation of intracellular ACC in these cyanobacteria is surprising. Indeed, considering the pH and the concentrations of HCO_3^- and Ca^{2+} in the cytoplasm of cyanobacterial cells (Badger & Andrews, 1982; Belkin & Boussiba, 1991; Barrán-Berdón, Rodea-Palomares, Leganes, & Fernandez-Pinas, 2011), precipitation is not thermodynamically possible (Cam, Georgelin, Jaber, Lambert, & Benzerara, 2015). Based on the size distribution and spatial location of intracellular Ca-carbonates in diverse strains, several nucleation sites have been suggested for these precipitates, including 1) carboxysomes for cyanobacteria showing ACC inclusions throughout their cells or 2) cytoskeletal proteins for cyanobacteria with ACC inclusions located at their septum and their poles (Li et al., 2016). Blondeau et al. (2018a) showed by using cryo-electron microscopy of vitreous sections, that intracellular ACC were systematically enclosed within an envelope which could be a protein shell or a lipid monolayer, suggesting that chemical conditions (e.g., Ca^{2+} concentration) within these vesicles might be different from those in the cytosol and more suitable to ACC precipitation.

However, differences in ability to manage Ca between cyanobacterial strains forming intracellular ACC and other strains of cyanobacteria are still unclear. Calcium is notoriously essential for all eukaryotes or prokaryotes as it fills multiple biological roles, including cellular signaling for cell structure maintenance, gene expression, cell cycle and cell differentiation processes, such as the development of heterocysts in cyanobacteria (e.g., Dominguez, 2004). In microalgae, Ca is also an essential co-factor of the oxygen-evolving complex of photosystem II (Debus, 1992). In contrast, Ca may be toxic at high cytosolic concentrations (Clapham, 2007). Overall, the current view is that the intracellular concentration of dissolved Ca^{2+} is regulated in a tight and very low concentration range (~100 nM), involving buffers usually composed of proteins with high Ca binding-affinities, which can release or trap Ca^{2+} (e.g., Gilabert, 2012; Dominguez et al., 2015). Intracellular ACC may serve as an additional overlooked inorganic Ca-buffer. It has been demonstrated that *Gloeomargarita lithophora* C7, *Cyanothece* sp. PCC 7425 and *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, three cyanobacteria forming ACC inclusions, strongly incorporate dissolved Ca^{2+} , whereas *Gloeocapsa* sp. PCC 73106, which does not form intracellular ACC, incorporates only limited amounts of Ca intracellularly (Cam et al., 2018). Based on these results, Cam et al. (2018) hypothesized that the ability to strongly incorporate Ca might be a specificity of cyanobacterial strains forming CaCO_3 inclusions and that differences in Ca homeostasis may therefore explain why some cyanobacteria form intracellular ACC while others do not. Here, we tested that hypothesis by surveying the uptake of dissolved Ca by a much larger set of cyanobacterial strains, including some forming intracellular ACC

and other not forming intracellular ACC. Moreover, we searched whether cyanobacteria forming intracellular ACC need higher amounts of Ca for growth. Last, we searched in the genomes of these cyanobacteria potentially shared genes coding proteins involved in Ca transport.

2. Material & Methods

2.1. Strains and culture conditions

Fifty-two cyanobacterial strains scattered throughout the phylogenetic tree of cyanobacteria (**Fig. S1**) were tested for their capability to sequester Ca (**Table S1**). Here, we will refer to strains forming intracellular ACC as ACC+ strains and strains not forming intracellular ACC as ACC- strains. Six of the ACC+ strains were previously studied: *Synechococcus* sp. PCC 6312, *Synechococcus lividus* PCC 6716 and PCC 6717, *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Chroococidiopsis thermalis* PCC 7203, and *G. lithophora* C7 (Benzerara et al., 2014). These strains were isolated from very diverse environments including mesophilic

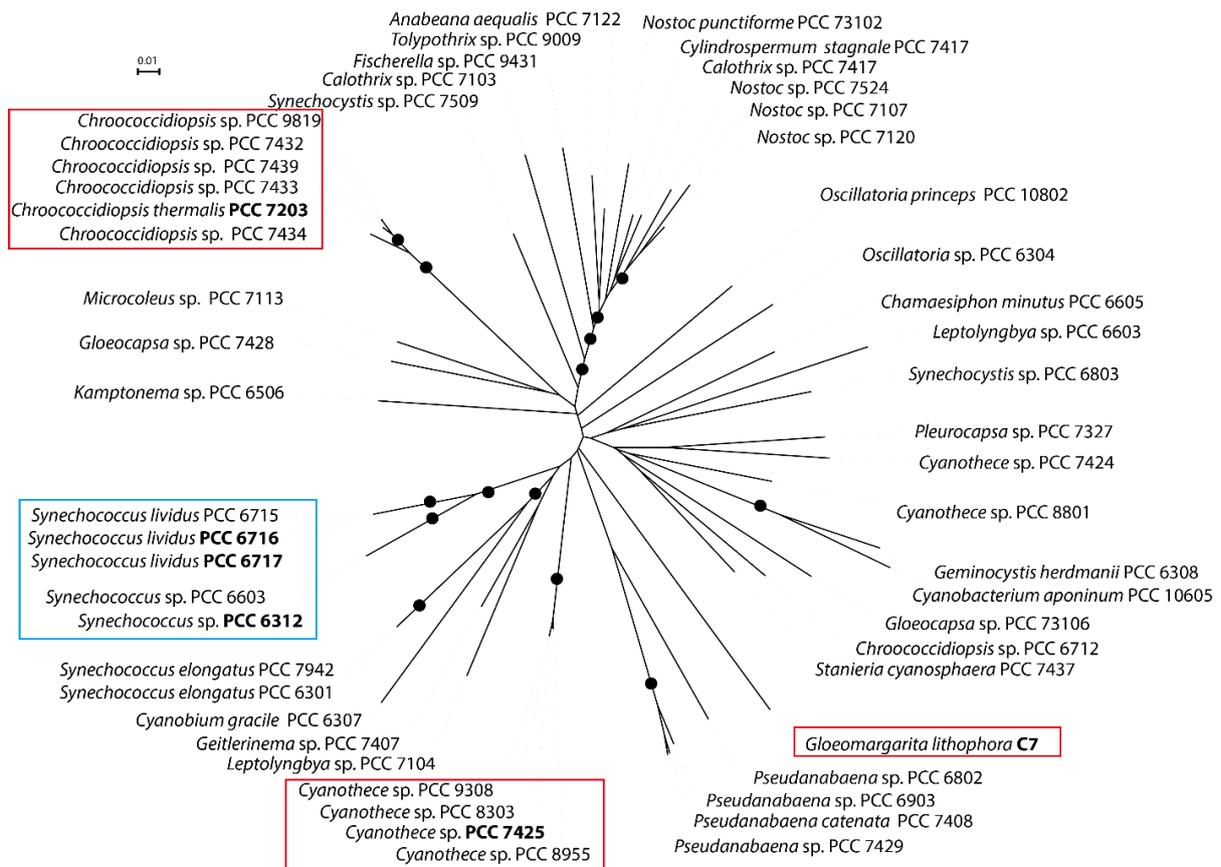


Figure S1. PhyML phylogenetic tree of the 52 tested strains based on the 16S rRNA gene. Nodes supported at 70% or more are indicated by a black dot. The ACC+ strains are outlined by a red square for granules scattered throughout the cells and a blue square for cells with granules located at cell poles and septa. The ACC+ strains described by Benzerara et al. (2014) are highlighted in bold.

alkaline lakes, hot springs at a temperature up to 53 °C and soils (Benzerara et al., 2014). Ten additional strains phylogenetically close to these ACC+ strains were tested for their capability to form intracellular ACC: *Cyanothece* sp. PCC 8303 (isolated from a thermal resort in the Vosges, France), PCC 8955 (isolated from JB Bokassa's swimming pool in Central African Republic) and PCC 9308, *Synechococcus* sp. PCC 6603 (isolated from a freshwater pond in California) and PCC 6715 (isolated from a hot spring in Yellowstone), *Chroococidiopsis* sp. PCC 7432 (isolated from a water spring in Pinar del Rio, Cuba), PCC 7433 (isolated from a dried pool in Cuba), PCC 7434 (isolated from a pool in a botanical garden in Havana, Cuba), PCC 7439 (isolated from a sand beach in Romania) and PCC 9819 (**Table S1**). Finally, 36 strains were previously shown to not form intracellular ACC (Benzerara et al., 2014). Fifty-one strains named PCC were axenic and were available from the Pasteur culture collection of cyanobacteria (PCC). *G. lithophora* was isolated from Lake Alchichica (Couradeau *et al.*, 2012) and was not axenic but co-cultured with a single alphaproteobacterium closely related to the genus *Sandarakinorhabdus* (Moreira *et al.*, 2017). All cultures were inoculated at 1/6th, starting from liquid pre-cultures in the stationary phase. They were grown to the stationary growth phase in 40 mL of liquid BG-11 (Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman, & Stanier, 1979), without agitation and under continuous light (8 $\mu\text{mol photon. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). The composition of the BG-11 medium was (in g.L⁻¹): NaNO₃: 1.5; K₂HPO₄.3H₂O: 0.04; MgSO₄.7H₂O: 0.075; CaCl₂.2H₂O:

Table S1. List of the studied cyanobacterial strains together with the main chemical data measured after their incubation in BG11.

| Strains | Species | Final dissolved [Ca] (μM) | Uptake [Ca] (μM) | Dry weight (g/L)($\pm 1\mu\text{g}$) | Final pH (± 0.01) | Incubation time (days) | Presence of intracellular ACC (yes/no) |
|----------|----------------------------------|--|-------------------------------|--|-------------------------|------------------------|--|
| C7 | <i>Gloeomargarita lithophora</i> | 6.3 \pm 0.1 | 274.3 | 0.35 | 9.50 | 60 | Yes |
| PCC 6301 | <i>Synechococcus elongatus</i> | 231.1 \pm 1.6 | 49.6 | 0.49 | 10.56 | 40 | No |
| PCC 6304 | <i>Oscillatoria</i> sp. | 209.6 \pm 1.6 | 71.0 | 0.08 | 9.73 | 40 | No |
| PCC 6306 | <i>Leptolyngbya</i> sp. | 257.2 \pm 2.0 | 23.4 | 0.44 | 10.35 | 40 | No |
| PCC 6307 | <i>Cyanobium gracile</i> | 217.5 \pm 3.7 | 63.2 | 0.20 | 9.83 | 40 | No |
| PCC 6308 | <i>Geminocystis herdmanii</i> | 229.0 \pm 1.6 | 51.7 | 0.50 | 11.07 | 40 | No |
| PCC 6312 | <i>Synechococcus</i> sp. | 29.9 \pm 0.1 | 250.8 | 0.35 | 9.92 | 60 | Yes |
| PCC 6506 | <i>Kamptonema</i> sp. | 257.3 \pm 2.0 | 23.3 | 0.63 | 10.57 | 40 | No |
| PCC 6603 | <i>Synechococcus</i> sp. | 12.7 \pm 0.1 | 268.0 | 0.26 | 10.52 | 61 | Yes |
| PCC 6605 | <i>Chamaesiphon minutus</i> | 207.3 \pm 2.0 | 73.4 | 0.54 | 9.40 | 40 | No |
| PCC 6712 | <i>Chroococidiopsis</i> sp. | 210.9 \pm 1.9 | 69.8 | 0.70 | 10.03 | 40 | No |
| PCC 6715 | <i>Synechococcus lividus</i> | 7.4 \pm 0.1 | 273.2 | 0.43 | 9.00 | 61 | Yes |
| PCC 6716 | <i>Synechococcus lividus</i> | 40.6 \pm 0.1 | 240.0 | 0.64 | 9.22 | 61 | Yes |
| PCC 6717 | <i>Synechococcus lividus</i> | 77.1 \pm 0.1 | 203.6 | 0.24 | 8.90 | 61 | Yes |
| PCC 6802 | <i>Pseudanabaena</i> sp. | 237.6 \pm 1.1 | 43.1 | 0.50 | 7.96 | 40 | No |
| PCC 6803 | <i>Synechocystis</i> sp. | 203.0 \pm 1.8 | 77.7 | 0.52 | 10.05 | 60 | No |
| PCC 6903 | <i>Pseudanabaena</i> sp. | 240.4 \pm 1.4 | 40.2 | 0.33 | 10.47 | 54 | No |

| | | | | | | | |
|-----------|------------------------------------|-------------|-------|------|-------|----|-----|
| PCC 7103 | <i>Calothrix</i> sp. | 219.9 ± 3.3 | 60.8 | 0.88 | 10.42 | 47 | No |
| PCC 7104 | <i>Leptolyngbya</i> sp. | 232.1 ± 3.4 | 48.6 | 1.03 | 10.70 | 40 | No |
| PCC 7107 | <i>Nostoc</i> sp. | 240.0 ± 3.6 | 40.6 | 0.42 | 10.17 | 47 | No |
| PCC 7113 | <i>Microcoleus</i> sp. | 267.2 ± 3.2 | 13.5 | 0.68 | 9.36 | 47 | No |
| PCC 7120 | <i>Nostoc</i> sp. | 240.4 ± 2.9 | 40.3 | 0.41 | 9.71 | 47 | No |
| PCC 7122 | <i>Anabaena aequalis</i> | 250.7 ± 2.6 | 29.9 | 0.40 | 9.14 | 54 | No |
| PCC 7203 | <i>Chroococcidiopsis thermalis</i> | 112.5 ± 0.7 | 168.2 | 1.03 | 9.99 | 61 | Yes |
| PCC 7327 | <i>Pleurocapsa</i> sp. | 249.5 ± 1.9 | 31.2 | 0.39 | 9.21 | 54 | No |
| PCC 7407 | <i>Geitlerinema</i> sp. | 245.3 ± 1.7 | 35.3 | 0.09 | 8.95 | 54 | No |
| PCC 7408 | <i>Pseudanabaena catenata</i> | 297.8 ± 0.7 | 0.0 | 1.19 | 10.04 | 54 | No |
| PCC 7417 | <i>Cylindrospermum stagnale</i> | 250.5 ± 1.0 | 30.1 | 1.26 | 9.71 | 40 | No |
| PCC 7424 | <i>Cyanothece</i> sp. | 214.6 ± 1.3 | 66.0 | 0.56 | 9.77 | 54 | No |
| PCC 7425 | <i>Cyanothece</i> sp. | 28.1 ± 0.1 | 252.6 | 0.57 | 9.37 | 60 | Yes |
| PCC 7428 | <i>Gloeocapsa</i> sp. | 173.4 ± 0.8 | 107.2 | 0.52 | 9.48 | 54 | No |
| PCC 7429 | <i>Pseudanabaena</i> sp. | 241.4 ± 1.7 | 39.2 | 0.30 | 10.07 | 54 | No |
| PCC 7432 | <i>Chroococcidiopsis</i> sp. | 42.6 ± 0.1 | 238.1 | 1.08 | 10.25 | 61 | Yes |
| PCC 7433 | <i>Chroococcidiopsis</i> sp. | 59.3 ± 0.3 | 221.4 | 0.80 | 10.25 | 61 | Yes |
| PCC 7434 | <i>Chroococcidiopsis</i> sp. | 50.4 ± 0.2 | 230.2 | 0.74 | 10.2 | 61 | Yes |
| PCC 7437 | <i>Stanieria cyanosphaera</i> | 239.5 ± 1.3 | 41.2 | 0.82 | 9.51 | 54 | No |
| PCC 7439 | <i>Chroococcidiopsis</i> sp. | 106.3 ± 0.8 | 174.3 | 0.63 | 9.95 | 61 | Yes |
| PCC 7507 | <i>Calothrix</i> | 270.5 ± 5.0 | 10.1 | 1.17 | 9.99 | 54 | No |
| PCC 7509 | <i>Synechocystis</i> sp. | 261.0 ± 1.4 | 19.6 | 0.36 | 9.92 | 54 | No |
| PCC 7524 | <i>Nostoc</i> sp. | 227.0 ± 0.7 | 53.6 | 0.72 | 9.41 | 40 | No |
| PCC 7942 | <i>Synechococcus elongatus</i> | 305.9 ± 1.0 | 0.0 | 0.67 | 9.83 | 40 | No |
| PCC 8303 | <i>Cyanothece</i> sp. | 116.1 ± 0.8 | 164.5 | 0.39 | 10.7 | 61 | Yes |
| PCC 8801 | <i>Cyanothece</i> sp. | 264.7 ± 0.9 | 15.9 | 0.40 | 9.79 | 47 | No |
| PCC 8955 | <i>Cyanothece</i> sp. | 61.0 ± 0.2 | 219.7 | 0.39 | 8.73 | 61 | Yes |
| PCC 9009 | <i>Tolypothrix</i> sp. | 253.9 ± 2.0 | 26.7 | 0.26 | 10.14 | 47 | No |
| PCC 9308 | <i>Cyanothece</i> sp. | 12.6 ± 0.1 | 268.0 | 0.29 | 8.74 | 61 | Yes |
| PCC 9431 | <i>Fischerella</i> sp. | 233.9 ± 0.6 | 46.8 | 1.19 | 9.01 | 47 | No |
| PCC 9819 | <i>Chroococcidiopsis</i> sp. | 39.7 ± 0.1 | 240.9 | 1.16 | 9.35 | 61 | Yes |
| PCC 10605 | <i>Cyanobacterium aponinum</i> | 252.5 ± 1.8 | 28.2 | 0.43 | 9.48 | 47 | No |
| PCC 10802 | <i>Oscillatoria princeps</i> | 254.2 ± 2.2 | 26.5 | 4.24 | 10.08 | 47 | No |
| PCC 73102 | <i>Nostoc punctiforme</i> | 263.4 ± 0.6 | 17.2 | 0.34 | 9.59 | 47 | No |
| PCC 73106 | <i>Gloeocapsa</i> sp. | 256.7 ± 2.1 | 24.0 | 0.20 | 8.88 | 47 | No |

0.036; citric acid: 0.006; ferric ammonium citrate: 0.006; EDTA (disodium magnesium salt): 0.001; Na₂CO₃: 0.02; trace metal mix A5 + Co: 1 ml.L⁻¹; vitamin B12: 10 pg. L⁻¹. Trace metal mix A5+Co contained (in g.L⁻¹): H₃BO₃: 2.86; MnCl₂.4H₂O: 1.81; ZnSO₄.7H₂O: 0.222; Na₂MoO₄.2H₂O: 0.390; CuSO₄.5H₂O: 0,0.079; Co(NO₃)₂.6H₂O: 0.0494. Most cultures were grown at 22 °C except *Cyanobacterium aponinum* PCC 10605, grown at 25 °C, and the thermophilic strains such as *Synechococcus lividus* PCC 6716 and PCC 6717 as well as *Fischerella* sp. PCC 9431, which were grown at 37 °C.

In parallel to the survey of Ca uptake by these 52 cyanobacterial strains, the growth of 3 planktonic ACC+ strains (*G. lithophora* C7, *Cyanothece* sp. PCC 7425 and *Synechococcus* sp. PCC 6312) and 2 planktonic ACC- strains (*Synechococcus elongatus* PCC 7942 and

Synechocystis sp. PCC 6803) were monitored in duplicates with a higher temporal precision at two different Ca^{2+} initial concentrations: 50 μM and 250 μM . Both concentrations are environmentally relevant and typical of Ca concentrations encountered in alkaline/soda lakes such as Lake Alchichica, where *G. lithophora* was first found (e.g., Zeyen et al., 2019; Boros and Kolpakova, 2018). The standard Ca concentration in BG-11 is 250 μM . The concentration of 50 μM corresponds to the standard Ca concentration in BG-11 divided by 5 and allows to keep a concentration high enough so that it can be simply monitored over time.

Cultures were grown at 30°C, under continuous light (5 - 10 $\mu\text{mol photon. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) and continuous agitation (120 rpm) for all strains, except *G. lithophora* C7 which was grown under lower light intensity (2.5 - 5 $\mu\text{mol photon. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$). In one experiment, cultures of these 5 strains grown at an initial Ca concentration of 50 μM were split in half after 22 days of cultures. Calcium was subsequently added to half of these subcultures at a concentration of 200 μM to complement the initial deficit of Ca compared to the 250 μM of Ca in standard BG-11. No Ca was added to the other half of the cultures.

2.2. Growth measurements

For comparison of Ca uptake by the fifty-two strains, growth was assessed by dry weight measurements since some of the strains tended to form aggregates and could not be simply numbered by optical density (OD) measurements. For this purpose, 200 μL of cultures were deposited on 0.22 μm GTTP filters (Millipore) weighed beforehand using an XP6 ultra microbalance (Mettler-Toledo). The GTTP filters were weighed after one week of drying at 45°C. The difference between the weight before and after filtering of the cultures provided the mass of dry matter in g.L^{-1} . Measured cell masses in 200 μL of culture amounted between 18 and 848 μg depending on the strains. The precision on this measurement was 1 μg . Cell growth of the five planktonic strains cultured with 50 and 250 μM of Ca was compared by measuring optical density at 730 nm (OD_{730}) every 2 to 3 days. The instrumental precision on OD measurements was 0.005.

2.3. Chemical analyses

The concentration of dissolved Ca and the pH of the cultures were systematically measured at the stationary phase for all fifty-two strains. Solution pH was measured on 0.5 μL of non-filtered culture samples using a combined pH microelectrode (Fisherbrand). The accuracy of pH measurements was estimated at ~ 0.01 units. The dissolved Ca concentrations were measured by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES), using

a Thermo Scientific iCAP 6200 ICP emission spectrometer. For this purpose, cultures were filtered at 0.22 μm . Depending on samples, from 200 to 400 μL of the filtrate were diluted in 10 mL of 2% HNO_3 . Three measurements were performed for each sample. The 2% HNO_3 solution was analyzed as a control to assess the contamination of the HNO_3 reagent by Ca^{2+} . The Ca contamination was always lower than 6 ppb.

2.4. Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy analyses were performed on the ten PCC strains not tested before for their capability to form intracellular ACC. Moreover, six ACC⁻ strains were analyzed to determine the chemical composition of their polyPhosphate granules. For these analyses, 0.5 mL of the cultures were centrifuged at 5000 g for 10 min. The cell pellets were washed three times with milli-Q water and resuspended in 0.5 mL of milliQ water for analysis by scanning transmission electron microscopy (STEM). Washing was necessary to avoid the precipitation of salts upon drying but did not alter intracellular ACC as shown by Blondeau et al. (2018b). After washing, 3 μL of the cell suspensions were deposited on 200 mesh FormvarTM carbon coated copper grids and dried at room temperature. The grids were made hydrophilic beforehand by glow discharge, i.e. exposition for 30 s to an Ar^+ plasma. STEM analyses were performed using a JEOL 2100F microscope equipped with a field emission gun and operating at 200 kV. STEM images were acquired in the high angle annular dark field (HAADF) mode with a probe size of 0.7 to 1 nm. Elemental mapping was performed based on energy dispersive x-ray spectrometry (EDXS) analyses using the JEOL Analysis Station software. Semi-quantitative analyses of EDXS spectra were processed to assess the Ca/Mg ratios of the polyPhosphate in the cells following the procedure by Li et al. (2016) based on the use of K factors which provide the relationship between peak intensity and the element quantity. The hypothesis that Ca/Mg ratios of the polyPhosphate granules were significantly different between ten ACC⁺ strains (number of polyPhosphate granules, n=136) and six ACC⁻ strains (n=133) was tested by a statistical non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney procedure, which does not require the assumption of normal distributions. This analysis was performed using the software R version 3.2.0 (Team, 2013).

2.5. Search of Ca-related transport genes in the genomes of cyanobacteria forming intracellular ACC

Several families of Ca-related transport proteins have been described in the literature. Three hundred and thirty-nine reference sequences of known proteins involved in Ca transport

were retrieved from the transporter classification database (TCDB, Saier et al., 2015) by using the substrate search tool (with Ca as requested substrate). Their homologs were searched in all the available genomes of cyanobacteria forming intracellular ACC (**Table 1**) by BLAST with an e-value threshold of 1e-05, resulting in 4280 sequences. Each sequence was further searched for similarity with known domain profiles using CD-search (Marchler-Bauer et al., 2016; CDD database, version 3.6). The best specific hit (according to the hit classification provided by CD-search) was kept to validate the functional annotation of the sequences and their specific implication in Ca transport. As the genomes of PCC 6716 and PCC 6717 have not been structurally annotated yet, their genomic sequences were explored using tBLASTn in order to search for homologs of the Ca-related proteins previously found in the five other genomes. The hits were further validated with CD-search. Transport proteins shared by ACC+ strains were also searched in the available genomes of ACC- strains.

2.6. Phylogenetic analyses

The 16S rRNA gene sequences were retrieved from genomes and aligned using CLUSTAL_W (Thompson, Higgins, & Gibson, 1997). One thousand four hundred and fifteen conserved positions in the sequences were considered in order to compute a phylogenetic tree using PHYML (Guindon et al., 2003) and applying the Gamma Time Reversible model. One hundred bootstrap replicates were performed to assess the statistical support of each node and the ones with a value greater than 70% were kept. The sequences were retrieved from GenBank under the accession numbers MK484706 to MK484714.

3. Results

3.1. Assessing the capability of cyanobacterial strains to form intracellular ACC

Among the fifty-two cyanobacterial strains studied here, six strains (*Synechococcus* sp. PCC 6312, PCC 6716 and PCC 6717, *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Chroococcidiopsis* sp. PCC 7203, and *G. lithophora* C7) were already known to form intracellular ACC (Benzerara *et al.*, 2014). Additionally, ten strains phylogenetically close to some of these ACC+ strains were tested for their capability to form intracellular ACC (**Table S1**): *Cyanothece* sp. PCC 8303, PCC 8905 and PCC 9308 were close relatives of *Cyanothece* sp. PCC 7425; *Synechococcus lividus* PCC 6715 and *Synechococcus* sp. PCC 6603 were close relatives of *S. lividus* PCC 6716 and PCC 6717 and *Synechococcus* sp. PCC 6312, respectively; *Chroococcidiopsis* sp. PCC 7432, PCC 7433, PCC 7434, PCC 7439 and PCC 9819 were close relatives of *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 (**Fig. S1**).

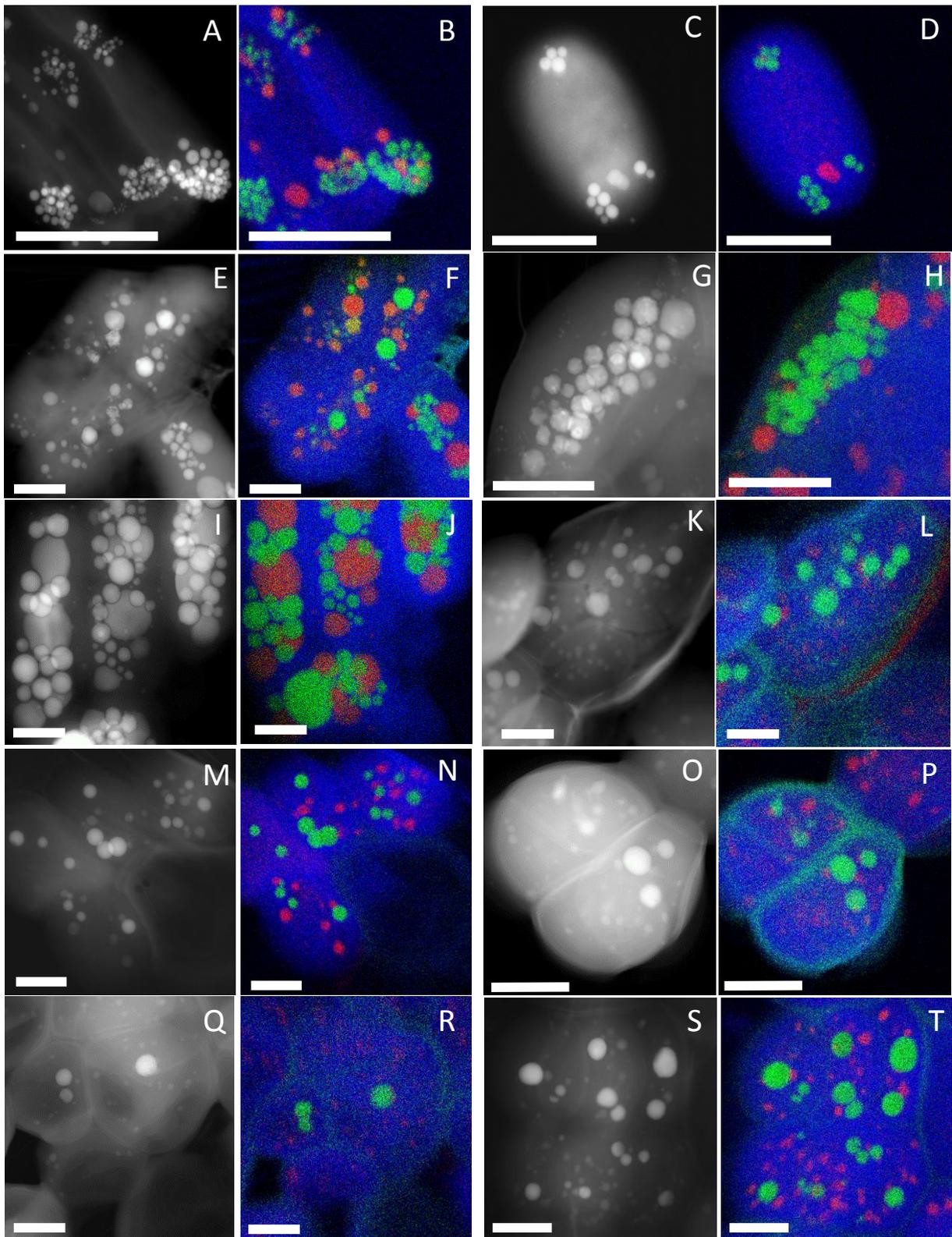


Figure 1. STEM HAADF-EDXS analyses of the 10 strains tested for their capability to form intracellular ACC. (A) and (B): STEM-HAADF image and EDXS map of *Synechococcus* sp. PCC 6715. (C) and (D): *Synechococcus* sp. PCC 6603. (E) and (F): *Cyanothece* sp. PCC 8303. (G) and (H) *Cyanothece* sp. PCC 8955. (I) and (J) *Cyanothece* sp. PCC 9308. (K) and (L) *Chroococcidiopsis* sp. PCC 7432. (M) and (N) *Chroococcidiopsis* sp. PCC 7433. (O) and (P) *Chroococcidiopsis* sp. PCC 7434. (Q) and (R) *Chroococcidiopsis* sp. PCC 7439. (S) and (T) *Chroococcidiopsis* sp. PCC 9819. For all EDXS maps, calcium is in green, phosphorus in red

and carbon in blue. As a result, Ca-carbonates appear in green and PolyP granules in red. All scale bars represent 2 μm .

STEM-EDXS analyses showed that these ten strains were also capable to form intracellular ACC in BG-11 (**Fig. 1**). Cells of *Synechococcus* sp. PCC 6715 and PCC 6603 showed ACC inclusions mostly located at their poles as in *Synechococcus* sp. PCC 6312 and *S. lividus* PCC 6716 and 6717. In contrast, the cells of all other ACC+ strains showed inclusions scattered throughout the cells similarly to *Cyanothece thermalis* PCC 7425 and *Chroococciopsis* sp. PCC 7203. Overall, among the 52 analyzed strains, 16 strains formed intracellular ACC, while 36 did not form intracellular ACC.

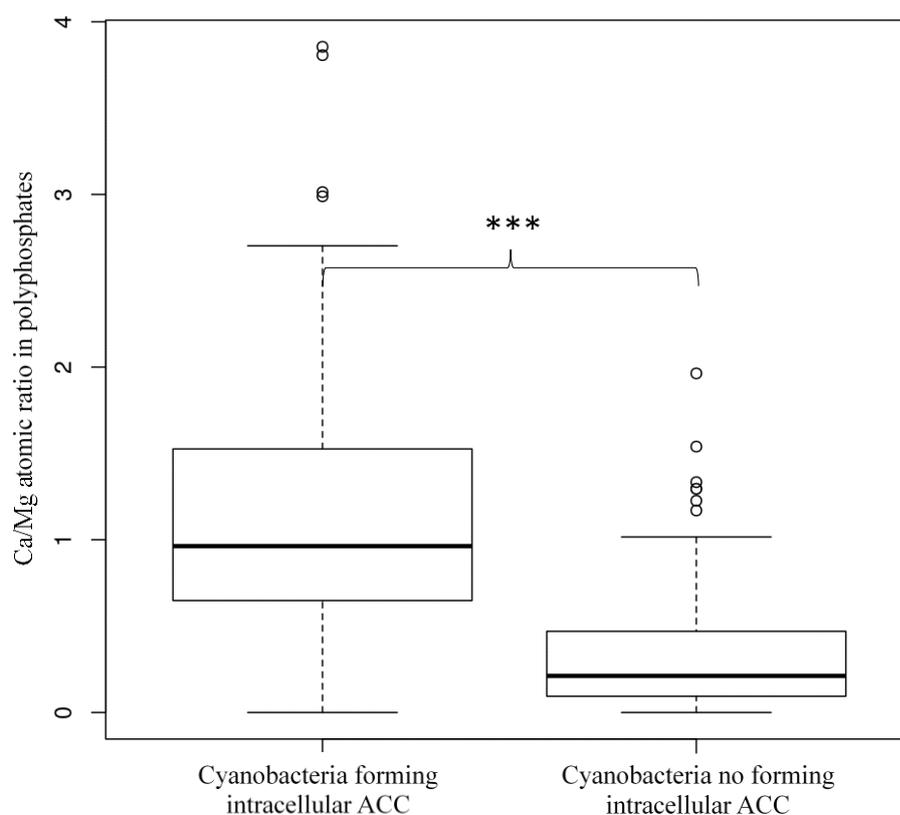


Figure 2. Ca/Mg atomic ratio of polyphosphates in strains forming intracellular ACC (left) vs. strains not forming intracellular ACC (right). The dataset includes the Ca/Mg ratios of 136 polyphosphates from ten strains forming intracellular ACC and 133 polyphosphates from six strains not forming intracellular ACC. The Ca/Mg values of the polyphosphates were calculated based on STEM-EDX analyses. The bold lines indicate the median values; the boxes span the second and third quartiles; the vertical dashed lines span 1.5 times the extent of the boxes. Open circles are outliers. The Wilcoxon-Mann-Whitney statistical analysis shows that the difference between the two groups is significant *** $p < 0.001$.

As evidenced by EDXS maps, Ca was mostly contained in intracellular ACC inclusions for these ten strains similarly to their ACC+ relatives. Some Ca was also detected by STEM-EDXS in association with the polyPhosphate granules in these strains, which mostly contained Mg as a counter-cation (**Fig. 2** and **Fig. S2**). Interestingly, some Ca was also detected in the polyPhosphate inclusions of some of the six strains not forming intracellular CaCO₃ that were analyzed in this study (*Gloeocapsa* sp. PCC 7428, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Oscillatoria* sp. PCC 6304, *Cyanobium gracile* PCC 6307, *Synechococcus* sp. PCC 6301, *Leptolyngbya* sp.

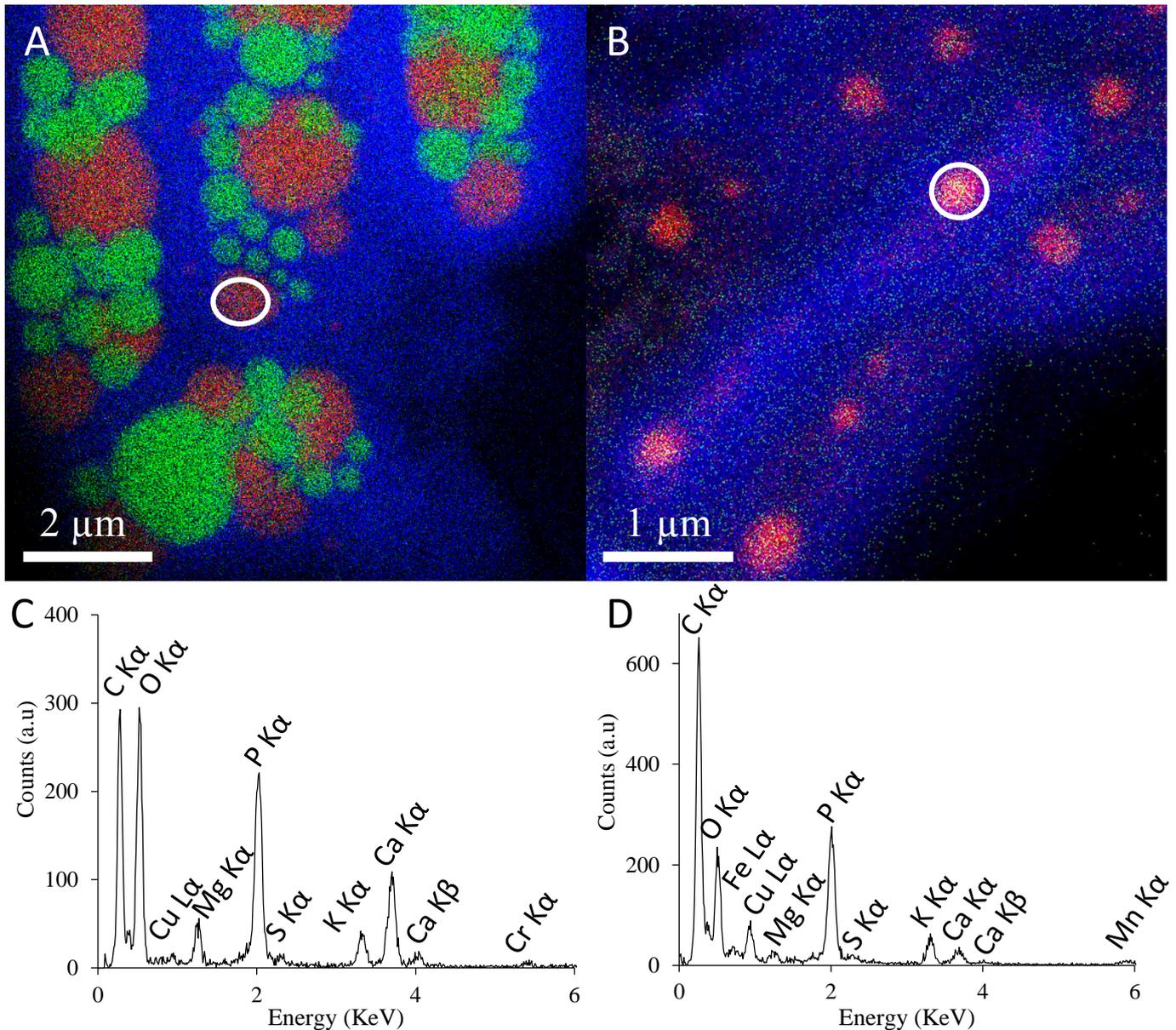


Figure S2. STEM-EDXS analyses of the ACC+ *Cyanothecae* sp. PCC 9308 and the ACC-*Synechococcus elongatus* PCC 6301 strains grown in BG-11. (A) STEM-EDXS map of a cell of *Cyanothecae* sp. PCC 9308. (B) STEM-EDXS map of a cell of *Synechococcus elongatus* PCC 6301. (C) EDXS spectrum of the PolyP inclusion of *Cyanothecae* sp. PCC 9308 outlined by a white circle in (A). (D) EDXS spectrum of the PolyP inclusion of *Synechococcus elongatus* PCC 6301 outlined by a white circle in (B). For all EDXS maps, calcium is in green, phosphorus in red and carbon in blue. As a result, Ca-carbonates appear in green and PolyP granules in red.

PCC 7104). Based on a Wilcoxon-Mann-Whitney statistical analysis, the Ca/Mg ratio of polyphosphates was shown to be significantly higher in ACC⁺ strains than in ACC⁻ strains (**Fig. 2**). In one ACC⁻ strain, *Gloeocapsa* sp. PCC 7428, STEM observations showed that a significant amount of Ca was localized on/in the cell wall of the cells, in association with K, Mg and S (**Fig. S3**).

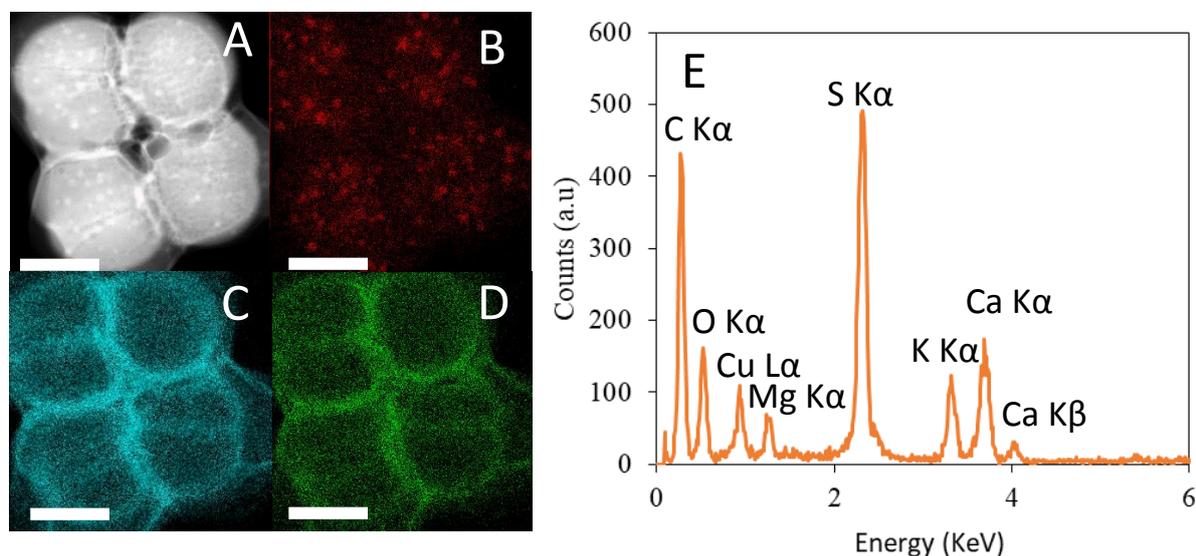


Figure S3. STEM analyses of *Gloeocapsa* sp. PCC 7428 cells grown in BG-11. (A) STEM-HAADF image. (B) STEM-EDXS maps of phosphorus. (C) STEM-EDXS map of sulfur. (D) STEM-EDXS map of calcium. (E) EDXS spectrum of the cell wall of the cells. The scale bar represents 2 μm .

3.2. Assessment of the Ca uptake by the 52 cyanobacterial strains

The 52 cyanobacterial strains analyzed in this study were cultured in the same BG-11 medium (**Table S1**). The initial concentration of dissolved Ca^{2+} was measured at 281 μM (± 6). The final concentration of dissolved Ca^{2+} was measured after 40 to 61 days of incubation depending on the strains. This final concentration widely varied between strains (**Fig. 3**). Many strains (36 out of 52) showed little to no Ca uptake, i.e. less than 22% of the initial Ca stock available in the solution. *Gloeocapsa* sp. PCC 7428 showed an intermediate uptake of $\sim 38\%$ of the initial Ca^{2+} concentration. Sixteen strains showed a high Ca uptake, i.e. higher than 58% of the initial Ca stock and up to $\sim 98\%$ for *G. lithophora* C7. The very high Ca uptake correlated with the capability of the strain to form intracellular ACC: all 16 ACC⁺ strains showed a Ca uptake higher than ACC⁻ strains (**Fig. 3**). Significance of this difference was supported by a Wilcoxon-Mann-Whitney statistical analysis with $p < 0.001$.

Since parameters other than the capability of the cells to form intracellular ACC such as pH, the final dry mass and incubation duration may *a priori* impact the observed variability of Ca uptake, we tested potential correlations between Ca uptake and these parameters. While the

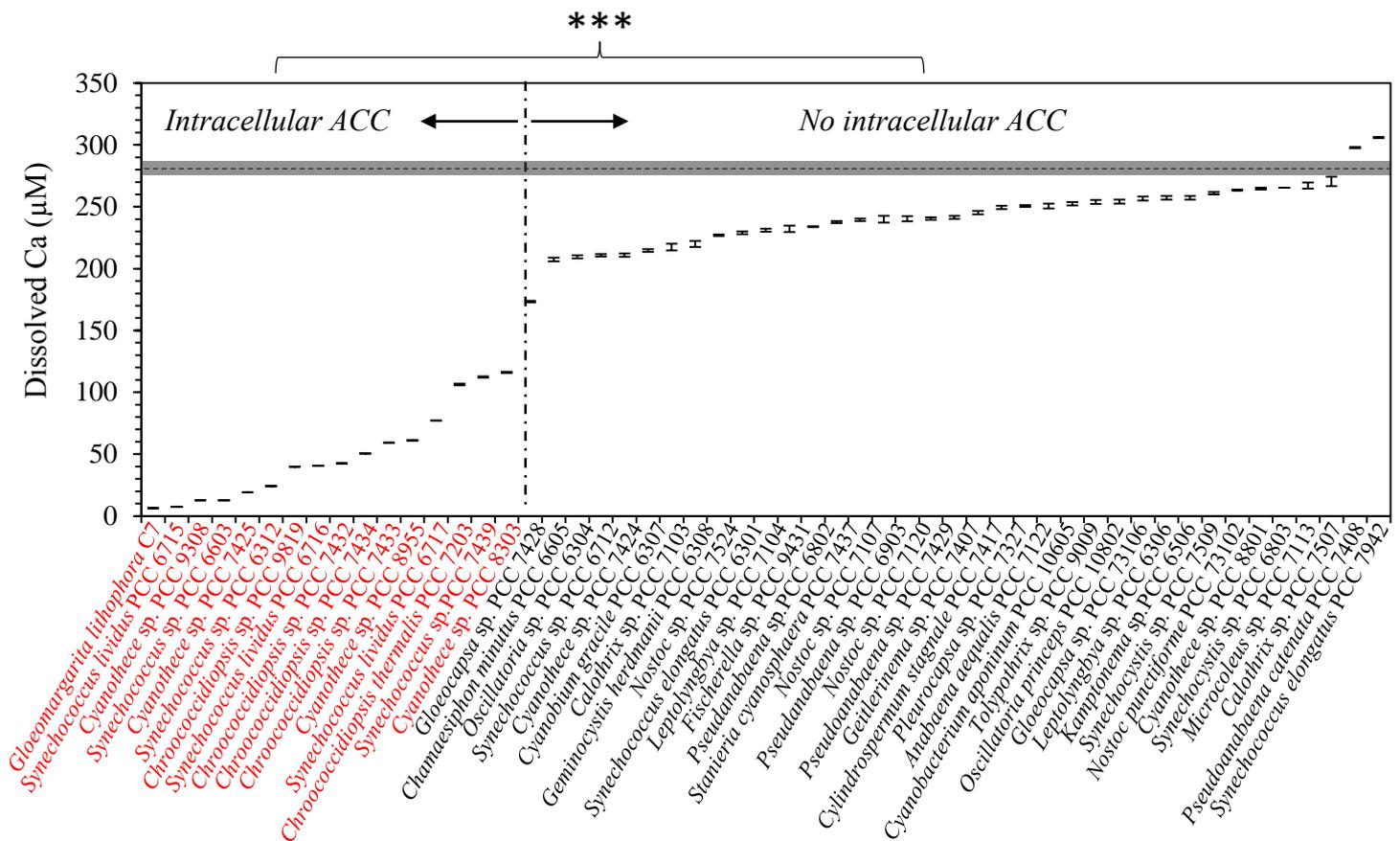


Figure 3. Plot of the concentrations of dissolved calcium remaining after 40 - 61 days of incubation for the 52 tested strains. In red: strains forming intracellular calcium carbonates; in black: strains not forming intracellular carbonates. The dashed line represents the initial concentration of dissolved calcium in the culture medium (BG-11). The grey area corresponds to error bars around this value. Error bars were calculated based on the precision of ICP-AES.

initial pH of the BG-11 medium was 7.5, it systematically increased upon cell growth, reaching a final value between 8 and 11 depending on the strains. No correlation was detected between the final pH and Ca uptake (**Fig. S4**). Similarly, different strains showed different final dry masses, but dry masses were not correlated with Ca uptake (**Fig. S5**). Last, we tested the influence of an incubation time of 40 vs 60 days on Ca uptake for three ACC+ strains and two ACC- strains (**Fig. S6**). Although we observed that uptake increased from 53% to 92% between 40 and 60 days for *Synechococcus* sp. PCC 6312, the ranking of the strains in terms of Ca uptake did not vary over this time range. This is also consistent with the analyses by Cam et al (2018), who showed that Ca uptake rate was higher in the first hours of cultures of several ACC+ strains. Overall, these tests supported the conclusion that cultures of ACC+ strains

intrinsically showed a higher Ca uptake than ACC- strains regardless of their dry masses, the duration of incubation (40 or 60 days) and/or extracellular pH.

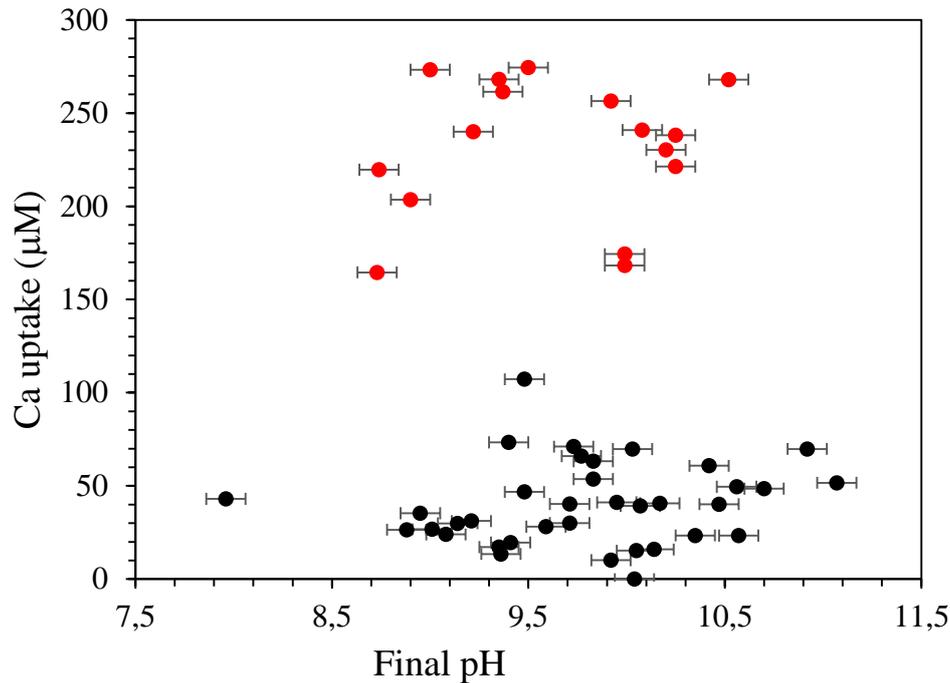


Figure S4. Calcium uptake (obtained by subtracting the dissolved Ca concentration left after cell incubation from the initial dissolved Ca concentration in the culture medium) vs pH for the 52 cyanobacterial strains. In red: strains producing intracellular ACC; in black: strains not forming intracellular ACC.

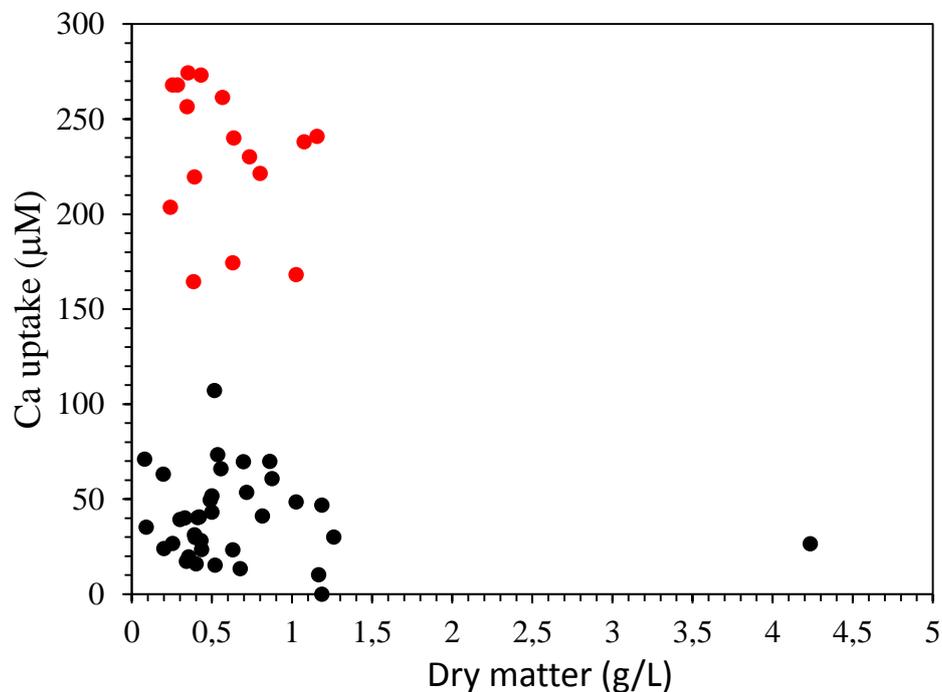


Figure S5. Calcium uptake (obtained by subtracting the dissolved Ca concentration left after cell incubation from the initial dissolved Ca concentration in the culture medium) vs dry mass for the 52 cyanobacterial strains of cyanobacterial. In red: strains producing intracellular ACC; in black: strains not forming intracellular ACC.

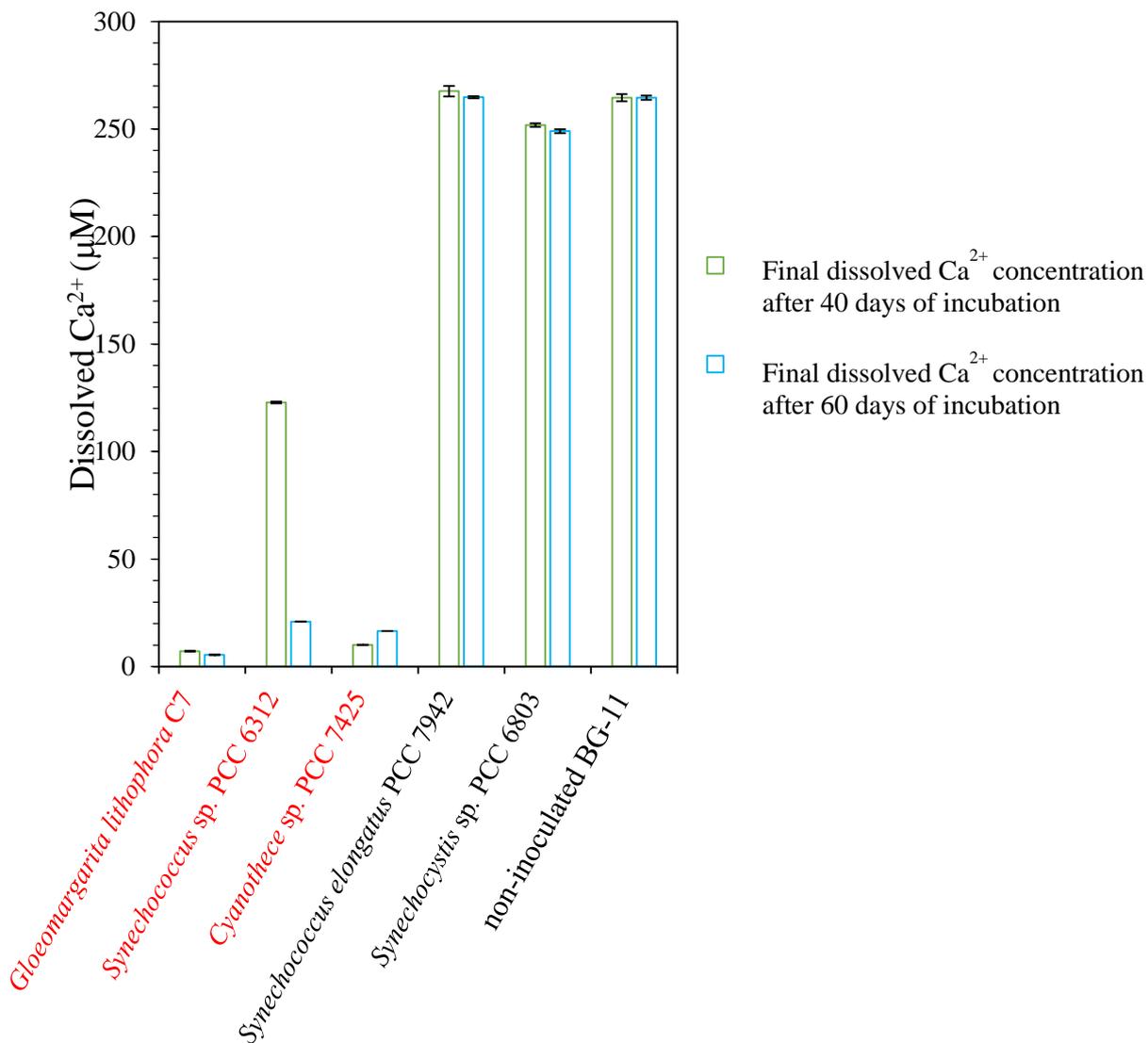


Figure S6. Final dissolved calcium concentration for cultures grown in sterile BG-11 after 40 (green) and 60 (blue) days of incubation. Strains forming intracellular ACC (*G. lithophora*, *Synechococcus* sp. PCC 6312, *Cyanothece* sp. PCC 7425) are indicated in red, and strains without ACC (*Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803) are indicated in black. Error bars were calculated based on the precision of ICP-AES measurements.

3.3. Impact of the initial concentration of dissolved Ca²⁺ on the growth of cyanobacteria forming intracellular ACC

We selected a subset of three strains representing the two types of intracellular ACC distributions: scattered through the cell, i.e. *G. lithophora* C7 and *Cyanothece* sp. PCC 7425, and at the cell poles: *Synechococcus* sp. PCC 6312. Their growth was compared with that of two ACC⁻ strains: *Synechococcus elongatus* PCC 7942 and *Synechocystis* sp. PCC 6803. The growth of these three ACC⁺ strains and two ACC⁻ strains was measured in BG-11 at two initial Ca²⁺ concentrations: 50 µM and 250 µM. *G. lithophora* C7 and *Cyanothece* sp. PCC 7425 showed significantly higher growth rates when grown with an initial Ca concentration of 250

μM compared to $50 \mu\text{M}$ (**Fig. 4**). In contrast, growth was only slightly higher for *Synechococcus* sp. PCC 6312 at an initial Ca concentration of $250 \mu\text{M}$ (compared to $50 \mu\text{M}$) and not different between the two Ca concentrations for *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *S. elongatus* PCC 7942. The pH showed similar differences between cultures at 50 and $250 \mu\text{M}$, reaching significantly higher values at $250 \mu\text{M}$ for *G. lithophora* C7 and *Cyanothece* sp. PCC 7425 but similar values at 50 and $250 \mu\text{M}$ for *Synechococcus* sp. PCC 6312, *S. elongatus* PCC 7942 and *Synechocystis* sp. PCC 6803 (**Fig. S7**).

To further test the growth dependence on the Ca content of the growth medium, cultures with $50 \mu\text{M}$ of Ca were split in half after 527 hours. Calcium was subsequently added to half of these subcultures at a concentration of $200 \mu\text{M}$ to complement the initial deficit of Ca compared to the $250 \mu\text{M}$ of Ca in standard BG-11. No Ca was added to the other half of the cultures. For *G. lithophora*, the culture was still growing at the time of Ca addition (**Fig. 5**). Yet, 300 h after Ca addition, the Ca-supplemented subcultures reached an OD_{730} significantly higher than the subcultures with no Ca addition. The difference was even larger for *Cyanothece* sp. PCC 7425. These differences could also be observed on the time evolution of pH (**Fig. S8**). In contrast, the OD_{730} of the Ca-supplemented subculture of *Synechococcus* sp. PCC 6312 was slightly lower than that with no Ca addition (**Fig. 5**). The time evolution of the pH was similar for the two subcultures (**Fig. S8**). For *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *S. elongatus* PCC 7942, subcultures with no Ca addition reached significantly higher OD_{730} than Ca-supplemented subcultures (**Fig. 5**).

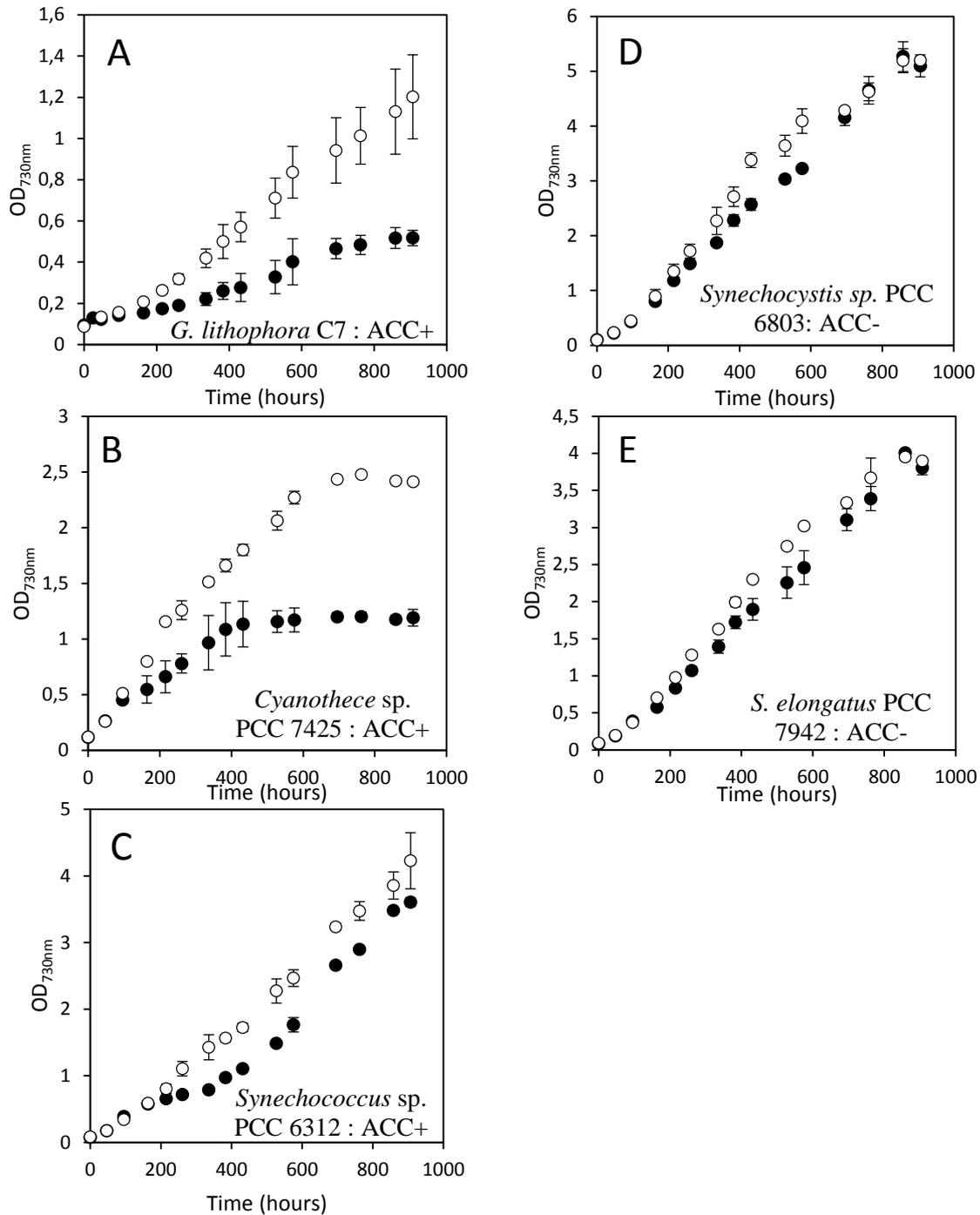


Figure 4. Time evolution of OD_{730nm} for cultures in a BG-11 medium with an initial dissolved Ca concentration of 250 μM (open symbols) and 50 μM (closed symbols). (A) *G. lithophora* C7; (B) *Cyanothece* sp. PCC 7425; (C) *Synechococcus* sp. PCC 6312; (D) *Synechocystis* sp. PCC 6803; (E) and *S. elongatus* PCC 7942. Error bars represent standard deviations calculated based on variations between duplicates.

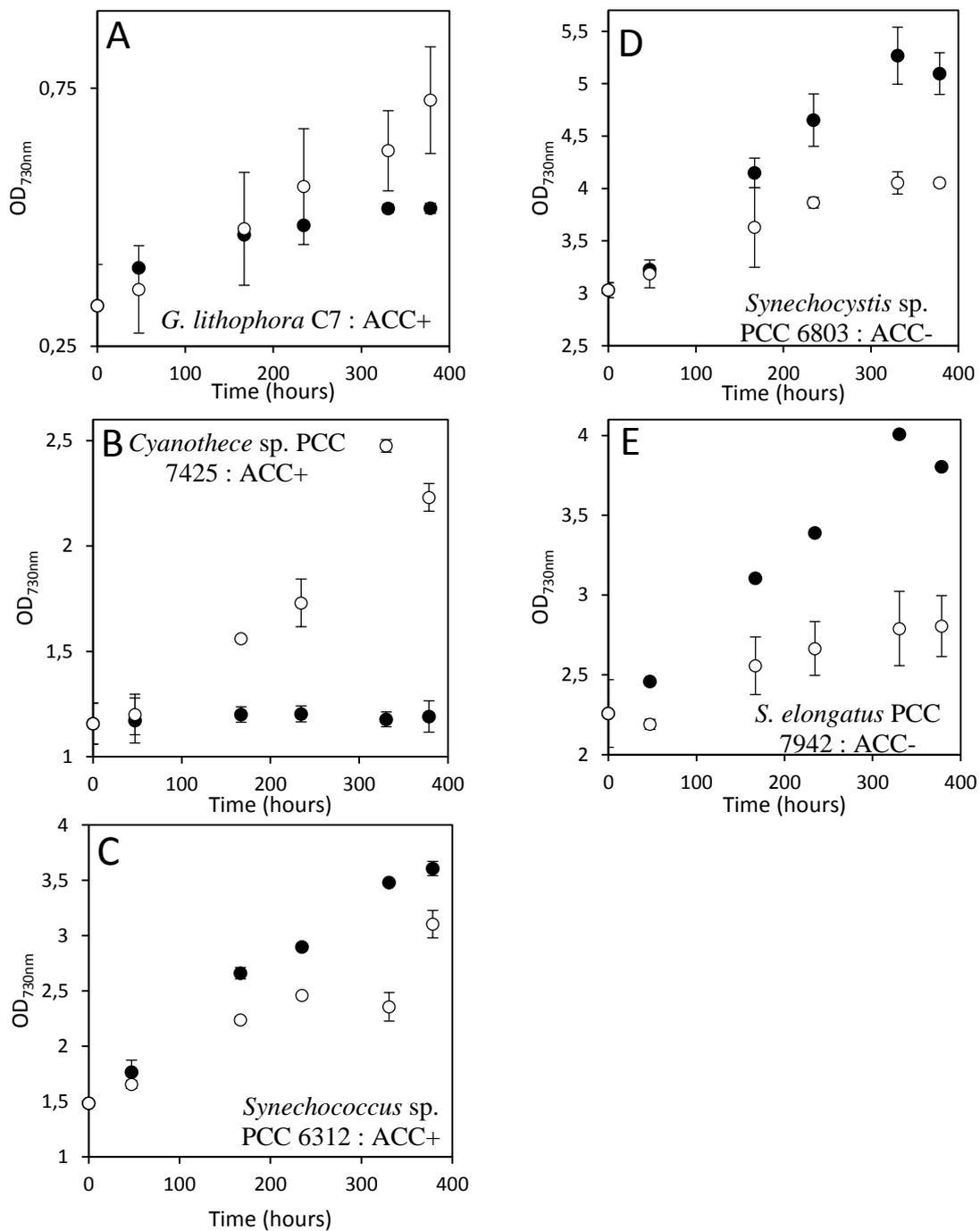


Figure 5. (A) Time evolution of the OD_{730nm} of subcultures first grown in BG-11 with 50 μM of Ca, then supplemented (open symbols) or not (closed symbols) with 200 μM of Ca. Addition of 200 μM of Ca was done at $t=0$. (A) *G. lithophora* C7; (B) *Cyanothece* sp. PCC 7425; (C) *Synechococcus* sp. PCC 6312; (D) *Synechocystis* sp. PCC 6803; (E) *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Error bars represent standard deviations calculated based on variations between duplicates.

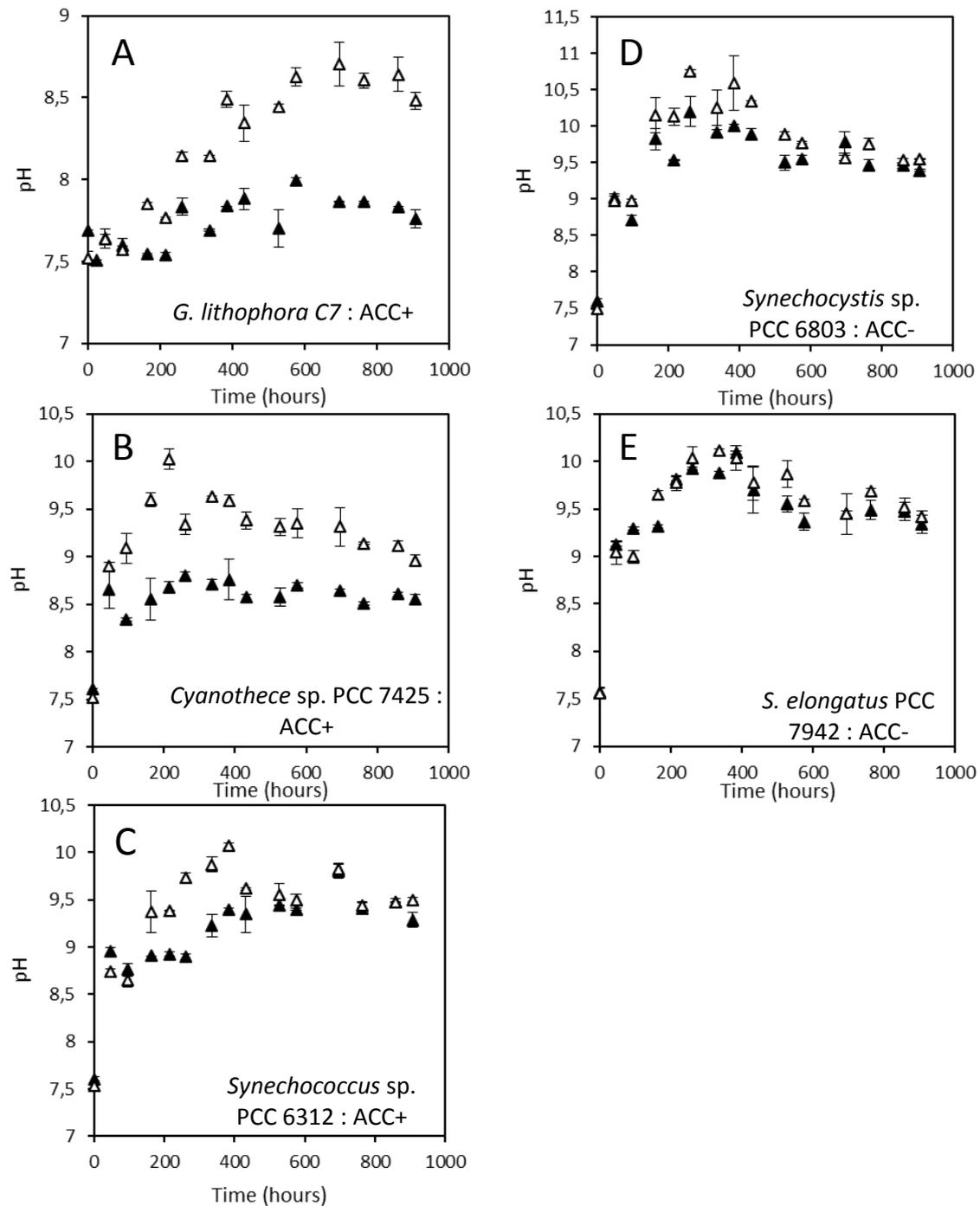


Figure S7. Time variations of pH in cultures with an initial Ca concentration of 50 μM (closed symbols) and 250 μM (open symbols). (A) *G. lithophora* C7; (B): *Cyanothece* sp. PCC 7425; (C): *Synechococcus* sp. PCC 6312; (D): *Synechocystis* sp. PCC 6803; (E): *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Error bars represent standard deviations calculated based on variations between duplicates.

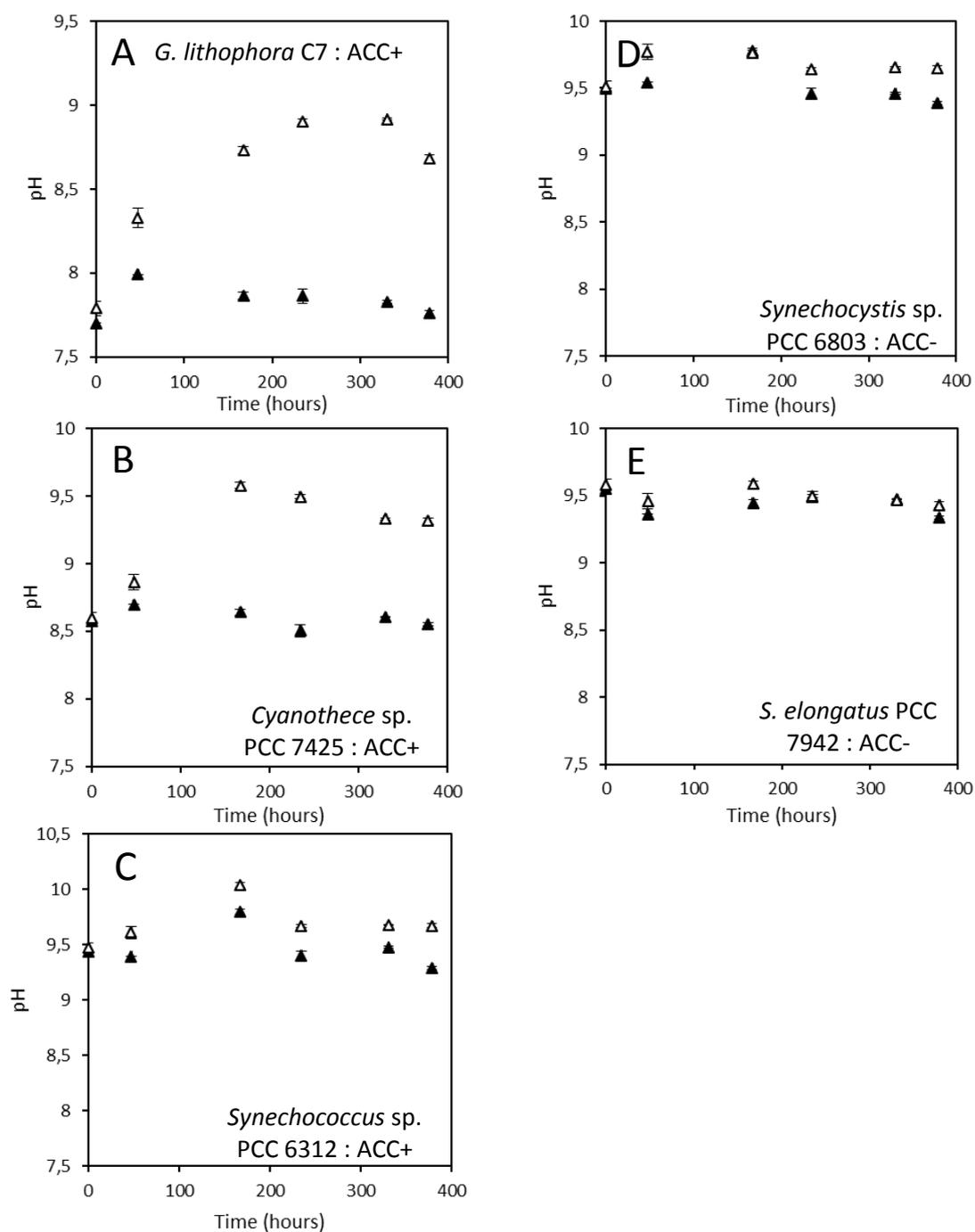


Figure S8. Time evolution of pH measured in subcultures first grown in BG-11 with 50 μM of Ca, then supplemented (open symbols) or not (closed symbols) with 200 μM of Ca. Addition of 200 μM of Ca was done at $t=0$. (A) *G. lithophora* C7; (B) *Cyanothece* sp. PCC 7425; (C) *Synechococcus* sp. PCC 6312; (D) *Synechocystis* sp. PCC 6803; (E) *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Error bars represent standard deviations calculated based on variations between duplicates.

3.4. Genome analyses

Genes coding for proteins possibly involved in passive and active transport of Ca were searched and quantified in the annotated genomes of seven ACC+ strains (**Table 1**). Regarding active transport, all genomes contained at least one copy (e.g., two for *Cyanothece* sp. PCC 7425 and *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203) of a gene coding for a Ca²⁺/H⁺ exchanger and between one and three copies of the UPF0016 gene coding for a putative calcium/cation exchanger (Demaegd, Colinet, Deschamps, & Morsomme, 2014). All these genomes also encoded a homolog of a Na⁺/H⁺ antiporter (apnhaP) that has been reported to have a high Ca²⁺/H⁺ antiport activity at alkaline pH (Waditee et al, 2001). In contrast, homologs of other genes coding for transporters possibly involved in Ca transport (Ca²⁺ ATPase, Pit, Ca²⁺/Na⁺ antiporter) were found in some but not all these 7 genomes. Regarding passive transport, at least one copy of a gene coding for a mechanosensitive channel was found in all genomes. A homolog of a pH-sensitive Ca leak channel (Human Bax1 inhibitor) found in some intracellular membranes (Chang et al., 2014) was detected in all genomes but the one of *G. lithophora*.

Table 1. Proteins involved in Ca²⁺ transport detected in seven cyanobacterial strains forming intracellular ACC. Protein sequence identifiers (Genbank accessions) are reported.

| Transport type | Function | specific hit (CDD profile) | <i>G. lithophora</i> | <i>S. sp.</i> | <i>S. lividus</i> | <i>S. lividus</i> | <i>S. lividus</i> | <i>C. thermalis</i> | <i>C. sp.</i> PCC | Reference |
|------------------|--|----------------------------|------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|--|--|---|
| | | | <i>C7</i> | PCC 6312 | PCC 6715 | <i>lividus</i> | <i>lividus</i> | PCC 7203 | 7425 | |
| | | | NZ_CP017675.1 | NC_019680.1 | NZ_CP01809 2.1 | Unpublished | Unpublished | NC_019695.1 | NC_011884.1 | |
| | Ca ²⁺ ATPase | cd02089 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | AFY89136.1, AFY89473.1 | ACL44608.1 | Berkelman, Garret-Engele, & Hoffman, 1994 |
| Active transport | apnhaP (K ⁺ /H ⁺ antiporter, Ca ²⁺ /H ⁺ antiporter at alkaline pH) | COG0025 | APB33279.1 | AFY60943.1, AFY61477.1, AFY62329.1 | ATS18144.1 | 1 | 1 | AFY86316.1, AFY86773.1, AFY88512.1, AFY89267.1, AFY89685.1 | ACL43274.1, ACL45641.1, ACL45953.1, ACL47119.1 | Waditee et al., 2001 |
| | UPF0016 (Putative Ca ²⁺ /cation antiporter) | COG2119, pfam01169 | APB33251.1, APB33252.1 | AFY59528.1, AFY61632.1, AFY62270.1 | ATS18363.1, ATS18364.1 | 1 | 1 | AFY86178.1, AFY86627.1, AFY86628.1 | ACL43789.1, ACL46990.1, ACL46991.1 | Demaegd et al., 2014 |
| | Ca ²⁺ /H ⁺ antiporter | COG0387 | APB32733.1 | AFY62574.1 | ATS17843.1 | 1 | 1 | AFY88666.1, AFY88667.1 | ACL43313.1, ACL45336.1 | Domínguez, Guragain, & Patrauchan, 2015 |
| | Ca ²⁺ /Na ⁺ antiporter | pfam01699 | APB34699.1 | 0 | ATS18027.1 | 0 | 1 | AFY89133.1 | ACL44147.1, ACL45335.1 | |

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---|---|--|---------------------------|------------|---|---|------------|--|--|
| | COG0668 | APB35048.1 | AFY61749.1 | 0 | 0 | 0 | AFY88096.1, AFY88215.1, AFY89282.1, AFY89283.1 | 0 | | |
| Mechanosensitive channel | | APB33494.1, APB33956.1, APB32821.1, APB32856.1 | AFY60788.1, AFY59468.1, AFY62613.1 | ATS17940.1, ATS18073.1 | | 3 | 2 | AFY88498.1 | ACL43383.1, ACL43916.1, ACL44170.1, ACL46737.1, ACL47385.1 | |
| Passive transport | pfam00924 | | | | | | | | | |
| | hBI-1(pH sensitive channel) | pfam01027 | 0 | AFY61003.1 | ATS17502.1 | 1 | 1 | AFY90919.1 | ACL43777.1 | Chang <i>et al.</i> , 2014 |
| | Pit (CaHPO ₄ /H ⁺ symport) | pfam01384, COG0306 | 0 | 0 | ATS18407.1 | 1 | 1 | AFY87346.1 | ACL43457.1 | Domínguez, Guragain, & Patrauchan, 2015 |

4. Discussion

4.1. Cyanobacteria forming intracellular CaCO₃ show a very strong Ca uptake

Several previous studies have assessed cell Ca uptake by measuring the temporal changes of dissolved extracellular Ca²⁺ concentration (Singh & Mishra, 2014; Cam et al., 2016; Blondeau et al., 2018b). Yet, changes in dissolved Ca concentrations can *a priori* be due to i) extracellular precipitation of Ca-containing mineral phases, ii) adsorption at the cell surfaces and/or by surface EPS and/or iii) Ca uptake within cells. Here, Ca uptake within cells is argued to be the most important process responsible for the observed differences in the decrease of extracellular dissolved Ca concentration between cultures of ACC⁺ and ACC⁻ cyanobacterial strains. This conclusion relies on several lines of evidence. First, cultures with higher solution pH should experience higher rates of extracellular Ca-mineral precipitation and/or cell surface adsorption (Bundeleva et al., 2014; Lee, Apel, & Walton, 2004). However, no correlation was detected between pH and the decrease of dissolved Ca concentrations, i.e. the pH in the culture media of ACC⁺ strains increased to diverse values with no systematic differences with ACC⁻ strains. In some cultures, where pH increased to high values (e.g., pH = 10.56 for *Synechococcus* sp. PCC 6301), only a slight decrease of dissolved Ca concentration was observed ($\Delta([Ca^{2+}]) = 49.56 \mu M$). Moreover, STEM observations clearly showed that Ca was mostly contained within intracellular ACC inclusions in ACC⁺ strains and to a lesser extent within polyphosphates. Overall, this supports the conclusion that the variations observed in the decrease of dissolved Ca concentration was primarily dependent on the capability of the strains to form intracellular ACC. Consistently, Cam et al. (2018) showed that BG-11 remained mostly undersaturated with Ca-carbonate phases in the cultures of three ACC⁺ strains and that the

decrease of dissolved Ca concentrations in these cultures was primarily due to Ca uptake within cells. Overall, the present study, based on the comparison between 52 strains, generalizes the hypothesis formulated by Cam et al. (2018) based on only 4 strains, that cyanobacteria forming intracellular ACC show a Ca uptake systematically higher than other cyanobacteria.

Although it is difficult to definitely demonstrate that ACC- strains never form ACC (since this would require to culture them under an infinite number of diverse conditions), it can be concluded that they do not form ACC at least under the specific conditions used here in the present study. Moreover, it should be noted that some of them (e.g., PCC 6803, PCC7942) have been scrutinized at different time points, therefore providing a much more extensive sampling of diverse conditions. Last, we note that under the specific culture conditions we used, there is a relationship between forming/not forming ACC and phylogeny (**Fig. S1**). This suggests that this trait may be a synapomorphy for the *Chroococcidiopsis* and the *Cyanothece* sp PCC 7425 clusters as already mentioned for the *Synechococcus* sp. PCC 6312 cluster by Benzerara et al. (2014) and that it is likely more controlled by genetics than environmental conditions.

4.2. Relatively high Ca adsorption by *Gloeocapsa* sp. PCC 7428

Although *Gloeocapsa* sp. PCC 7428 showed an affinity for Ca lower than ACC+ cyanobacteria, it was significantly higher than other ACC- cyanobacteria. STEM analyses showed that Ca was clearly associated with the cell walls of *Gloeocapsa* sp. PCC 7428. Cell walls of *Gloeocapsa* sp. PCC 7428 have been shown to be composed of a thick extracellular sheath of mucopolysaccharides (Gonzalez-Esquer *et al.*, 2016), which may therefore be responsible for this relatively high Ca sorption capability. Whether this is due to a high surface Ca adsorption capacity of the strain and/or precipitation of extracellular Ca-mineral phases could not be determined here but it is known that there is a continuum between surface adsorption and extracellular mineral precipitation (Warren & Ferris, 1998). Consistently, several studies have stressed on the significant calcification potential of the genus *Gloeocapsa* (Pokrovsky, Martinez, Golubev, Kompantseva, & Shirokova, 2008; Bundeleva et al., 2014). Moreover, cyanobacteria of the Chroococcales order, to which *Gloeocapsa* sp. PCC 7428 belong, have been proposed more generally to be particularly efficient at precipitating Ca-carbonates (e.g., Saghai et al., 2015). Overall, the present survey of a large number of cyanobacterial strains supports the idea that *Gloeocapsa* sp. PCC 7428 may be particularly prone among cyanobacteria at inducing the precipitation of extracellular Ca-mineral phases.

4.3. Comparison of the Ca content of ACC+ cyanobacterial strains with other known bacteria

Here, we normalized the Ca uptake by ACC+ strains to their dry weight and compared them with similar data found in the literature for other bacteria (**Table 2**). As discussed by Cam et al. (2018), these values did not represent the maximum values that may be achieved by these strains as Ca input was limited to 250 μM in these batch cultures. Yet, the cell-normalized Ca contents measured on cyanobacteria forming intracellular ACC are among the highest content reported in the literature. As a comparison, more classically studied bacteria such as *Escherichia coli*, *Vibrio cholera* or *Acetobacter aceti* contain two orders of magnitude less Ca. In contrast, there are few other bacteria accumulating Ca to a high extent. For example, *Achromatium* spp., a gammaproteobacterium forming intracellular calcite is to our knowledge the strongest Ca-accumulating bacterium that has been reported so far, with a Ca content of 65400 fmol of Ca per cell (Gray, 2006). Assuming that the mass of C represents 50% of dry weight, a carbon-to-volume conversion of 0.1 $\text{pgC}/\mu\text{m}^3$ for bacteria (Norland, Heldal, & Tumyr, 1987) and a cell volume of $3 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ (Gray, 2006), this equals to 436 mg of Ca per gram of dry matter, i.e. an order of magnitude higher than for cyanobacteria forming intracellular ACC. *Bacillus cereus* spores also sequester high amounts of Ca on the same order of magnitude as cyanobacteria forming intracellular ACC but with a different speciation, i.e. as Ca^{2+} -dipicolinic acid chelates, incorporated in the spore cores (Steward, 1980).

Among cyanobacteria, the differentiated cells called calcicytes, observed in the filamentous euendolithic cyanobacterium *Mastigocoleus testarum* have been measured to contain 100 fmol of Ca per cell, which measured $\sim 1 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ (Guida & Garcia-Pichel, 2016). This represents 20 mg of Ca per g of dry weight, a value similar to that estimated for cyanobacteria forming intracellular ACC (**Table 2**). The speciation of Ca in calcicytes has not been determined so far and the possibility that it is mostly contained in intracellular ACC has not been yet explored to our knowledge. Moreover, Cam et al. (2018) noted that since some cyanobacteria forming intracellular ACC tend to decrease the extracellular concentration of dissolved Ca^{2+} , they may favor the dissolution of extracellular Ca-carbonates. This conclusion can be generalized to all cyanobacteria forming intracellular ACC and future studies should investigate their capabilities to bore into calcium carbonate crystals.

Table 2. Ca uptake by diverse prokaryotes compiled from the literature and our data.

| Name | Type of organism | Ca uptake | | Notes | Reference |
|---|------------------|--------------------|-----------|------------------------------|---|
| | | mg/g of dry matter | fmol/cell | | |
| Archaea | | | | | |
| <i>Haloferax volcanii</i> | | 0.36 | | | Novoselov et al., 2017 |
| <i>Natrialba magadii</i> | | 0.31 | | | Novoselov et al., 2017 |
| Bacteria | | | | | |
| Actinobacteria | | | | | |
| <i>Micrococcus roseus</i> | | 0.08 | | | Rouf, 1964 |
| <i>Nesterenkonia lacusekhoensis</i> | | 0.06 | | | Novoselov et al., 2017 |
| Firmicute | | | | | |
| <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> | | 0.39 | | | Novoselov et al., 2017 |
| <i>Bacillus cereus</i> (vegetative cells) | | 0.3 | | | Rouf, 1964 |
| <i>Bacillus cereus</i> (spores) | | 28.00 to 30.00 | | | Steward et al., 1980 |
| Proteobacteria | | | | | |
| <i>Acetobacter aceti</i> | | 0.07 | | | Novoselov et al., 2017 |
| <i>Achromatium</i> spp. | | 436 | 65400 | intracellular calcite | Gray, 2006 |
| <i>Alcaligenes marinus</i> | | 0.09 | | | Jones, Royle, & Murray, 1979 |
| <i>Escherichia coli</i> | | 3.21 | | | Novoselov et al., 2017 |
| | | 1.10 | | | Lawford & Rousseau, 1995 ; Demain & Solomon 1981 |
| | | 0.11 | | | Novoselov et al., 2017 |
| | | 0.11 | | | Novoselov et al., 2017 |
| | | 0.07 | | | Novoselov et al., 2017 |
| | | 0.06 | | | Novoselov et al., 2017 |
| | | 0.06 | | | BioMagnetech Corporation, 1990 |
| | | 0.02 | | | Rouf, 1964 |
| <i>Sphaerotilus natans</i> | | 0.18 | | | Rouf, 1964 |
| <i>Vibrio cholerae</i> | | 0.09 | | | Novoselov et al., 2017 |
| Cyanobacteria | | | | | |
| <i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 7432 | | 8.88 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 7433 | | 11.09 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 7434 | | 12.55 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 7439 | | 11.09 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 9819 | | 8.36 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Chroococcidiopsis thermalis</i> PCC 7203 | | 6.58 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425 | | 17.92 | 5.4 | intracellular ACC | This study |
| | | 13.00 | 3.9 | intracellular ACC | Cam et al., 2018 |
| <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8303 | | 17.13 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Cyanothece</i> sp. PCC 8955 | | 22.57 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Cyanothece</i> sp. PCC 9308 | | 37.69 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Gloeocapsa</i> sp. PCC 7428 | | 8.34 | | adsorption/ precipitation | This study |

| | | | | |
|---|-------|-----|-------------------|------------------------------------|
| <i>Gloeomargarita lithophora</i> C7 | 31.41 | 2.7 | intracellular ACC | This study |
| | 26.00 | 1.7 | intracellular ACC | Cam et al., 2018 |
| <i>Mastigocoleus testarum</i> | 20.00 | 100 | calcicite | Guida & Garcia-Pichel, 2016 |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> Kützing | 0.44 | | | Krivtsov, Bellinger, & Sigee, 2005 |
| <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312 | 29.13 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6603 | 42.82 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Synechococcus lividus</i> sp. PCC 6715 | 25.46 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Synechococcus lividus</i> sp. PCC 6716 | 15.15 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Synechococcus lividus</i> sp. PCC 6717 | 33.99 | | intracellular ACC | This study |
| <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1 | 15.00 | 4.8 | intracellular ACC | Cam et al., 2018 |

4.4. Molecular mechanisms of high Ca sequestration

Whether cyanobacteria forming intracellular ACC may share Ca-sequestering molecular pathways that are similar and possibly homologous to those of *Mastigocoleus testarum*, would be interesting to test in future studies. Since Ca uptake involves Ca transport proteins in any case, we searched genes that might be shared by the seven genomes available for the divergent strains forming intracellular ACC.

The influx (from the extracellular solution to the cytosol) of Ca is usually assumed to occur passively through channels, which show little ionic specificity for most of them (Domínguez, Guragain, & Patrauchan, 2015). Here, a mechanosensitive channel was shown to be present in all the ACC+ cyanobacteria. However, it should be noted that mechanosensitive channels can also be found in ACC- cyanobacteria, such as *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Nazarenko, Andreev, Lyukevich, Pisareva, & Los, 2003). Interestingly, inorganic phosphate transport systems (PitB in *E. coli*) also seem able to transfer divalent cation-HPO₄ neutral complexes intracellularly under some conditions (van Veen, Abee, Kortstee, Konings, & Zehnder, 1994). This could connect Ca uptake with P sequestration which results in the formation of polyPhosphate granules in some of these cyanobacteria (e.g., Cam et al., 2018; Blondeau et al., 2018a). However, these transport systems were detected in only some of the ACC+ cyanobacteria.

The out-flux of Ca is usually assumed to occur actively through transporters. Out-flux may proceed from the cytosol towards the extracellular solution or from the cytosol towards an intracellular compartment as the one delimitating intracellular ACC (Blondeau et al., 2018a). Here, we identified in all ACC+ cyanobacteria at least one gene coding for a Ca²⁺/H⁺ transporter, and at least one gene coding for a putative calcium exchanger of the UPF0016 family. Again, it should be noted that Ca²⁺/H⁺ antiports and membrane proteins of the UPF0016 family have been identified in numerous other bacteria (Domínguez, Guragain, & Patrauchan,

2015). Identifying their localization, in the plasma membrane or in intracellular compartments would help deciphering if they are involved in Ca export extracellularly or within an intracellular compartment. Mansor, Hamilton, Fantle, and Macalady (2015) identified in *Achromatium* a Ca²⁺-ATPase and noted that they could also be found in *C. thermalis* PCC 7203, *Cyanothece* sp. PCC 7425 and *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. Here, we confirm that a Ca²⁺-ATPase is indeed present in the genomes of *C. thermalis* and *Cyanothece* sp. but it is absent from the genomes of the five other ACC⁺ strains. Garcia-Pichel, Ramírez-Reinat, and Gao (2010) also detected a Ca²⁺-ATPase in *Mastigocoleus testarum*, an endolithic cyanobacterium but stressed that this pump extrudes Ca²⁺ outside of the cell, confirming that it is not likely involved in Ca sequestration within cells.

Overall, this analysis provides some indications about possible actors involved in Ca homeostasis but it should be noted that this clearly does not provide definitive clues about the mechanisms involved in ACC formation since: 1) similar genes might be found in ACC-cyanobacteria; 2) the diverse cyanobacteria forming intracellular ACC may use different biomineralization mechanisms involving different sets of genes; 3) formation of intracellular ACC likely involves other processes than in- and out-fluxes of Ca. Only future genetic studies targeting and deleting such candidate genes will provide definitive answers about their possible role in the future.

4.5. Cause for a high Ca demand by cyanobacteria forming intracellular ACC

Calcium at a concentration of 50 µM in BG-11 was shown to be limiting for the growth of *Cyanothece* sp. PCC 7425 and *G. lithophora* C7. In contrast, Ca was not limiting at this concentration for the growth of *Synechococcus* sp. PCC 6312. Ca accumulation seems therefore to be more essential for *Cyanothece* sp. PCC 7425 and *G. lithophora* C7 than for *Synechococcus* sp. PCC 6312. Additional differences can be noted between *Synechococcus* sp. PCC 6312 and the two other ACC⁺ strains: while *Synechococcus* sp. PCC 6312 forms intracellular ACC granules in connection with cell division and between the cytoplasmic membrane and the outermost thylakoids, the two other strains form ACC granules in the center of the cells with no apparent connection with cell division (Benzerara et al., 2014; Blondeau et al., 2018a). Overall, intracellular carbonatogenesis likely follows different pathways in the clade of *Synechococcus* sp. PCC 6312 compared to other cyanobacteria and may have different functions. Li et al. (2016) suggested that in the clade of *Synechococcus* sp. PCC 6312, ACC may form by nucleating on cell division proteins such as FtsZ, which require relatively high Ca²⁺ for polymerization (e.g., Yu & Margolin 1997). If true, this needed amount of Ca may still

remain relatively modest compared with the one required by other ACC⁺ cyanobacteria. Thereafter, we tentatively discussed potential causes for a higher demand in Ca observed for *Cyanothece* sp. PCC 7425 and *G. lithophora* C7. Calcium may either be directly needed for some biochemical processes and/or it may have a more indirect role through its involvement in the formation of intracellular ACC which themselves fill a biological function. Calcium is notoriously essential for bacteria (e.g., Dominguez, 2004). In particular, Ca is a co-factor for cyanobacteria in the water-splitting in photosystem II complex (Debus, 1992). However, since this need is shared by all cyanobacteria, it does not explain the observed higher requirement of some of the ACC⁺ strains. Few studies have shown a similar need by other bacteria for relatively high Ca concentrations. For example, Webb (1988) reported that the filamentous bacterium, *Haliscomenobacter hydrossis*, grew better at Ca concentrations ≥ 0.69 mM and suggested that relatively high concentrations of Ca may have been needed for the formation of sheath by these bacteria. Shuttleworth and Unz (1991) showed that four strains of the gammaproteobacterium *Thiothrix* sp. and one strain of the betaproteobacterium *Zoogloea ramigera* need relatively high Ca concentrations for the formation of their sheath and mitigation of the toxicity of heavy metals present in the culture media. However, since heavy metals were only at trace concentrations in BG-11 and *Cyanothece* sp. PCC 7425, and *G. lithophora* C7 are not filamentous, none of these functions apply to explain the differences in Ca requirements between cyanobacterial strains forming intracellular ACC.

Similarly, high amounts of Ca are needed by sporulating bacteria (Stewart, 1980) for resistance of spores to wet heat (e.g., Kochan et al., 2018). Again, there is no obvious connection with the cyanobacteria studied here, since they do not sporulate. Last, calcicytes in the filamentous cyanobacterium *Mastigocoleus testarum* also accumulate large amounts of Ca but this accumulation in a few cells has been proposed as a way to keep Ca concentration low in the other cells, which does not apply to unicellular cyanobacteria such as the ones considered here. Moreover, it has been suggested that the significant alkalization of the cytoplasm involved by the presence of Ca²⁺ might be detrimental to the photosynthetic capacity of these cells.

Overall, unless a presently unknown biochemical process requiring high amounts of Ca exists in cyanobacteria forming intracellular ACC only, it is possible that ACC⁺ strains require high amounts of Ca so that they can form significant amounts of intracellular ACC, which are beneficial to their growth. Several biological functions have been suggested for these ACC granules in cyanobacteria by Couradeau et al. (2012) or for intracellular calcite in *A. oxaliferum* (Gray & Head, 2014): 1) they may serve as ballasts for the cells as an adaptation to a benthic form of life. However, this sounds unlikely since *Cyanothece* sp. PCC 7425, and *G. lithophora*

C7 were grown in the present study as planktonic cells. 2) Intracellular Ca-carbonates may buffer intracellular pH and balance the formation of hydroxide by conversion of HCO_3^- to CO_2 upon carbon fixation. 3) Alternatively, they may serve as a storage form of inorganic carbon available to the cells upon C-limited periods. Only future genetics studies providing mutants impeded in their capability to form Ca-carbonates may help answering this question. Culturing under C-limited conditions coupled with measurements of calcium carbonate dissolution may be helpful too.

Whatever their cause, the observed differences in Ca requirement for growth between cyanobacterial strains call for special care when attempting to culture and/or enrich these strains from the environment. The BG-11 medium has proved to be a particularly useful generic growth medium to culture a broad diversity of cyanobacterial strains (Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman, & Stanier, 1979). Here, it is confirmed that 250 μM as a standard Ca concentration provides a good compromise, allowing significant growth of strains forming intracellular CaCO_3 and not being detrimental to strains not forming intracellular CaCO_3 . However, for enrichment cultures, which are performed over extended durations, strains not limited by Ca^{2+} may be favored over time if Ca^{2+} has been consumed by those forming intracellular CaCO_3 . The use of BG-11 alone may therefore hinder the enrichment of the latter. Interestingly, it can be noted that *G. lithophora* was successfully enriched by adding fragments of rocks containing Ca-carbonates, which likely buffered the dissolved $[\text{Ca}^{2+}]$ by constant Ca^{2+} input over prolonged periods (Couradeau et al., 2012). Therefore, this strategy should be useful for future studies aiming at enriching ACC+ cyanobacteria.

Acknowledgments

Funding for this work was provided by the European Research Council under European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 Grant 307110, ERC CALCYAN. ADW was funded by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir programme under reference ANR-11-IDEX-0004-02, within the framework of the Cluster of Excellence MATISSE. The Pasteur Culture Collection of cyanobacteria was supported by the Institut Pasteur (M.G. and T.L.). The SEM facility at IMPMC was purchased owing to funding by Région Ile de France Grant SESAME 2006 I-07-593/R; the transmission electron microscopy facility at IMPMC was purchased owing to funding by Region Ile de France Grant SESAME 2000 E 1435.

References

- Altermann, W., Kazmierczak, J., Oren, A., & Wright, D. T. (2006). Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history. *Geobiology*, *4*, 147-166.
- Badger, M., & Andrews, T. (1982). Photosynthesis and inorganic carbon usage by the marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *Plant Physiology*, *70*, 517-523.
- Barrán-Berdón, A., Rodea-Palomares, I., Leganes, F., & Fernandez-Pinas, F. (2011). Free Ca²⁺ as an early intracellular biomarker of exposure of cyanobacteria to environmental pollution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *400*, 1015-1029.
- Belkin, S., & Boussiba, S. (1991). High internal pH conveys ammonia resistance in spirulina platensis. *Bioresource Technology*, *38*, 167-169.
- Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Li, J., Ferard, C., Gugger, M., Laurent, T., ... Moreira, D. (2014). Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*, 10933-10938.
- Berkelman, T., Garret-Engle, P., & Hoffman, N. E. (1994). The pacL gene of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 encodes a Ca²⁺-transporting ATPase. *Journal of Bacteriology*, *176*, 4430-4436.
- BioMagnetech Corporation, (1990). Physical characteristics of magnetic bacteria and their electromagnetic properties in the frequency range of 1–400 GHz, *BioMagnetech Corporation*, New York.
- Blondeau, M., Sachse, M., Boulogne, C., Gillet, C., Guigner, J.M., Skouri-Panet, F., ... Benzerara, K. (2018a) Amorphous calcium carbonate granules form within an intracellular compartment in calcifying cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1768.
- Blondeau, M., Benzerara, K., Ferard, C., Guigner, J.M., Poinso, M., Coutaud, M., ... Skouri-Panet, F. (2018b). Impact of the cyanobacterium *Gloeomargarita lithophora* on the geochemical cycles of Sr and Ba. *Chemical Geology*, *483*, 88-97.
- Boros, E., Kolpakova, M. (2018). A review of the defining chemical properties of soda lakes and pans: An assessment on a large geographic scale of Eurasian inland saline surface waters. *PLoS One*, *13*, e0202205.

- Bundeleva, I. A., Shirokova, L. S., Pokrovsky, O. S., Bénézeth, P., Ménez, B., Gérard, E., & Balor, S. (2014). Experimental modeling of calcium carbonate precipitation by cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Chemical Geology*, 374-375, 44-60.
- Cam, N., Georgelin, T., Jaber, M., Lambert, J.-F., & Benzerara, K. (2015). In vitro synthesis of amorphous Mg-, Ca-, Sr- and Ba-carbonates: What do we learn about intracellular calcification by cyanobacteria? *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 161, 36-49.
- Cam, N., Benzerara, K., Georgelin, T., Jaber, M., Lambert, J.-F., Poinot, M., ... Cordier, L. (2016). Selective uptake of alkaline earth metals by cyanobacteria forming intracellular carbonates. *Environmental Science & Technology*, 50, 11654–11662.
- Cam, N., Benzerara, K., Georgelin, T., Jaber, M., Lambert, J.-F., Poinot, M., ... Jézéquel, D. (2018). Cyanobacterial formation of intracellular Ca-carbonates in undersaturated solutions. *Geobiology*, 16, 49-61.
- Chang, Y., Bruni, R., Kloss, B., Assur, Z., Kloppmann, E., Rost, B., ... Liu, Q. (2014). Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes. *Science*, 344, 1131-1135.
- Clapham, D.E. (2007) Calcium signaling. *Cell*, 131, 1047-1058
- Couradeau, E., Benzerara, K., Gerard, E., Moreira, D., Bernard, S., Brown, G. E., & Lopez-Garcia, P. (2012). An early-branching microbialite cyanobacterium forms intracellular carbonates. *Science*, 336, 459-462.
- Debus, R. J. (1992). The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1102, 269-352.
- Demaegd, D., Colinet, A.-S., Deschamps, A., & Morsomme, P. (2014). Molecular evolution of a novel family of putative calcium transporters. *PLoS ONE*, 9, e100851.
- Demain, A.L. & Solomon, N.A., (1981). Manual of industrial microbiology and biotechnology, *American Society for Microbiology*, Washington, DC.
- Domínguez, D. C. (2004). Calcium signaling in bacteria. *Molecular Microbiology*, 54, 291-297.
- Domínguez, D. C., Guragain, M., & Patrauchan, M. (2015). Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. *Cell Calcium*, 57, 151-165.

-
- Garcia-Pichel, F., Ramírez-Reinat, E., & Gao, Q. (2010). Microbial excavation of solid carbonates powered by P-type ATPase-mediated transcellular Ca^{2+} transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*, 21749-21754.
- Gilabert, J. A. (2012). Cytoplasmic calcium buffering. In M. S. Islam (Ed.), *Calcium signaling* (pp. 483–498). Dordrecht: Springer Science & Business Media.
- Golubic, S., & Lee S.-J., (1999). Early cyanobacterial fossil record: Preservation, palaeoenvironments and identification. *European Journal of Phycology*, *34*, 339-348.
- Gonzalez-Esquer, C. R., Smarda, J., Rippka, R., Axen, S. D., Guglielmi, G., Gugger, M., & Kerfeld, C. A. (2016). Cyanobacterial ultrastructure in light of genomic sequence data. *Photosynthesis Research*, *129*, 147-157.
- Gray, N. D. (2006). The unique role of intracellular calcification in the Genus *Achromatium*. In *Inclusions in Prokaryotes* (p. 299-309). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Gray, N., & Head, I. (2014). The Family Achromatiaceae. In E. Rosenberg, E. F. De Long, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Éd.), *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria* (p. 1-14). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Guida, B. S., & Garcia-Pichel, F. (2016). Extreme cellular adaptations and cell differentiation required by a cyanobacterium for carbonate excavation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*, 5712-5717.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, *59*, 307-321.
- Jansson, C., & Northen, T. (2010). Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Current Opinion in Biotechnology*, *21*, 365-371.
- Jiang, H.-B., Cheng, H.-M., Gao, K.-S., & Qiu, B.-S. (2013). Inactivation of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchanger in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 promotes cyanobacterial calcification by upregulating CO_2 -concentrating mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*, 4048-4055.
- Jones, G. E., Royle, L. G., & Murray, L. (1979). Cationic composition of 22 species of bacteria grown in seawater medium. *Applied and Environmental Microbiology*, *38*, 800-805.

- Kamennaya, N. A., Ajo-Franklin, C. M., Northen, T., & Jansson, C. (2012). Cyanobacteria as biocatalysts for carbonate mineralization. *Minerals*, 2, 338-364.
- Kochan, T. J., Foley, M. H., Shoshiev, M. S., Somers, M. J., Carlson, P. E., & Hanna, P. C. (2018). Updates to *Clostridium difficile* Spore Germination. *Journal of Bacteriology*, 200, e00218-18.
- Krivtsov, V., Bellinger, E. G., & Sigeo, D. C. (2005). Elemental composition of *Microcystis aeruginosa* under conditions of lake nutrient depletion. *Aquatic Ecology*, 39, 123-134.
- Lawford, H.G., & Rousseau, J.D., (1995). Establish medium requirements for high yield ethanol production from xylose by existing xylose-fermenting microorganisms. Technical Report NREL AAP-4-11195-03.
- Lee, B. D., Apel, W. A., & Walton, M. R. (2004). Screening of cyanobacterial species for calcification. *Biotechnology Progress*, 20, 1345-1351.
- Li, J., Margaret Oliver, I., Cam, N., Boudier, T., Blondeau, M., Leroy, E., ... Benzerara, K. (2016). Biomineralization patterns of intracellular carbonatogenesis in cyanobacteria: Molecular hypotheses. *Minerals*, 6, 10.
- Mansor, M., Hamilton, T. L., Fantle, M. S., & Macalady, J. (2015). Metabolic diversity and ecological niches of *Achromatium* populations revealed with single-cell genomic sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 6, 822.
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., ... & Gwadz, M. (2016). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic acids research*, 45, D200-D203.
- Merz, M. U. E. (1992). The biology of carbonate precipitation by cyanobacteria. *Facies*, 26, 81-101.
- Moreira, D., Tavera, R., Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Couradeau, E., Gérard, E., ... López-García, P. (2017). Description of *Gloeomargarita lithophora* gen. nov., sp. nov., a thylakoid-bearing, basal-branching cyanobacterium with intracellular carbonates, and proposal for Gloeomargaritales ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 653-658.

-
- Nazarenko, L. V., Andreev, I. M., Lyukevich, A. A., Pisareva, T. V., & Los, D. A. (2003). Calcium release from *Synechocystis* cells induced by depolarization of the plasma membrane: MscL as an outward Ca^{2+} channel. *Microbiology*, *149*, 1147-1153.
- Norland, S., Heldal, M., & Tumyr, O. (1987). On the relation between dry matter and volume of bacteria. *Microbial Ecology*, *13*, 95-101.
- Novoselov, A. A., Silva, D., Schneider, J., Abrevaya, X. C., Chaffin, M. S., Serrano, P., ... Filho, C. R. de S. (2017). Geochemical constraints on the Hadean environment from mineral fingerprints of prokaryotes. *Scientific Reports*, *7*, 4008.
- Pokrovsky, O. S., Martinez, R. E., Golubev, S. V., Kompantseva, E. I., & Shirokova, L. S. (2008). Adsorption of metals and protons on *Gloeocapsa* sp. cyanobacteria: A surface speciation approach. *Applied Geochemistry*, *23*, 2574-2588.
- Ponce-Toledo, R. I., Deschamps, P., López-García, P., Zivanovic, Y., Benzerara, K., Moreira, D. (2017) An early-branching freshwater cyanobacterium at the origin of chloroplasts. *Current Biology*, *27*, 1-6.
- Price, G. D., Maeda, S., Omata, T., & Badger, M. R. (2002). Modes of active inorganic carbon uptake in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Functional Plant Biology*, *29*, 131-149.
- Ragon, M., Benzerara, K., Moreira, D., Tavera, R., & Lopez-Garcia, P. (2014). 16S rDNA-based analysis reveals cosmopolitan occurrence but limited diversity of two cyanobacterial lineages with contrasted patterns of intracellular carbonate mineralization. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 331.
- Riding, R. (2006). Cyanobacterial calcification, carbon dioxide concentrating mechanisms, and Proterozoic-Cambrian changes in atmospheric composition. *Geobiology*, *4*, 299-316.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., & Stanier, R. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, *111*, 1-61.
- Rouf, M. A. (1964). Spectrochemical Analysis of inorganic elements in bacteria. *Journal of Bacteriology*, *88*, 1545-1549.
- Saghaï, A., Zivanovic, Y., Zeyen, N., Moreira, D., Benzerara, K., Deschamps, P., ... López-García, P. (2015). Metagenome-based diversity analyses suggest a significant contribution

- of non-cyanobacterial lineages to carbonate precipitation in modern microbialites. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Saier, M. H., Reddy, V. S., Tsu, B. V., Ahmed, M. S., Li, C., & Moreno-Hagelsieb, G. (2016). The transporter classification database (TCDB): Recent advances. *Nucleic Acids Research*, 44, 372-379.
- Shuttleworth, K. L., & Unz, R. F. (1991). Influence of metals and metal speciation on the growth of filamentous bacteria. *Water Research*, 25, 1177-1186.
- Singh, S., & Mishra, A. K. (2014). Regulation of calcium ion and its effect on growth and developmental behavior in wild type and *ntcA* mutant of *Anabaena* sp. PCC 7120 under varied levels of CaCl_2 . *Microbiology*, 83, 235-246.
- Stewart, M., Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., Shuman, H., Lindsay, J. A., & Murrell, W. G. (1980). Distribution of calcium and other elements in cryosectioned *Bacillus cereus* T spores, determined by high-resolution scanning electron probe x-ray microanalysis. *Journal of Bacteriology*, 143, 481-491.
- Team R. C. (2013) R: A language and environment for statistical computing.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673–4680.
- van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Konings, W. N., & Zehnder, A. J. B. (1994). Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 33, 1766-1770.
- Waditee, R., Hibino, T., Tanaka, Y., Nakamura, T., Incharoensakdi, A., & Takabe, T. (2001). Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains an Na^+/H^+ antiporter, homologous to eukaryotic ones, with novel ion specificity affected by C-terminal tail. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 36931-36938.
- Waditee, R., Hossain, G. S., Tanaka, Y., Nakamura, T., Shikata, M., Takano, J., ... Takabe, T. (2004). Isolation and functional characterization of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporters from cyanobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 4330-4338.

- Webb, L. E. (1988). Calcium dependence of the filamentous bacterium *Haliscomenobacter hydrossis*. *Water Research*, 22, 1317-1320.
- Warren, L. A., & Ferris, F. G. (1998). Continuum between sorption and precipitation of Fe(III) on Microbial Surfaces. *Environmental Science & Technology*, 32, 2331-2337.
- Yu, X. C., & Margolin, W. (1997). Ca²⁺-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *Embo Journal*, 16, 5455-5463.

3. Impact des alcalino-terreux sur la croissance des cyanobactéries formant des ACC intracellulaires

Nous avons également réalisé des expériences similaires à certaines évoquées précédemment (sans duplicats), en ajoutant soit du Ba, soit du Sr, dans des milieux de culture de 3 cyanobactéries produisant des ACC intracellulaires (*G. lithophora* C7, *S. sp.* PCC 6312 et *C. sp.* PCC 7425), carencées en alcalino-terreux (c'est-à-dire mises à pousser dans du BG-11 avec 50 μM de Ca) afin de déterminer si le strontium ou le baryum pouvaient être des substituts au Ca pour la croissance de ces cellules. Pour cela, nous avons divisé des cultures de cyanobactéries poussant avec 50 μM de Ca en 4 après un mois de croissance (on considère que ces cultures étaient en phase stationnaire). Puis, nous avons ajouté 200 μM de Ca dans l'une des cultures, 200 μM de Sr dans la 2^{ème}, 200 μM de Ba dans la 3^{ème} et enfin rien dans la dernière. Les cultures étaient sous agitation (120 rpm) et lumière (5 - 10 $\mu\text{mol photon. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) continue (excepté pour *G. lithophora* à 2,5 - 5 $\mu\text{mol photon. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$), et à 30 °C pendant 1 mois. Nous avons suivi la croissance en mesurant la DO à 730 nm et l'incorporation des différents alcalino-terreux par l'observation des ACC intracellulaires au MET.

3.1. Le Sr et Ba, des substituts au Ca pour la croissance des cyanobactéries ACC+

Nous avons mis en évidence des différences dans la capacité à utiliser le Sr et Ba comme substitut au Ca (**Fig. 6**). L'ajout des alcalino-terreux dans le milieu de culture carencé en Ca relance la croissance de *G. lithophora* quel que soit l'alcalino-terreux ajouté ($\Delta\text{DO}_{730\text{nm}}$ compris entre 7,1 et 6,6 ; **Tableau 3**) (**Fig. 6A**). *Synechococcus sp.* PCC 6312 repousse mieux avec l'ajout de Ca qu'avec du Sr et du Ba (**Fig. 6B**). Cependant, les $\Delta\text{DO}_{730\text{nm}}$ chez cette souche montrent une relance de la croissance relativement faible par rapport à *G. lithophora* (**Tableau 3**). Enfin, pour la culture de *Cyanothece sp.* PCC 7425 la croissance reprend avec l'ajout de Ca ($\Delta\text{DO}_{730\text{nmCa}} = 3,4$) ; ceci est un peu moins marqué avec le Sr $\Delta\text{DO}_{730\text{nmSr}} = 2,1$) (**Fig. 6C** ; **Tableau 3**). En revanche, la croissance ne reprend pas avec l'ajout de Ba comparativement à la culture ou rien n'a été ajouté ($\Delta\text{DO}_{730\text{nmBa}} = 0,6$) (**Fig. 6C** ; **Tableau 3**).

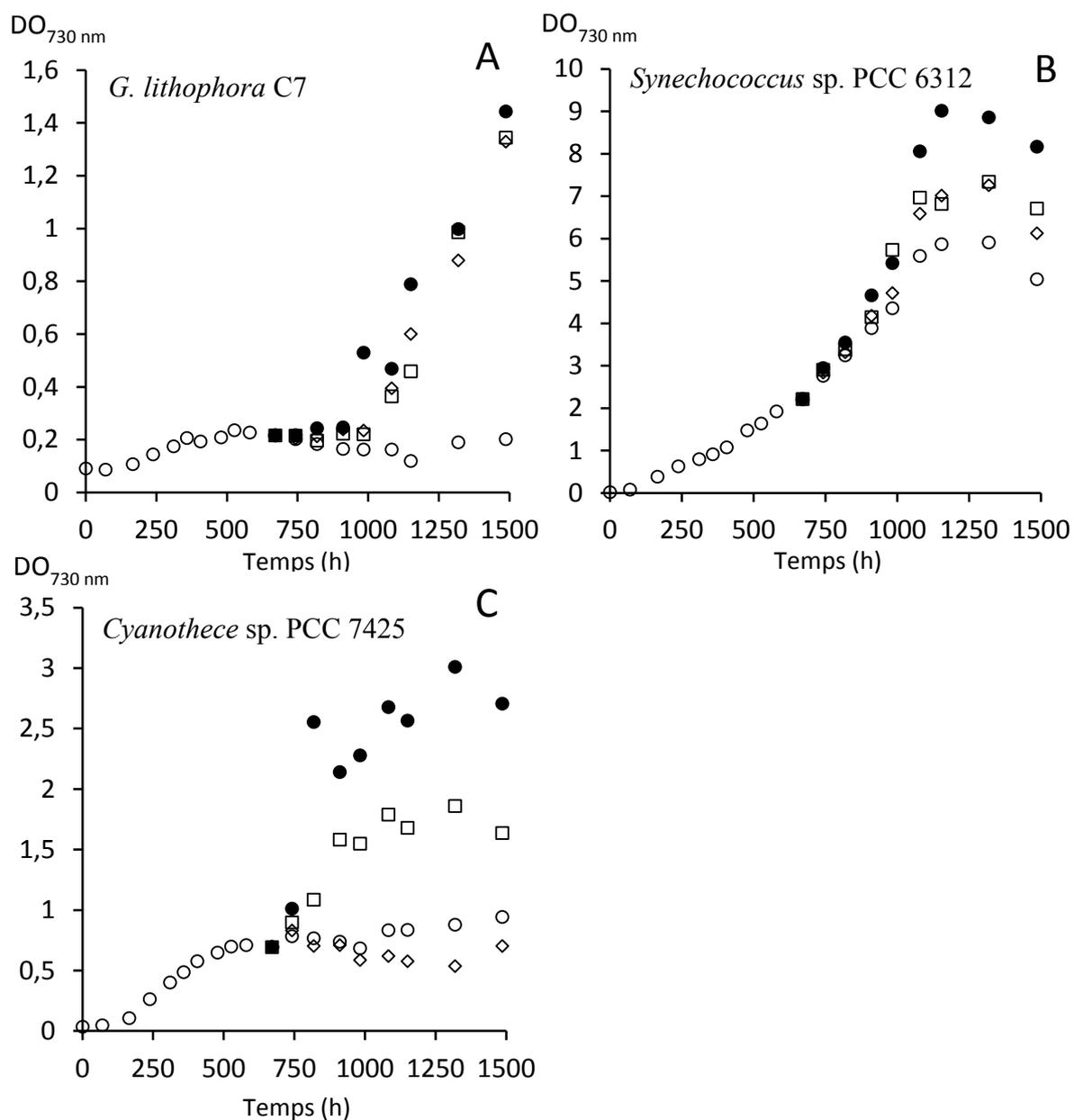


Figure 6. Graphique de la croissance de (A) *G. lithophora*, (B) *S.* sp PCC 6312 et (C) *C.* sp. PCC 7425 dans un milieu BG11 avec 50 μM de Ca puis avec ajout à 670 h de 200 μM de Ca (●), 200 μM de Sr (□), 200 μM de Ba (◇) ou rien (○) au cours du temps.

| Souches | $\Delta\text{DO}_{730\text{nm}}\text{Ca}$ | $\Delta\text{DO}_{730\text{nm}}\text{Sr}$ | $\Delta\text{DO}_{730\text{nm}}\text{Ba}$ |
|-----------------------------------|---|---|---|
| <i>G. lithophora</i> | 7,1 | 6,6 | 6,6 |
| <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312 | 1,5 | 1,2 | 1,2 |
| <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425 | 3,4 | 2,1 | 0,6 |

Tableau 3. Présentation des variations de croissance ($\Delta\text{DO}_{730\text{nm}}$) calculées à partir des ratios des DO_{730nm} finales au bout de 670 heures d'incubation après l'ajout de Ca, Sr et Ba par rapport à la condition sans ajout.

Ainsi nous avons montré que le Ba et le Sr pouvaient se substituer au Ca pour la croissance des souches de cyanobactéries *G. lithophora* et *Synechococcus* sp. PCC 6312. Cependant, la biomasse produite par *Synechococcus* sp. PCC 6312 est moins importante avec du Sr et Ba. Contrairement, aux deux autres souches de cyanobactéries ; seul le Sr peut se substituer au Ca dans la croissance de *Cyanothece* sp. PCC 7425. On sait que le Sr et le Ba ont des configurations électroniques identiques au Ca, mais ils diffèrent par leurs masses molaires (40,01 g/mol le calcium, 87,62 g/mol pour le strontium et 137,33 pour le baryum) et par leurs rayons ioniques effectifs (rayons ioniques non solvatés : 1,06 Å pour le Ca²⁺, 1,21 Å pour le Sr²⁺ et 1,38 Å pour le Ba²⁺) (Shannon, 1976). Cette similarité avec le calcium permet au strontium notamment de se substituer à ce dernier dans les mécanismes biologiques (Bihler et al., 1986 ; Boussac et al., 2004). Il a été montré que le Sr²⁺ peut se substituer *in vitro* au Ca²⁺ dans le complexe Ca²⁺-Mn₄ du photosystème II qui est un complexe enzymatique permettant la photosynthèse (Boussac et al., 2004). En effet, le photosystème II avait un rendement quantique équivalent au Ca²⁺ lorsque le Sr²⁺ était présent.

Ici, les résultats obtenus pour *Synechococcus* sp. PCC 6312 montre une croissance plus importante lorsque l'on ajoute du Ca dans le milieu de culture carencé en alcalino-terreux ($\Delta DO_{730nm}Ca$). Les résultats présentés dans le manuscrit pour ces souches montrent que ce n'est pas forcément le cas. Les expériences réalisées dans le manuscrit et présentées ci-dessus n'ont pas été faites dans les mêmes conditions. En effet, dans l'expérience réalisée dans le manuscrit nous avons cultivé les cellules de cyanobactéries dans un milieu avec des vitamines B12 ce qui n'est pas le cas dans les cultures présentées ici. La vitamine B12 est un élément favorisant la croissance des bactéries en général. Cette vitamine a pu favoriser la croissance dans la culture avec 50 µM de Ca (*résultats du manuscrit*). De plus, le Ca n'a pas été ajouté au même temps d'incubation, c'est-à-dire que les cultures sont à des phases de croissance potentiellement différentes (Ca ajouté à 28 jours d'incubation *ci-dessus* ; 22 jours *dans le manuscrit*). Enfin, ici nous n'avons pas réalisé les expériences en duplicat rendant les résultats statistiquement peu fiables par rapport aux résultats du manuscrit. Quoi qu'il en soit, on voit bien qu'ici les paramètres influençant la croissance de *Synechococcus* sp. PCC 6312 peuvent être nombreux. Il est possible que les cyanobactéries ACC⁺ au niveau du septum de division aient des mécanismes cellulaires utilisant le Ca très différents de celles les produisant dispersés dans le cytoplasme expliquant les différences observées ou non entre les deux expériences (manuscrit ; *ci-dessus*). Des expériences de culture supplémentaires avec plusieurs répliques en reproduisant les conditions présentées ci-dessus pourrait aider à confirmer ou non ces résultats.

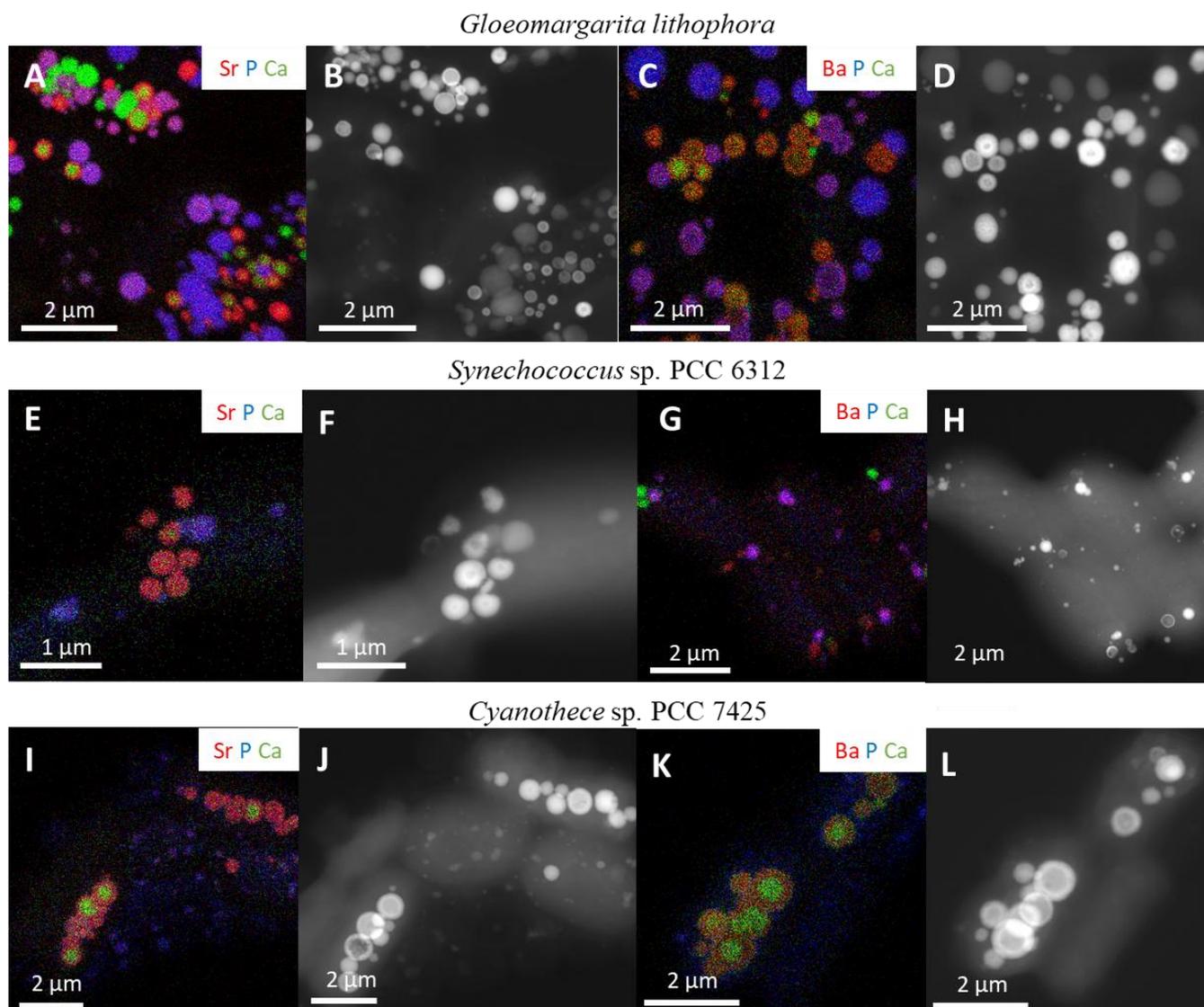


Figure 7. Analyses en STEM HAADF-EDXS des 3 souches de cyanobactéries testées pour leur capacité à utiliser le Sr et Ba en substitut du Ca. (A et C) et (B et D) : cartographie EDXS et image STEM-HAADF de *G. lithophora* C7 après 1 mois de croissance dans un milieu carencé en Ca + 200 μ M de Sr (A et B) ou Ba (C et D). (E et G) et (F et H) : cartographie EDXS et image STEM-HAADF de *Synechococcus* sp. PCC 6312 après 1 mois de croissance dans un milieu carencé en Ca + 200 μ M de Sr (E et F) ou Ba (G et H). (I et K) et (J et L) : cartographie EDXS et image STEM-HAADF de *Cyanothece* sp. PCC 7425 après 1 mois de croissance dans un milieu carencé en Ca + 200 μ M de Sr (I et J) ou Ba (K et L). Pour toutes les cartographies EDXS, le calcium est en vert, le phosphore en bleu et le strontium ou le baryum en rouge. Par conséquent, les carbonates de calcium apparaissent en vert, les carbonate de strontium ou baryum en rouge et les granules de PolyP en bleu ou violet (lorsqu'il y a du strontium ou du baryum).

Des observations en MET ont été réalisées sur les différentes cultures au bout de 670 heures de croissance après l'ajout de Sr et Ba afin de déterminer où ces éléments chimiques ont été stockés dans les cellules des différentes souches de cyanobactéries produisant les ACC intracellulaires. Premièrement, on note que le Sr et Ba ont été stockés dans les inclusions

intracellulaires d'ACC et les PolyP des souches de cyanobactéries *G. lithophora* et *Cyanothece* sp. PCC 7425 (**Fig. 7A-D et I-L**). Ceci a également été décrit par Cam et al. (2018). En effet, dans cette étude il a été montré que le Sr et Ba se fixent aux inclusions de Ca préexistant en formant une coque et/ou créent de nouvelles inclusions de carbonates de Sr ou Ba (Cam et al., 2018). Nous avons mis en évidence l'incorporation de Sr ou Ba dans les inclusions intracellulaires d'ACC et les PolyP de *Synechococcus* sp. PCC 6312 (**Fig. 7E-H**). De la même manière, on observe un cœur de Ca et une coque de Sr ou de Ba au niveau des inclusions d'ACC. Cependant, on ne l'observe pas dans le cas du Ba.

Le cas de *Cyanothece* sp. PCC 7425 est intéressant. En effet, il semble qu'elle soit capable d'utiliser le Sr et le Ba comme substitut au Ca dans la formation des ACC intracellulaires. Cependant, le Ba n'a pas relancé sa croissance. Au contraire, le Ba a relancé la croissance de *G. lithophora* et *Synechococcus* sp. PCC 6312. Ceci montre qu'elles peuvent utiliser le Sr, mais également le Ba dans de potentielles mécanismes cellulaires et peut être de manière aussi efficace que le Ca au moins pour *G. lithophora* (Boussac et al., 2004). De plus dans ces expériences, les cellules possèdent un stock initial de Ca. Par conséquent, s'il leur faut un minimum de Ca pour leur croissance elles pourraient l'utiliser pendant plusieurs générations. Cependant, cela impliquerait que leur grand besoin en alcalino-terreux est utilisé pour des mécanismes autres que la croissance cellulaire. Ainsi dans le cadre de ces autres mécanismes, on peut avoir un remplacement du Ca par Sr ou Ba au moins pour certaines comme souches de cyanobactéries comme *G. lithophora* ou encore *Synechococcus* sp. PCC 6312 souches, alors que d'autres ne peuvent pas remplacer le Ca comme c'est le cas pour *Cyanothece* sp. PCC 7425 lorsqu'elle pousse avec du Ba. Les prochaines expériences pourront vérifier si les cyanobactéries ACC+ si elles ont besoin d'un réservoir indispensable de Ca ou pas pour leur croissance. Dans le but de comprendre s'il y a deux « types » de réserves/stocks d'alcalino-terreux. Le premier pourrait être constitué que de Ca (selon les résultats des futures expériences) et utilisé dans le cadre de la croissance cellulaire par exemple. Le deuxième pourrait être plus abondant et qui pour certaines souches pourrait être autre chose que du Ca, Sr ou Ba.

4. Perspectives

Dans cette étude nous avons mis en évidence la capacité des cyanobactéries produisant des inclusions d'ACC à fortement incorporer le Ca. Le Ca est alors stocké dans deux compartiments, les ACC intracellulaires et les PolyP. En outre, nous avons mis en évidence qu'elles ont relativement plus de Ca (par rapport au P) dans leurs polyP par rapport aux autres cyanobactéries. Par ailleurs, nous avons recherché des systèmes de transport de phosphate

inorganique (PitB dans *E. coli*) qui est capable de transporter des complexes de cations neutres divalents- HPO_4 dans certaines conditions (van Veen et al., 1994). Cela pourrait relier l'absorption de Ca à la séquestration de P, entraînant la formation de granules de polyphosphates riche en Ca chez ces cyanobactéries (par exemple, Cam et al., 2018 ; Blondeau et al., 2018a). Cependant, ces systèmes de transport n'ont été détectés que dans certaines cyanobactéries ACC+. Ainsi, la relation entre ACC intracellulaires et PolyP chez les cyanobactéries produisant des inclusions d'ACC n'est pas claire. En effet, il est possible que les PolyP soit 1) la première étape de stockage du Ca puis est stocké secondairement dans les ACC intracellulaires, 2) que le Ca est stocké premièrement dans les ACC intracellulaires puis secondairement dans les PolyP ou enfin 3) qu'il n'y ai pas de relation entre ces deux compartiments et que finalement ce soit juste deux tampons intracellulaires pour réguler finement l'homéostasie du Ca. Il est donc important de rechercher le rôle et les mécanismes reliant ou non les ACC intracellulaires aux PolyP en traçant le Ca^{2+} entrant par une sonde comme celles utilisée Guida et Garcia-Pichel (2016). Il serait possible de visualiser si le calcium marqué va préférentiellement dans les polyphosphates ou dans les ACC intracellulaires en utilisant un microscope confocal à balayage laser. Une étape de corrélation en MEB-EDXS serait nécessaire afin de différencier les polyP des ACC intracellulaires.

Les expériences réalisées sur l'impact du Sr et Ba sur les cyanobactéries ACC+ nous ont permis de montrer que *Synechococcus* sp. PCC 6312 était également capable d'incorporer ces alcalino-terreux et qu'ils pouvaient être des substituts au Ca. Une des applications des travaux réalisés sur l'incorporation du Sr et Ba et la possibilité d'utiliser les souches de cyanobactéries ACC+ dans la bioremédiation des alcalino-terreux. En effet, des expériences réalisées au CEA de Cadarache et au MIT par Neha Mehta ont mis en évidence la capacité de *G. lithophora* à incorporer le Sr radioactif et du Radium (données non publiée). On pourrait imaginer des systèmes de bioremédiation mettant en œuvre ce type de microorganismes afin qu'ils incorporent les alcalino-terreux radioactifs retrouvés dans l'environnement lors d'accident de centrales nucléaires. Cela serait un substitut aux méthodes conventionnelles qui sont parfois très peu écologiques. Cependant, il faut répondre a beaucoup de questions avant de pouvoir savoir si elles peuvent dépolluer : comme par exemple quelle concentration minimale elles laissent dans l'environnement après l'incorporation ? dans quelles conditions elles le font, notamment de salinité ? Y-a-t-il un risque qu'elles appauvrissent le milieu en Ca ? Comment les isoler du milieu contaminer afin de les récupérer facilement et qu'il n'ait aucun risque de contamination ? Quels sont les coûts de développement d'un tel système ?

Références

- Bihler, I., Charles, P., & Sawh, P. C. (1986). Effects of strontium on calcium-dependent hexose transport in muscle. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *64*(2), 176-179.
- Blondeau, M., Sachse, M., Boulogne, C., Gillet, C., Guigner, J.-M., Skouri-Panet, F., ... Benzerara, K. (2018a). Amorphous Calcium Carbonate Granules Form Within an Intracellular Compartment in Calcifying Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, *9*.
- Boussac, A., Rappaport, F., Carrier, P., Verbavatz, J.-M., Gobin, R., Kirilovsky, D., ... Sugiura, M. (2004). Biosynthetic $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ Exchange in the Photosystem II Oxygen-evolving Enzyme of *Thermosynechococcus elongatus*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(22), 22809-22819.
- Cam, N., Benzerara, K., Georgelin, T., Jaber, M., Lambert, J.-F., Poinso, M., ... Jézéquel, D. (2018). Cyanobacterial formation of intracellular Ca-carbonates in undersaturated solutions. *Geobiology*, *16*(1), 49-61.
- Guida, B. S., & Garcia-Pichel, F. (2016). Extreme cellular adaptations and cell differentiation required by a cyanobacterium for carbonate excavation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*, 5712-5717.
- Shannon, R. D. (1976). Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallographica Section A: Crystal Physics, Diffraction, Theoretical and General Crystallography*, *32*(5), 751-767.
- Vakulovsky, S. M., Nikitin, A. I., Chumichev, V. B., Katrich, I. Y., Voitsekhovich, O. A., Medinets, V. I., ... Khersonsky, E. S. (1994). Cesium-137 and strontium-90 contamination of water bodies in the areas affected by releases from the chernobyl nuclear power plant accident: an overview. *Journal of Environmental Radioactivity*, *23*(2), 103-122.
- van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Konings, W. N., & Zehnder, A. J. B. (1994). Translocation of Metal phosphate via the Phosphate Inorganic Transport System of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, *33*(7), 1766-1770.

Chapitre II. Formation primaire et diagenétique de silicates de magnésium de faible cristallinité dans les lacs alcalins du Mexique

1. Introduction

1.1. Des silicates de magnésium hydratés, peu cristallisés et de basses températures comme indicateurs des conditions physico-chimiques

Par des observations en microscopie électronique à balayage associées à des analyses EDXS et des analyses minéralogiques en DRX, Tettenhorst et Moore (1978) ont suggéré que les stromatolites la formation éocène de Green River sont composées de stévensite à leur cœur et entourés d'une matrice composée de calcite et de quartz. Les auteurs ne parvinrent pas à expliquer la présence de stévensite dans ces stromatolites dont cette formation de Green River est liée à des dépôts lacustres. Depuis, les phases mal cristallisées de silicates-Mg, par exemple la stévensite (groupe minéral des smectites), la kérolite et la sépiolite, ont été abondamment décrites dans différents environnements comme des composants authigènes importants des microbialites dans les lacs salins et alcalins modernes (Léveillé et al., 2000a, 2002 ; Souza-Egipsy et al., 2005 ; Burne et al., 2014 ; Zeyen et al., 2015 ; Pace et al., 2016).

Des études précédentes se sont intéressées à la caractérisation des microbialites et des eaux de surface des lacs alcalins mexicains situés dans la ceinture volcanique trans-mexicaine (TMVB, « trans Mexican volcanic belt ») (Zeyen et al., 2015). Des analyses minéralogiques en DRX et FTIR couplées à des analyses en MEB-EDXS ont permis de mettre en évidence la présence de silicates-Mg dans les microbialites de plusieurs lacs. En effet, les microbialites des lacs de La Preciosa et Atexcac ont montré une forte abondance de silicates-Mg peu cristallisés, interprétés comme étant de la kérolite (Zeyen et al., 2015). *A contrario*, les microbialites du nord et de l'ouest du lac d'Alchichica, montrent une absence ou très faible présence de silicates-Mg (1 à 3 % en masse de talc) sauf pour un échantillon de microbialite du nord du lac prélevé à 10 m de profondeur où ont été retrouvées de plus grandes quantités (16% en masse de talc) (Saghai et al., 2015). Dans une autre étude sur les microbialites de l'Ouest et du Nord du même lac, ont confirmé qu'il n'y avait pas ou quasiment pas de silicate-Mg (Zeyen et al, 2017). Fait intéressant, les silicates-Mg retrouvés dans les microbialites remplacent dans certains cas la silice amorphe des frustules de diatomées ou perminéralisent des microorganismes dans les biofilms fossiles montrant la capacité exceptionnelle de cette phase minérale à préserver les microfossiles (Zeyen et al., 2015). Cette capacité qu'ont les silicates de magnésium à fossiliser de manière exceptionnelle les microfossiles est très intéressante lorsque l'on veut étudier les traces de vie passées. De plus des auteurs ont

proposé que ces phases pourraient être les premières à précipiter dans les stromatolithes et qu'elles pourraient par la suite être remplacées par les carbonates (Burne et al., 2014 ; Zeyen et al., 2015 ; Pace et al., 2016).

Dans la littérature, on considère que ces phases silicatées se forment directement dans la colonne d'eau. Comme les minéraux formés de cette manière enregistrent souvent la composition de la solution primaire et ses fluctuations dans le temps, les Mg-silicates ont joué un rôle important dans la construction de modèles de faciès dans les milieux lacustres modernes et des mers (Millot, 1970; Jeans, 1971; Weaver et Beck, 1977; Stoessell et Hay, 1978; Jones et Weir, 1983; Bertani et Carozzi, 1985a ; 1985b ; Jones, 1986; Webster & Jones, 1994; Chahi et al., 1999, Deocampo, 2004, Deocampo et al., 2009; Jones et Conko, 2011; Bristow et al., 2012). Hardie et Eugster (1970) et Eugster & Jones (1979) ont reconnu très tôt que les Mg-silicates agissaient comme des précipités évaporatifs précoces. Webster et Jones (1994) ont montré que les argiles authigènes sont sensibles aux variations de salinité induites par l'évaporation. Ainsi, la sépiolite de formule chimique $Mg_4Si_6O_{15}(OH)_2 \cdot 6(H_2O)$ serait formée dans un environnement saumâtre, avec un degré de salinité intermédiaire entre l'eau douce et l'eau de mer, alors que la présence de smectites magnésiennes pourrait refléter des conditions plus salines des lacs (Webster et Jones, 1994). La palygorskite $(Mg,Al)_2Si_4O_{10}(OH) \cdot 4H_2O$ précipiterait, quant à elle, dans des eaux interstitielles de sols arides dans des environnements de type lacs éphémères (plages) lors d'importants épisodes de dessiccation d'un lac. De plus, cette étude montre que la distribution séquentielle de la minéralogie des argiles peut être un indicateur des fluctuations du niveau de l'eau des lacs. De la même manière, la formation de Doushantuo (sud de la Chine) abritant les plus anciens organismes métazoaires à l'Ediacarien (635-551 Ma) contient des assemblages d'argiles. Bristow et al. (2009) ont mis en évidence la présence de saponite et interprété l'environnement comme non marin car la saponite ne se forme que dans un environnement alcalin avec un pH supérieur à 9. Par ailleurs, au cours de l'étude de séquences sédimentaires argileuses de lacs situés à l'est de l'Afrique, Deocampo (2004) c'est intéressé au rapport $Mg/(Al+Fe)$ de ces phases. Un rapport inférieur à 0,1 indiquerait la présence d'argiles dioctaédriques et d'un environnement de dépôt de type sol ou bien la présence d'une source détritique, alors qu'un rapport supérieur à 4 traduirait la présence d'argiles trioctaédriques se formant dans des environnements de type lacs salins et alcalins. Ainsi, il a été proposé que les argiles trioctaédrique se formaient de manière primaire et par conséquent qu'elles peuvent ainsi être des indicateurs des conditions physico-chimiques régnant dans les paléo-

environnements (Deocampo 2004 ; Zeyen et al., 2015). D'où le travail consistant à comprendre quelles sont les conditions physico-chimiques indispensables à leur formation car leur présence devient un (paleo-)indicateur de ces conditions.

Alternativement, cette phase pourrait peut-être se former secondairement lors de la diagénèse. L'observation au microscope électronique en transmission couplée à de la microdiffraction ont permis de mettre en évidence des frustules de diatomées dans les sédiments des lacs salés de l'Altiplano bolivien complètement remplacées par une smectite-Mg peu cristallisée (Badaut et Risacher, 1982). Ainsi, les auteurs proposent qu'au début de la diagénèse, l'évolution de l'opale biogénique (dissolution, transformation, persistance) est indéniablement conditionnée par des facteurs géochimiques tels que la chimie des solutions et l'environnement minéralogique dans le gisement. D'ailleurs, Kastner et al. (1977) ont fournis des preuves expérimentales de l'influence de facteurs géochimiques sur la transformation de l'opale biogénique en opale cristalline ou quartz. De plus, Lancelot et Allegre (1976) ont observé l'influence de la composition du sédiment hôte sur le même processus évolutif (opale amorphe - opale cristalline ou quartz). Ainsi on voit bien que ces phases ne seraient plus vraiment des enregistrements des conditions de la colonne d'eau mais plutôt des processus ayant lieu dans les sédiments. Donc, il est important de bien déterminer si ces phases sont primaires ou diagénétique.

1.2. Conditions géochimiques de formation des silicates-Mg peu cristallisés

Le fait que l'on retrouve des silicates de magnésium ou non dans les microbialites de différents lacs suggère que la chimie des solutions pourrait être importante dans la formation de ces silicates de magnésium. C'est pourquoi un certain nombre d'études se sont intéressées aux paramètres chimiques nécessaires pour la formation des silicates de magnésium peu cristallisés. Tosca et al. (2011) ont montré par des calculs thermodynamiques qu'à un pH au-dessus de 8,6 l'espèce H_4SiO_4 se déprotone favorisant l'espèce $H_3SiO_4^-$. Ainsi, à des pH plus élevé la concentration de complexe silice-Mg (par exemple $MgH_3SiO_4^+$) augmente. Le complexe silice-Mg permet par la suite de potentiellement former des précipités de silicate-Mg. Dans la littérature, les phases de silicate-Mg ont été observées dans les lacs d'Atexcac et La Preciosa ayant des pH supérieurs à 8,6 (Zeyen et al., 2015). Cependant, on retrouve également la présence de silicates de magnésium dans des microbialites de lacs montrant des pH inférieurs similaire à celui de l'eau de mer à savoir 8,2, comme par exemple le lac de Clifton (Australie) et le grand lac salé (Utah, USA) (Burne et al., 2014 ; Pace et al., 2016). Bien entendu, il est possible que ces silicates de Mg se

soient formés à des moments où le pH était plus élevé à l'échelle du lac ou localement dans le biofilm à cause de l'activité microbienne. Ainsi, on voit bien que le pH mesuré dans l'eau ne permet pas d'évaluer la présence de silicate de Mg dans un environnement.

Les analyses chimiques de l'eau de surface des lacs de La Preciosa et d'Atexcac ont montré qu'ils sont particulièrement riches en silice dissoute (1,04 mM et 0,57 mM pour le lac Atexcac et le lac La Preciosa, respectivement), mais en dessous de la saturation de la silice amorphe. Les deux lacs avaient également des fortes teneurs en Mg^{2+} (24,4 mM et 8,1 mM pour le lac Atexcac et le lac La Preciosa, respectivement) et des pH alcalins de 8,75 pour le lac d'Atexcac et 8,9 pour le lac de La Preciosa. Ainsi les auteurs ont montré que l'eau de ces lacs étaient situés au-dessus de la ligne de solubilité de la « sépiolite amorphe » décrite par Wollast et al. (1968) au moment où les échantillons ont été prélevés (Zeyen et al., 2015). Contrairement aux deux précédents lacs, le lac d'Alchichica qui se trouve dans la même région présente des teneurs en silice dissoute très faibles dans la colonne d'eau du milieu et du nord du lac, de l'ordre de 0,001 mM (Każmierczak et al., 2011 ; Saghāi et al., 2015 ; Zeyen et al., 2017). Alors que les eaux de surface de l'ouest du lac ainsi que les eaux en profondeur (55 m) montrent des $[H_4SiO_4]$ 30 fois plus fortes avec des valeurs respectives de 0,025 et 0,03 mM au moment où les échantillons ont été prélevés (Każmierczak et al., 2011). Ainsi, quand les eaux de surface du milieu du lac sont sous-saturées par rapport à la sépiolite et la kérolite, celles de l'ouest sont sursaturées par rapport à ces phases (Thèse Nina Zeyen). Cependant, les eaux de l'ouest (éventuellement probable pour le fond du lac à partir de 55 m) restent sous-saturées par rapport à la « sépiolite amorphe » décrite par Wollast et al. (1968). D'autre part la teneur en Mg^{2+} du lac est élevée de l'ordre de 18 mM avec un pH de 9,05 permettant donc la déprotonation d' H_4SiO_4 . Finalement, en compilant les différentes données géochimiques de différents lacs alcalins mexicains, Zeyen et al. (2017) ont proposé que la présence de ces silicates-Mg pouvait être utilisé comme un indicateur paléogéochimique indiquant une concentration minimale de Si de 0,16 mM dans le lac où il s'est formé.

1.3. Objectifs

C'est dans ce contexte que nous avons étudié des sédiments dans 3 systèmes lacustres situés dans la TMVB (Ferrari et al., 2012). Il s'agit de carottes sédimentaires des lacs La Preciosa, Atexcac, Alchichica rapportés au laboratoire à la suite d'une campagne d'échantillonnage au Mexique en 2016. Nous nous sommes demandé si les sédiments se déposant au fond des lacs avaient la même minéralogie (notamment vis-à-vis des silicates de Mg) que les microbialites

analysés par Zeyen et al. (2015, 2017), qui, eux, provenaient principalement d'eaux peu profondes (0 à 15m) et si par conséquent le message que les sédiments livrent est identique à celui livré par les microbialites. Il est également question de déterminer si la minéralogie des sédiments varie en profondeur. Des silicates-Mg sont-ils présents dans les sédiments ? Sont-ils de la même nature que ceux retrouvés dans les microbialites ? Sont-ils en lien avec des microorganismes ? Ces silicates peuvent-ils nous donner des informations sur la chimie des lacs ? Peut-on distinguer les silicates de magnésium formés dans la colonne d'eau de manière authigène vis-à-vis de ceux formés secondairement dans le sédiment lors de la diagenèse ? Dans un premier temps plusieurs analyses à différentes échelles de caractérisation ont été combinées : la composition minéralogique des sédiments a été analysée à l'échelle globale par DRX et FTIR. Nous avons obtenu des analyses chimiques de ce sédiment par ICP-AES permettant de calculer les abondances relatives des phases dans certains cas en fonction de la profondeur. Des analyses chimiques des eaux porales ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec Didier Jezequel (IPGP). Enfin, nous avons étudié certains de ces sédiments à l'échelle submicrométrique par MEB.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Carottes sédimentaires prélevées dans les lacs alcalins mexicains

Les lacs étudiés sont des lacs de cratères de volcans appartenant à la TMVB (« trans Mexican volcanic belt »), un arc volcanique continental qui suit une orientation Est-Ouest. La TMVB s'étend sur près de 1000 km de long et 20 à 100 km de large, sur une superficie d'environ 160 000 km² (Ferrari et al., 2012) (**Fig. 1A**).

La TMVB est associée à la subduction des plaques Rivera et Cocos sous l'Amérique du Nord dans la fosse centraméricaine durant le Néogène (Ferrari et al., 2012). Deux types de roches volcaniques sont généralement décrits dans cette zone : (1) des roches calco-alcalines compatibles avec un environnement de subduction et (2) des roches alcalines ou de transition ayant des compositions similaires aux basaltes des îles océaniques (Gómez-Tuena et al., 2003). La TMVB héberge de nombreux volcans monogénétiques et boucliers, des dômes de lave et des bouches phréato-magmatiques, conduisant parfois à la formation de maars (Siebe et al., 2014). De tels exemples de maars sont les lacs Alchichica, La Preciosa et Atexcac, situés dans la région de Los

Llanos de San Juan (fig. 1B). Ces lacs se sont formés au cours du Pléistocène (0,33 Myr pour le lac Atexcac) (Carrasco-Núñez et al., 2007, Armienta et al., 2008). De plus, le lac Atexcac repose

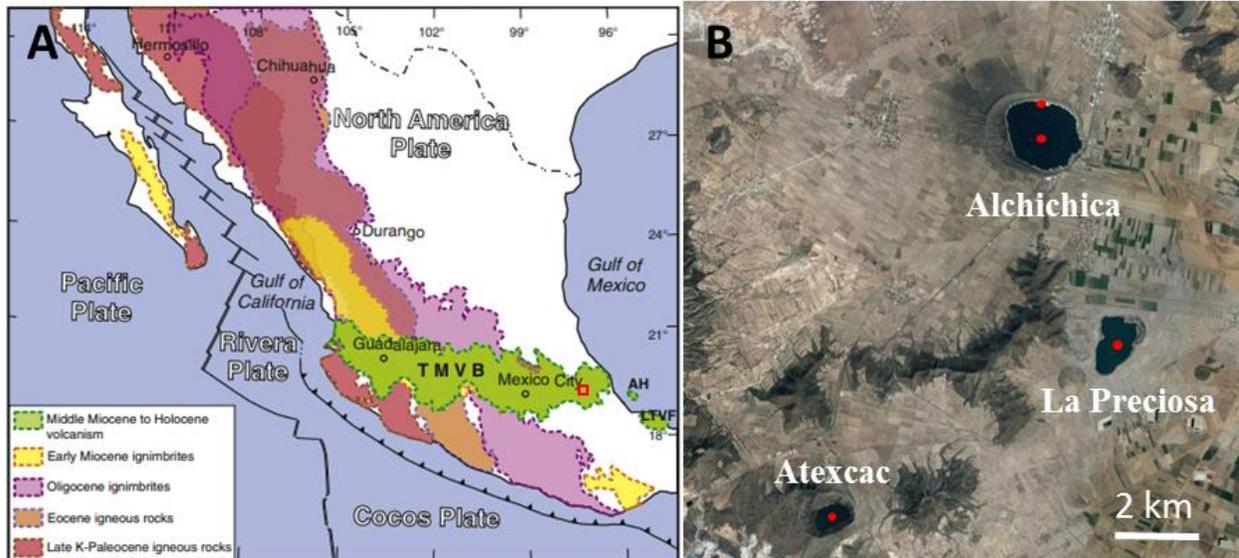


Figure 1. Localisation géographique des lacs étudiés. (A) Carte géologique représentant la localisation de la ceinture volcanique trans-mexicaine (zone verte) de Ferrari et al. (2012) et la localisation des lacs étudiés marqués par un carré rouge. (B) Image Google Earth des trois lacs étudiés. Les points rouges correspondent aux zones d'échantillonnage de mai 2016.

sur un grand sous-sol andésitique (Carrasco-Núñez et al., 2007). Les lacs étudiés sont situés à une altitude comprise entre 2320 m (Alchichica) à 2360 m (Atexcac) avec une profondeur variant de 39 mètres environ pour le lac d'Atexcac à environ 63 mètres pour le lac Alchichica (Carrasco-Núñez et al., 2007, Armienta et al., 2008). Des carottes sédimentaires ont été prélevées dans ces lacs en mai 2016 (**Fig. 1B**). Toutes les caractéristiques des carottes sont notées dans le **tableau 1**.

Tableau 1. Localisation, nom, profondeur et description des différentes sections des carottes sédimentaires étudiées.

| Localisation | Nom | Profondeur | Description |
|-------------------------------|--------------|------------|---------------------|
| Alchichica : au centre du lac | AL2016-C1_1 | 0-0,5 cm | boue très noire |
| | AL2016-C1_2 | 0,5-1 cm | boue très noire |
| | AL2016-C1_3 | 1-1,1 cm | boue très noire |
| | AL2016-C1_4 | 1,1-2,1 cm | boue plus claire |
| | AL2016-C1_5 | 2,1-3,1 cm | boue noire |
| | AL2016-C1_6 | 3,1-5,1 cm | boue noire |
| | AL2016-C1_7 | 5,1-7,1 cm | boue noire |
| | AL2016-C1_8 | 7,1-11 cm | boue noire |
| | AL2016-C1_9 | 11-15 cm | boue noire compacte |
| | AL2016-C1_10 | 15-19 cm | boue noire compacte |

| | | | |
|---|----------------|------------|--|
| | AL2016-C2_1 | 0-2 cm | Clair |
| Alchichica : sur la rive nord en subsurface | AL2016-C2_2 | 2-4 cm | Boue noir, avec quelques pièces dures |
| | AL2016-C2_3 | 4-6 cm | Boue noir, quelques pierres, morceaux de microbialite, sent le sulfure |
| | AL2016-C2_4 | 6-10 cm | Plus collant, également des morceaux durs, de couleur beaucoup plus |
| | AL2016-C2_5 | 10-14 cm | très gris et dur, morceaux durs très blancs |
| | AL2016-C2_6 | 14-18 cm | morceaux blancs super secs et friables, gris |
| La Preciosa : au centre du lac | Prec2016-C3_7 | 0-2 cm | - |
| | Prec2016-C3_8 | 2-4 cm | - |
| | Prec2016-C3_9 | 8-10 cm | - |
| | Prec2016-C3_10 | 18-20 cm | - |
| Atexcac : au centre du lac | Atx2016-C4_1 | 0-1 cm | beige orangé |
| | Atx2016-C4_2 | 1-3 cm | gris, collant et sec |
| | Atx2016-C4_3 | 3-5 cm | gris beige, sec |
| | Atx2016-C4_4 | 5-6,5 cm | brun foncé |
| | Atx2016-C4_5 | 6,5-9,5 cm | beige crème |
| Atexcac : au centre du lac | ATX2016-C5b_1 | 0-1 cm | beige orangé |
| | ATX2016-C5b_2 | 1-3 cm | gris |
| | ATX2016-C5b_3 | 3-4,5 cm | gris beige, sec |
| | ATX2016-C5b_4 | 4,5-6 cm | brun foncé |

Dans le lac d'Atexcac, 2 carottes ont été prélevées au même endroit à peu près, au centre du lac sous une tranche d'eau de 39 m de profondeur environ (**Fig. 2A**). Cependant dans cette étude nous nous intéresserons à une seule de ces carottes (Atx2016-C4), les deux carottes ayant des caractéristiques très proches.

Une carotte sédimentaire a été prélevée au centre du lac de La Preciosa à 40 m de profondeur (**Fig. 2B**).

Enfin deux carottes sédimentaires ont été prélevées dans le lac d'Alchichica : l'une au niveau de la rive nord du lac dans une petite crique à environ 1 m de profondeur sous l'eau, où très peu de silicates de magnésium avaient été retrouvés dans les microbialites (Zeyen et al., 2015) (**Fig. 2C**) ; la seconde a été prélevée à environ 60 m de profondeur au centre du lac (**Fig. 2D**).

Une fois les carottes prélevées, elles ont été sectionnées en plusieurs parties, sous atmosphère anoxique, selon les différentes teintes observées. Les eaux porales ont été prélevées en enfonçant des rhizons dans les sédiments permettant de récupérer environ 10 mL de solution à chaque fois. Les données de pH-métrie manquaient pour ces sédiments prélevés en 2016. Les pH que nous avons reportés pour les sédiments au centre du lac d'Alchichica et au centre du lac Atexcac sont ceux qui ont été mesurés lors d'une autre mission au Mexique qui a eu lieu en mars 2019. Aucun pH n'a été mesuré pour les eaux porales de la carotte sédimentaire au centre du lac

de La Preciosa et sur la rive Nord du lac d'Alchichica. L'alcalinité a été extrapolée des valeurs mesurées dans la colonne d'eau des lacs lors de la mission au Mexique de mai 2016 et qui ont été utilisées lors de la Thèse de Nina Zeyen soutenue en 2018 (**tableau 2**). Enfin, en plus des carottes sédimentaires, des échantillons de la colonne d'eau ont été prélevés à l'aplomb des carottes sédimentaires à différentes profondeurs lors de la mission en mai 2016. Les données acquises par Didier Jezequel (IPGP) sont compilées dans le **tableau 2**.

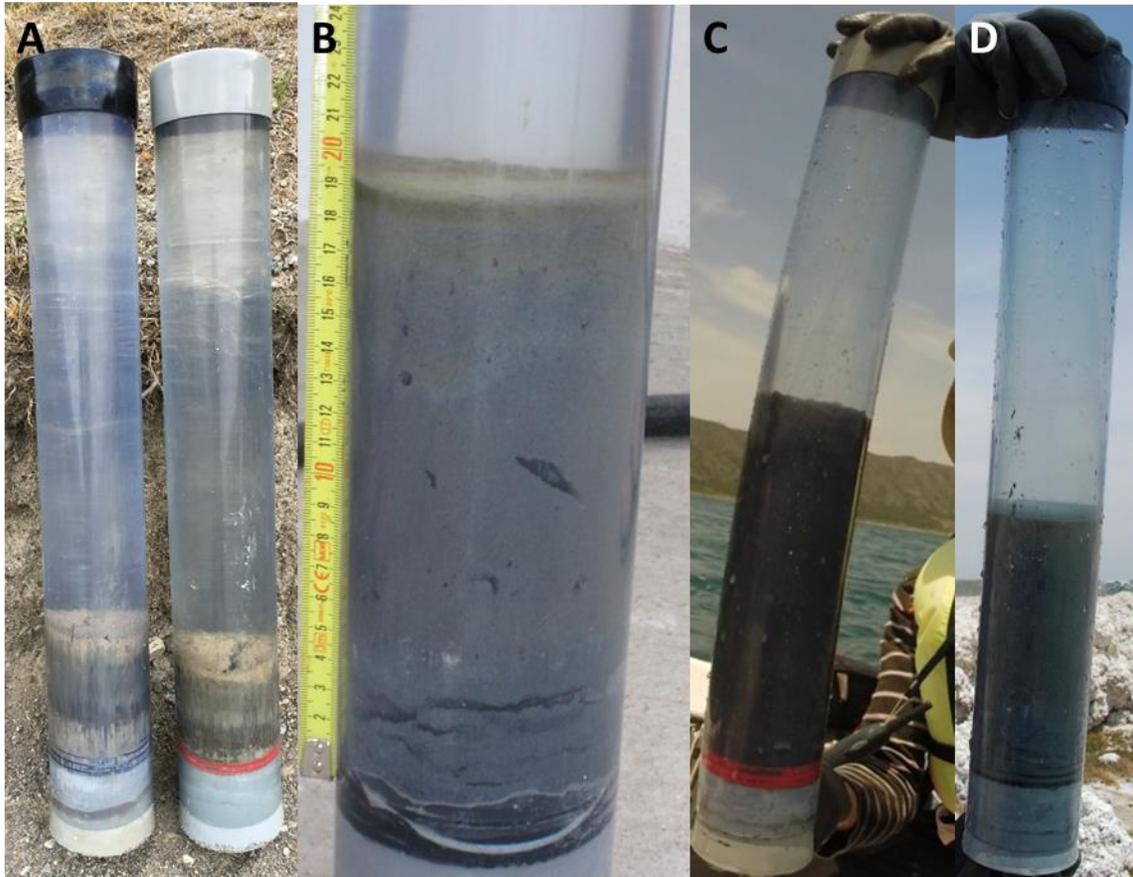


Figure 2. Images des carottes sédimentaires d'Atexcac (A), de la Preciosa (B) et d'Alchichica (C et D).

2.2. Chimie des eaux porales, des colonnes d'eau et des sédiments

2.2.1. Analyses chimiques globales des eaux porales et de la colonne d'eau par dosage multivarié par ICP-AES (Inductively coupled plasma - Atomic Emission Spectrometry)

L'ensemble des valeurs ont été compilées dans le **tableau 2** ci-dessous :

Tableau 2. Ici sont présentés les paramètres chimiques des solutions porales des différents échantillons de sédiment et de la colonne d'eau correspondant aux 3 lacs mexicains étudiés et les données chimiques obtenues en ICP-AES. * valeurs extrapolées. Les traits indiquent des valeurs en-dessous ou au-dessus de la gamme étalon. ND indique les valeurs non déterminées.

| Localisation | Nom | Profondeur (m et cm) | pH | Alcalinité (mM)* | Concentrations des cations majeurs (mM) | | | | | | |
|-------------------------|---|-------------------------|------|------------------|---|-------|--------|--------|--------|---------|---------|
| | | | | | Si | K | Mg | Ca | S | Na | |
| Alchichica | | | | | | | | | | | |
| | AL2016-0m | 0 | 9,13 | 43,05 | - | 6,086 | 16,007 | 0,179 | 11,862 | 113,007 | |
| | AL2016-5m | 5 | 9,13 | 43,05 | - | 6,172 | 15,970 | 0,169 | 12,097 | 114,051 | |
| Colonne d'eau au centre | AL2016-10m | 10 | 9,13 | 43,05 | - | 5,865 | 15,677 | 0,171 | 11,609 | 108,605 | |
| | AL2016-15m | 15 | 9,13 | 43,05 | - | 6,105 | 16,204 | 0,169 | 12,140 | 113,216 | |
| | AL2016-52,9m | 52,9 | 9,15 | 43,05 | 0,004 | 6,125 | 16,221 | 0,169 | 12,260 | 113,825 | |
| | AL2016-60,8m | 60,8 | 9,07 | 43,05 | 0,007 | 6,084 | 16,276 | 0,168 | 12,148 | 112,972 | |
| | AL2016-C1_1 | 0-0,5 | 8,95 | 43,05 | 0,373 | 6,200 | 15,832 | 0,157 | 11,570 | 113,912 | |
| | AL2016-C1_2 | 0,5-1 | 8,95 | 43,05 | 0,524 | 6,198 | 15,566 | 0,141 | 11,112 | 113,337 | |
| Sédiments au centre | AL2016-C1_3 | 1-1,1 | 8,76 | 43,05 | 0,694 | 6,048 | 14,507 | 0,122 | 9,521 | 109,440 | |
| | AL2016-C1_4 | 1,1-2,1 | 8,76 | 43,05 | 0,705 | 5,998 | 13,767 | 0,119 | 8,304 | 107,561 | |
| | AL2016-C1_5 | 2,1-3,1 | 8,76 | 43,05 | 0,694 | 6,056 | 13,577 | 0,140 | 7,273 | 107,752 | |
| | AL2016-C1_6 | 3,1-5,1 | 8,61 | 43,05 | 0,671 | 5,897 | 13,141 | - | 4,622 | 102,341 | |
| | AL2016-C1_7 | 5,1-7,1 | 8,53 | 43,05 | 0,616 | 5,860 | 12,776 | 0,323 | 3,989 | 101,871 | |
| | AL2016-C1_8 | 7,1-11 | 8,45 | 43,05 | 0,662 | 5,798 | 13,016 | - | 4,115 | 100,445 | |
| | AL2016-C1_9 | 11-15 | 8,42 | 43,05 | 0,570 | 5,451 | 12,198 | - | 0,720 | 92,789 | |
| | AL2016-C1_10 | 15-19 | 8,4 | 43,05 | 0,509 | 5,452 | 12,488 | 0,112 | 0,116 | 91,432 | |
| | Sédiments 1 m sous la surface de l'eau sur la rive Nord | AL2016-C2_1 | 0-2 | ND | 43,05 | 0,140 | 5,892 | 16,852 | 0,100 | 7,920 | 108,065 |
| | | AL2016-C2_2 | 2-4 | ND | 43,05 | 0,437 | 5,762 | 19,008 | 0,085 | 3,967 | 104,516 |
| AL2016-C2_3 | | 4-6 | ND | 43,05 | 0,536 | 5,714 | 21,510 | 0,090 | 1,488 | 101,854 | |
| AL2016-C2_4 | | 6-10 | ND | 43,05 | 0,582 | 5,576 | 23,370 | 0,095 | 0,255 | 97,243 | |
| AL2016-C2_5 | | 10-14 | ND | 43,05 | 0,528 | 5,405 | 24,324 | 0,101 | 0,289 | 92,006 | |
| AL2016-C2_6 | | 14-18 | ND | 43,05 | 0,349 | 5,171 | 21,625 | 0,073 | 0,498 | 84,838 | |
| La Preciosa | | | | | | | | | | | |
| Colonne d'eau au centre | Prec2016-0m | 0 | 8,82 | 14,22 | 0,529 | 0,479 | 7,903 | 0,080 | 1,265 | 8,566 | |
| | Prec2016-13,2m | 13,2 | 8,7 | 14,22 | 0,524 | 0,450 | 7,875 | 0,263 | 1,269 | 8,454 | |
| | Prec2016-34,3m | 34,3 | 8,7 | 14,22 | 0,543 | 0,460 | 7,933 | 0,235 | 1,270 | 8,505 | |
| | Prec2016-35,7m | 35,7 | 8,7 | 14,22 | 0,535 | 0,465 | 7,882 | 0,239 | 1,260 | 8,479 | |
| | Prec2016-36m | 36 | 8,67 | 14,22 | 0,546 | 0,459 | 7,821 | 0,231 | 1,256 | 8,336 | |
| Sédiments au centre | Prec2016-C3_7 | 0-2 | ND | 14,22 | 0,727 | 0,475 | 7,666 | 0,270 | 0,694 | 8,094 | |
| | Prec2016-C3_8 | 2-4 | ND | 14,22 | 0,990 | 0,497 | 7,582 | 0,300 | 0,185 | 8,157 | |
| | Prec2016-C3_9 | 8-10 | ND | 14,22 | 1,031 | 0,490 | 7,633 | 0,323 | 0,069 | 8,458 | |
| | Prec2016-C3_10 | 18-20 | ND | 14,22 | 1,054 | 0,476 | 8,020 | 0,365 | 0,042 | 8,388 | |

| | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---------------|--------------|---------|------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|
| Atexcac | Atx2016-0m | 0 | 8,72 | 30,9 | 0,984 | 2,408 | 20,490 | 0,305 | 2,339 | 86,212 | |
| | Atx2016-5m | 5 | 8,68 | 30,9 | 1,134 | 2,487 | 20,802 | 0,314 | 2,398 | 88,248 | |
| Colonne d'eau au centre | Atx2016-10,1m | 10,1 | 8,68 | 30,9 | 1,029 | 2,440 | 20,490 | 0,299 | 2,370 | 85,586 | |
| | Atx2016-22,9m | 22,9 | 8,68 | 30,9 | 0,987 | 2,440 | 20,341 | 0,331 | 2,343 | 85,951 | |
| | Atx2016-31,1m | 31,1 | 8,68 | 30,9 | 1,068 | 2,447 | 20,572 | 0,317 | 2,398 | 86,177 | |
| | Atx2016-32,6m | 32,6 | 8,7 | 30,9 | 0,968 | 2,484 | 20,457 | 0,322 | 2,429 | 86,804 | |
| | | Atx2016-C4_1 | 0-1 | 8,54 | 30,9 | 0,770 | 2,393 | 19,486 | 0,196 | 2,304 | 83,324 |
| Sédiments au centre | | Atx2016-C4_2 | 1-3 | 8,53 | 30,9 | 0,605 | 2,386 | 18,712 | 0,175 | 2,272 | 82,210 |
| | | Atx2016-C4_3 | 3-5 | 8,51 | 30,9 | 0,569 | 2,447 | 18,334 | 0,213 | 2,162 | 82,071 |
| | | Atx2016-C4_4 | 5-6,5 | 8,51 | 30,9 | 0,593 | 2,521 | 18,334 | 0,242 | 2,157 | 84,281 |
| | | Atx2016-C4_5 | 6,5-9,5 | 8,51 | 30,9 | 0,579 | 2,479 | 18,070 | 0,217 | 2,098 | 83,498 |

2.2.2. Dosage par colorimétrie en flux continue du H_4SiO_4 , AxFlow Quattro

Cette technique permet de déterminer la concentration en H_4SiO_4 . Les analyses ont été réalisées par Emmanuelle Raimbault à l'Institut de Physique du Globe de Paris (IPGP) en système Quattro. La procédure est automatisée et les solutions circule dans un circuit de capillaires avec comme solvant du sodium dodecyl sulfate (SDS). Les échantillons à doser sont préalablement dilués au $10^{\text{ème}}$ dans de l'eau milliQ. Cette technique utilise la méthode de dosage par le « blue silicomolybdate ». Le procédé au silicomolybdate est basé sur le principe que le molybdate d'ammonium réagit avec la silice dissoute mais également les phosphates présents à pH faible (pH entre 1 et 2). La réaction donne des hétéropolyacides de couleur bleu lorsque l'acide ascorbique est utilisé comme réducteur. L'acide oxalique est ajouté pour détruire l'acide molybdophosphorique en laissant le silicomolybdate intact, éliminant ainsi toute interférence de couleur des phosphates. L'absorbance est mesurée à une DO de 820 nm et est reliée linéairement à la concentration en H_4SiO_4 . Les paramètres de la relation linéaire sont déterminés grâce à des mesures sur une gamme étalon de 0 à 99 μM en H_4SiO_4 réalisée dans de l'eau milliQ.

2.2.3. Calculs de saturation par le logiciel de spéciation chimique - Visual MINTEQ ver. 3.0

Visual MINTEQ est un logiciel qui permet des calculs de spéciation, de solubilité et d'équilibre chimique entre des phases solides et dissoutes (Gustafsson, 2013). La méthode de correction des activités utilisée a été celle de Davies (Davies, 1962). La pression partielle en CO_2 de la phase gaz, qui est considérée en équilibre avec les solutions, est maintenue constante à 0,0004 atm. Après avoir sélectionné les éléments présents dans une solution, leurs concentrations mesurées, l'alcalinité et la température, on obtient les concentrations et les activités de chaque

espèce chimique, le pH, la force ionique à l'équilibre et les saturations des solutions par rapport aux différentes phases possibles. Concernant notre étude, nous avons utilisé les activités des espèces chimiques qui nous intéressent (H_4SiO_4 , Mg^{2+} , Ca^{2+} , HCO_3^-) afin de pouvoir tracer des diagrammes de solubilité ou encore des diagrammes de domaine de stabilité.

2.2.4. Analyses chimiques globales des sédiments.

La phase solide a été séchée au dessiccateur dans une atmosphère anoxique et la composition chimique en éléments majeurs a été mesurée (**tableau 3**). L'ensemble des valeurs sont présentées dans le **tableau A1**. Les teneurs massiques des principaux éléments, du carbone organique total et de soufre total ont été mesurées par le Service d'analyse des roches et minéraux (SARM, Centre de recherches pétrographiques et géochimiques, Nancy, France). Environ 1 à 2 g de poudre de sédiment ont été utilisés pour ces analyses. Les analyses d'éléments majeurs ont été effectuées à l'aide d'un ICP-OES (Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry) ICap6500 (ThermoFischer) après fusion alcaline d'échantillons de roche avec LiBO_2 , suivie d'une dissolution dans HNO_3 . Les incertitudes des mesures des éléments majeurs étaient comprises entre 2% et 10% en fonction de leurs concentrations. Les teneurs en carbone organique total ont été déterminées en utilisant un analyseur de carbone/soufre Horiba EMIA320V2. Les incertitudes des mesures du carbone organique étaient supérieures à 10% pour la valeur de concentration les plus élevées (>2,55 % massique), et supérieures à 15% pour les valeurs les moins élevées. Les proportions approximatives des phases minérales ont été calculées à partir de ces analyses chimiques en % massique pour chaque échantillon de sédiment.

Tableau 3. Ici sont présentés les différents échantillons de sédiment correspondant aux 3 lacs mexicains étudiés ainsi que les pourcentages massiques (masse de l'oxyde par rapport à la masse de l'échantillon) des oxydes majeurs obtenues par ICP-OES. Ces masses représentant 92 % à 98 % de la masse totale des échantillons en prenant en compte la perte au feu (l'ensemble des résultats sont présentés dans l'annexe **Tableau A1**). Les traits indiquent les éléments non mesurés.

| Localisation | Nom | Profondeur (cm) | Matière organique (% massique) | Oxydes majeurs du solide (% massique) | | | |
|--------------|-------------|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------------|-----------------|
| | | | | SiO_2 | Al_2O_3 | MgO | CaO |
| Alchichica | AL2016-C1_1 | 0-0,5 | - | - | - | - | - |
| | AL2016-C1_2 | 0,5-1 | - | 40,15 ± 0,40 | 5,29 ± 0,53 | 7,21 ± 0,14 | 12,06 ± 0,24 |
| | AL2016-C1_3 | 1-1,1 | - | 39,91 ± 0,40 | 4,91 ± 0,49 | 7,09 ± 0,14 | 12,71 ± 0,25 |

Chapitre II

| | | | | | | | |
|--|----------------|---------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | AL2016-C1_4 | 1,1-2,1 | - | 40,31 ± 0,40 | 5,47 ± 0,55 | 7,36 ± 0,15 | 13,30 ± 0,27 |
| | AL2016-C1_5 | 2,1-3,1 | - | 42,52 ± 0,43 | 6,02 ± 0,60 | 7,43 ± 0,15 | 12,66 ± 0,25 |
| | AL2016-C1_6 | 3,1-5,1 | 2,67 ± 0,40 | 42,50 ± 0,43 | 6,24 ± 0,62 | 8,80 ± 0,18 | 12,56 ± 0,25 |
| | AL2016-C1_7 | 5,1-7,1 | 2,86 ± 0,43 | 44,08 ± 0,44 | 6,37 ± 0,64 | 10,90 ± 0,22 | 10,14 ± 0,20 |
| | AL2016-C1_8 | 7,1-11 | 2,36 ± 0,24 | 41,12 ± 0,41 | 6,23 ± 0,62 | 9,73 ± 0,19 | 13,34 ± 0,27 |
| | AL2016-C1_9 | 11-15 | 1,99 ± 0,20 | 39,56 ± 0,40 | 6,25 ± 0,63 | 9,06 ± 0,18 | 15,82 ± 0,32 |
| | AL2016-C1_10 | 15-19 | 1,88 ± 0,19 | 39,71 ± 0,40 | 6,58 ± 0,66 | 9,51 ± 0,19 | 14,58 ± 0,29 |
| 1 m sous la surface de l'eau sur la rive Nord | AL2016-C2_1 | 0-2 | 0,96 ± 0,1 | 11,24 ± 0,11 | 2,64 ± 0,26 | 27,27 ± 0,55 | 7,77 ± 0,16 |
| | AL2016-C2_2 | 2-4 | 0,76 ± 0,08 | 10,53 ± 0,11 | 2,55 ± 0,26 | 27,62 ± 0,55 | 8,69 ± 0,17 |
| | AL2016-C2_3 | 4-6 | 0,71 ± 0,07 | 10,60 ± 0,11 | 2,58 ± 0,26 | 27,90 ± 0,56 | 8,83 ± 0,18 |
| | AL2016-C2_4 | 6-10 | 0,72 ± 0,07 | 9,4 ± 0,47 | 2,32 ± 0,23 | 28,86 ± 0,58 | 8,66 ± 0,17 |
| | AL2016-C2_5 | 10-14 | 0,69 ± 0,07 | 9,61 ± 0,48 | 2,35 ± 0,24 | 28,04 ± 0,56 | 9,43 ± 0,19 |
| | AL2016-C2_6 | 14-18 | 0,37 ± 0,04 | 9,21 ± 0,46 | 2,36 ± 0,24 | 28,67 ± 0,57 | 9,73 ± 0,19 |
| La Preciosa | | | | | | | |
| Au centre | Prec2016-C3_7 | 0-2 | 1,87 ± 0,19 | 26,46 ± 0,26 | 5,00 ± 0,50 | 1,81 ± 0,09 | 29,75 ± 0,60 |
| | Prec2016-C3_8 | 2-4 | 1,76 ± 0,18 | 25,88 ± 0,26 | 4,38 ± 0,44 | 1,85 ± 0,09 | 31,59 ± 0,63 |
| | Prec2016-C3_9 | 8-10 | 2,10 ± 0,21 | 29,64 ± 0,30 | 5,48 ± 0,55 | 1,83 ± 0,09 | 27,44 ± 0,55 |
| | Prec2016-C3_10 | 18-20 | 1,75 ± 0,18 | 31,42 ± 0,31 | 6,38 ± 0,64 | 1,80 ± 0,09 | 26,86 ± 0,54 |
| Atexcac | | | | | | | |
| Au centre | Atx2016-C4_1 | 0-1 | 0,79 ± 0,08 | 19,42 ± 0,19 | 2,41 ± 0,24 | 4,21 ± 0,21 | 35,22 ± 0,70 |
| | Atx2016-C4_2 | 1-3 | 0,75 ± 0,08 | 22,15 ± 0,22 | 2,75 ± 0,28 | 5,90 ± 0,12 | 33,42 ± 0,67 |
| | Atx2016-C4_3 | 3-5 | 0,64 ± 0,06 | 24,32 ± 0,24 | 3,86 ± 0,37 | 5,23 ± 0,10 | 31,86 ± 0,64 |
| | Atx2016-C4_4 | 5-6,5 | 0,67 ± 0,07 | 24,32 ± 0,24 | 4,15 ± 0,42 | 5,01 ± 0,10 | 31,49 ± 0,63 |
| | Atx2016-C4_5 | 6,5-9,5 | 0,68 ± 0,07 | 19,12 ± 0,19 | 2,90 ± 0,29 | 4,36 ± 0,22 | 36,06 ± 0,72 |

2.3. Protocole de synthèse de kérolite abiotique (résultats en annexe)

Nous avons synthétisé notre propre référence de kérolite pour mieux interpréter les analyses DRX (**Fig. A1**) et FTIR (**Fig. A2**). Ces synthèses nous ont aussi permis d'évaluer l'impact du protocole de décarbonatation sur des phases peu cristallisées et hydratée de silicate-Mg. Les synthèses ont été réalisées dans des bouteilles en polycarbonate de 500 millilitres en utilisant des solutions synthétiques. Nous avons choisi comme source d'acide ortho-silicique du méta-silicate de sodium hydraté ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) et pour la source de Mg^{2+} du chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Les synthèses ont été réalisées dans 333 mL d'eau milliQ, sous agitation continue à 800 rpm et une température de 25 °C. Les deux sources de H_4SiO_4 et Mg^{2+} ont été directement mélangées selon un rapport Mg/Si équivalent à celui de la kérolite soit 0,75 (**tableau 4**). Le pH des solutions a été contrôlé plusieurs fois lors des synthèses : au début de chaque synthèse, lorsque chaque espèce a été introduite et à la fin de la synthèse au moment où les précipités se sont formés. Ainsi après le mélange des deux espèces chimiques, le pH était situé entre 12 et 13,5. Il a été ajusté avec du HCl (3 M) jusqu'à un pH de 9,4. Les solutions ont été laissées 24 h à l'air ambiant et sous agitation continue. Les précipités de chaque synthèse ont été extraits des bouteilles par la méthode suivante : pour chaque bouteille, la solution est centrifugée pendant 10 minutes à 5857 g dans des gros pots de 100 mL. La partie solide est rincée à l'eau milli-Q puis rassemblée dans un tube de 50 mL. Après cette étape, trois centrifugations séparées par deux rinçages à l'eau milliQ ont été nécessaires, avant de laisser les précipités sécher dans un four à 50 °C pendant une nuit.

Tableau 4. Résumé des conditions expérimentales appliquées à chaque synthèse de kérolite.

| Echantillons | pH _i | Mg _i (mM) | SiO ₂ (aq) _i (mM) | Mg/Si |
|--------------|-----------------|----------------------|---|-------|
| MgSi-1 | 9,43 | 227 | 303 | 0,75 |
| MgSi-2 | 9,37 | 453 | 604 | 0,75 |
| MgSi-3 | 9,39 | 906 | 1208 | 0,75 |
| MgSi-4 | 9,42 | 114 | 151 | 0,75 |

2.4. Caractérisation minéralogique

2.4.1. Préparation des échantillons

Les sédiments ont été séchés au dessiccateur, sous atmosphère anoxique dans une boîte à gant Jacomex avec une $[O_2]$ ne dépassant pas 0,3 ppm. Certains échantillons de la carotte d'Alchichica C1 (Al2016-C1-1 à C1-5), obtenus par l'intermédiaire de l'équipe de l'université de Boulder (J. Johnson) présente lors de la mission d'échantillonnage des lacs mexicains en 2016, ont subi un séchage plus tardif (2 ans plus tard).

2.4.2. Protocole de décarbonatation selon Ostrum, 1961 (résultats en annexe)

Nous avons utilisé la technique de décarbonatation par l'acide acétique afin de concentrer les silicates présents dans l'échantillon de sédiment Prec2016-C3_7 (0 à 2 cm de profondeur). Un gramme de poudre de l'échantillon est placé dans un tube Falcon de 50 mL. La décarbonatation est effectuée avec une solution d'acide acétique (AA) à n moles dans de l'eau MilliQ pour $2n$ moles de carbonates. Cinquante millilitres de solution d'AA à n mol/L dans de l'eau MilliQ pour $2n$ mol/L de carbonates sont ajoutés à la poudre contenant environ 60 % de carbonates de Ca. La solution est centrifugée à 5857 g pendant 8 min lorsque le bullage lié à la décarbonatation se termine (1 à 2 heures). Le surnageant est retiré et la fraction solide résiduelle est rincée avec de l'eau MilliQ. Le rinçage est réalisé 3 fois. Enfin l'échantillon est séché pendant 15 h à 50 °C.

À la suite des expériences préliminaires sur des synthèses de kérolite, nous avons constaté une déstabilisation du silicate de magnésium peu cristallisé, hydraté et de basse température à pH bas (>3). Nous avons conclu qu'il fallait augmenter le pH de décarbonatation à pH 6 afin qu'il y ait très peu d'impact sur le silicate et augmenter le temps de décarbonatation afin d'avoir une décarbonatation totale. L'impact de la décarbonatation sur l'échantillon peut être qualifié par l'apparition de bande d'absorption associée à la silice amorphe en FTIR. Dans le détail, on trouve une bande symétrique à 800 cm^{-1} , caractéristique des vibrations des atomes de Si dans une liaison siloxane et est appelée $\nu_{\text{as-Si-O-Si}}$ (Swann et Patwardhan, 2011) (**Figure A3**). Une large bande observée à 1100 cm^{-1} correspondant au mouvement antisymétrique d'atomes de Si dans des liaisons siloxanes ($\nu_{\text{as-Si-O-Si}}$). Ce large pic comprend trois composantes : (i) un large épaulement centré sur $1115\text{--}1130\text{ cm}^{-1}$, affecté au mode optique longitudinal (LO $\nu_{\text{as-Si-O-Si}}$) ; (ii) un pic fort centré à $1035\text{--}1045\text{ cm}^{-1}$ (mode optique transverse TO $\nu_{\text{as-Si-O-Si}}$) ; et (iii) une faible absorption à 950 cm^{-1} due aux vibrations d'étirement du silanol (Si-OH) (Swann et Patwardhan, 2011).

2.4.3. DRX

Des analyses DRX et FTIR ont été réalisées sur vingt-cinq échantillons de carottes sédimentaires des lacs alcalins mexicains et sur des composés de référence. L'échantillon a été placé sur un support en aluminium avec une base en silicium, le tout protégé de l'oxygène par une cellule anoxique avec une fenêtre en kapton. Le signal du kapton contribue aux diffractogrammes mesurés et se situe à 7° ($Co, 2\theta$). Certains échantillons de la carotte d'Alchichica C1 (C1-1 à C1-5), obtenus par l'intermédiaire de l'équipe américaine présente lors de la mission d'échantillonnage des lacs mexicains en mai 2016 ont été analysés ultérieurement sous air. L'analyse de ces échantillons ne montrait pas de différence par rapport aux échantillons analysés en anoxie. Les mesures DRX ont été réalisées à partir d'un diffractomètre Panalytical X'Pert équipé d'une anode de cobalt ($Co-K\alpha$). Les données ont été acquises à 40 kV et 40 mA en mode continu de 5 à 100° (2θ) avec un pas de $0,0084^\circ$ et des temps de comptage de 1 h répétés 6 fois. Les différents diffractogrammes d'un même échantillon ont été sommés. Les données DRX ont été analysées avec le logiciel PANalytical X'Pert Highscore. Les pics ont été indexés à l'aide des références d'International Crystal Structure Database (ICSD) et Minerals.

2.4.4. FTIR

Les sédiments et les composés de référence ont aussi été analysés par spectroscopie FTIR. Les spectres infrarouges sont présentés dans la **figure A4**. De 1 à 1,5 mg d'échantillon et 300 mg de bromure de potassium (KBr) ont été mélangés et broyés dans un mortier en agate. Ce mélange a ensuite été mis dans une presse sous vide sous 8 tonnes de pression pendant 1 minute. La pastille formée a été placée toute une nuit dans une étuve à $95^\circ C$ pour éliminer la vapeur d'eau absorbée puis la pastille a été pressée une seconde fois juste avant d'être placée dans le spectromètre. Les spectres en transmission ont été acquis entre 400 et 4000 cm^{-1} , avec une résolution de $0,4\text{ cm}^{-1}$ en utilisant un spectromètre Nicolet 6700.

2.5. La microscopie électronique

2.5.1. Enrobage des échantillons sédimentaires pour la préparation par polissage ionique

Environ 10 mg des trois échantillons Al2016-C1_2, Al2016-C1_5 et Al2016-C1_10 ont été placés dans un appendorf. Dans un premier temps, nous avons déshydraté les échantillons avec des bains successifs à l'éthanol 70%, 95% et 100% pendant 5 min, avec entre chaque bain une

centrifugation à 6624 g pendant 7 min. Ensuite, les échantillons ont été placés dans des bains d'oxyde de propylène-1,2 pendant 30 min. En parallèle, 10 mL de solution A (Epon 38% et DDSA 62%) et 10 mL de solution B (Epon 53% et MNA 47%) ont été préparés. Dix millilitres de la solution finale a été préparée suivant les proportions suivantes : 2 volumes de solution A et 3 volumes de solution B, puis le mélange est homogénéisé pendant 15 min. On ajoute à la solution finale 2,5% de DMP 30, puis le mélange est homogénéisé pendant 15 min. Les échantillons sont centrifugés pendant 7 min à 6624 g et l'oxyde de propylène-1,2 est retiré. Nous passons ensuite à l'enrobage en ajoutant 300 µL de résine et 300 µL d'oxyde de propylène-1,2 aux culots de sédiment. L'ensemble a été laissé sous hotte pendant 18 h afin que la résine enrobe les échantillons. Au bout des 18 h, le mélange résine / oxyde de propylène-1,2 superflu a été enlevé. Les culots imbibés de résine ont été placés dans un moule pyramidal (« Pyramid tip mould » G3745, Agar Scientific), au niveau de la pointe, et de la résine a été ajoutée. Le tout a été placé sous la hotte pendant 4 h afin d'évaporer l'oxyde de propylène-1,2 qui pourrait rester. Le moule contenant les échantillons a été placé dans un four à 37 °C pendant 24 h, puis 45 °C pendant 24 h et enfin, 60 °C pendant 48 h.

Nous avons ensuite poli les échantillons Al2016-C1_2, C1_5 et C1_10 à l'aide du système de polissage à faisceau ionique Leica EM TIC 3X pendant 8 h à -10 °C avec des faisceaux d'Argon à 7 KeV. Les résines ont été polies à l'échelle sub-nanométrique au niveau de la pointe des pyramides. Ainsi, nous avons obtenu une surface extrêmement plane nous permettant par la suite d'effectuer des mesures quantitatives en MEB-EDS mais également de prélever une coupe ultrafine (<100 nm) en FIB sur l'échantillon Al2016-C1_10.

2.5.2. Microscopie électronique à balayage

Les échantillons enrobés ou non ont été analysés par microscopie électronique à balayage. Les échantillons sont recouverts d'une couche de quelques nanomètres de carbone à l'aide d'un métalliseur Leica EM SCD500 afin de rendre l'échantillon conducteur. Les observations en microscopie électronique à balayage ont été obtenues en mode électrons secondaires (SE2) qui permet de visualiser la topographie de l'échantillon avec une résolution spatiale nanométrique. L'appareil qui a été utilisé est un Zeiss Ultra 55 équipé d'un canon à émission de champs (FEG). Les données ont été obtenues avec un diaphragme de 60 µm, une distance de travail (WD) de 7,5 mm, et une tension d'accélération des électrons de 10 kV. L'EDXS a été réalisée avec le même appareil.

2.5.3. Lame ultra-fine au FIB

Une lame ultra-fine transparente aux électrons a été découpée dans la résine polie, de l'échantillon le plus profond (Al2016-C1_10), par faisceau ionique focalisé (FIB) à l'aide d'un instrument FIB Zeiss Neon40EsB. Avant la découpe, une bande de platine a été déposée sur la région d'intérêt de l'échantillon. Après transfert *in situ* sur une grille de cuivre (**Fig. 3A**), la lame a été amincie à environ 100 nm avec un courant de faisceau de Ga⁺ d'environ 100 pA (**Fig. 3B et C**).

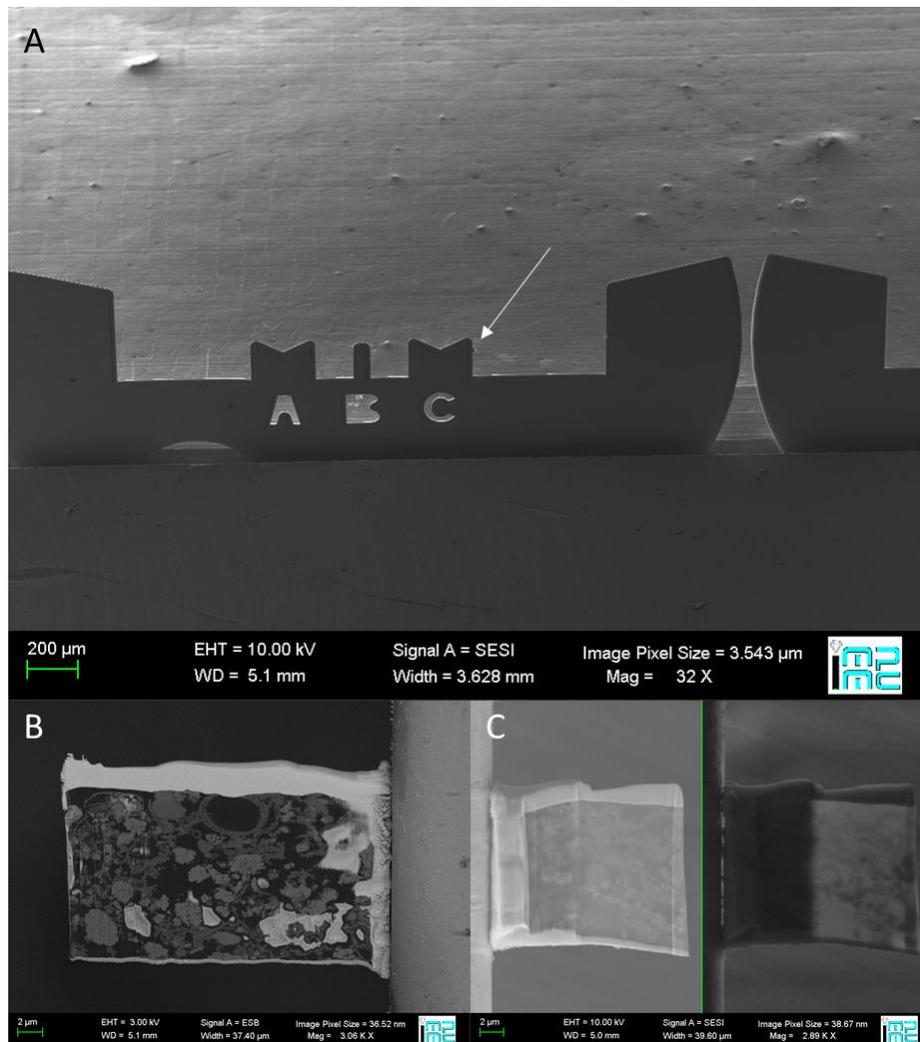


Figure 3. Image MEB de la lame ultra-fine obtenues en FIB. Lame FIB a été placée et soudée *in situ* sur une grille en cuivre à droite de la position C indiquée par la flèche blanche (A). Lame FIB avant amincissement observée en ESB (B), puis après amincissement observée en Inlens (gauche) et SESI (droite) (C).

2.5.4. Microscopie électronique à transmission

La lame ultra-fine obtenue en FIB a été analysée au microscope électronique en transmission (MET) JEOL 2100F fonctionnant à 200 kV. Ce microscope est équipé d'un canon à émission de champ (FEG), d'une pièce polaire à ultra haute résolution, d'un détecteur EDXS JEOL, et d'un dispositif de balayage MET (STEM) permettant l'imagerie avec un contraste fonction du numéro atomique moyen (Z) de l'échantillon en mode fond noir annulaire à grand angle (HAADF) avec une taille de sonde de 0,7 à 1 nm. La cartographie d'éléments chimiques a été acquise par EDXS en mode STEM. Des clichés de diffraction électronique en mode sélection d'aire (SAED) ont été enregistrés pour vérifier la cristallinité des silicates de magnésium.

3. Résultats

3.1. Analyses des sédiments du lac d'Alchichica

3.1.1. Etude de la géochimie globale de la colonne d'eau et des eaux porales

Dans un premier temps les analyses de la chimie de la colonne d'eau et des eaux porales de mai 2016 nous ont permis de dresser des profils de concentration du Ca^{2+} , Mg^{2+} et H_4SiO_4 à différentes profondeurs. Dans l'ensemble les concentrations en Ca^{2+} et Mg^{2+} de la colonne d'eau au centre du lac ne varient que très peu alors que la $[\text{H}_4\text{SiO}_4]$ augmente avec la profondeur passant de 0 μM (en dessous du seuil de détection) à 0 m à 7 μM à 60,8 m de profondeur (**Fig. 4A-C**). À noter que la $[\text{H}_4\text{SiO}_4]$ à 60,8 m de profondeur mesurée en 2016 est inférieure à celle mesurée en 2014 à 55 m de profondeur (30 μM). Il pourrait s'agir de variations annuelles. Concernant les carottes sédimentaires, la $[\text{Ca}^{2+}]$ diminue dans les eaux porales de 157 μM à 119 μM de 0 à 2,1 cm de profondeur et de 100 à 85 μM de 0 à 2 cm de profondeur pour les eaux porales au centre du lac et celles sur la rive Nord respectivement (**Fig. 4D**). La $[\text{Ca}^{2+}]$ reste stagnante aux alentours de 90 μM de 2 cm à 10 cm de profondeur dans les eaux porales de la rive Nord du lac. *A contrario*, il y a des variations dans les eaux porales au centre du lac avec une augmentation de 2,1 cm à 7,1 cm à 324 μM et une diminution à 112 μM de 7,1 cm à 19 cm de profondeur (**Fig. 4D**).

On voit que l'évolution de la $[\text{Mg}^{2+}]$ dans les eaux porales de la carotte sédimentaire au centre du lac est différente de celle sur la rive Nord. La $[\text{Mg}^{2+}]$ dans les eaux porales de la carotte sédimentaire de la rive Nord du lac augmente de 16,4 mM à 24,3 mM de 0 cm à 14 cm de profondeur puis on observe une légère diminution de 24,3 à 21,6 mM de 14 à 18 cm de profondeur

(Fig. 4E). En revanche, dans la carotte du centre du lac, la $[Mg^{2+}]$ diminue de 15,8 mM à 12,6 mM de 0 cm à 19 cm de profondeur avec une diminution très marquée entre 1 cm et 2,1 cm de profondeur (Fig. 4E).

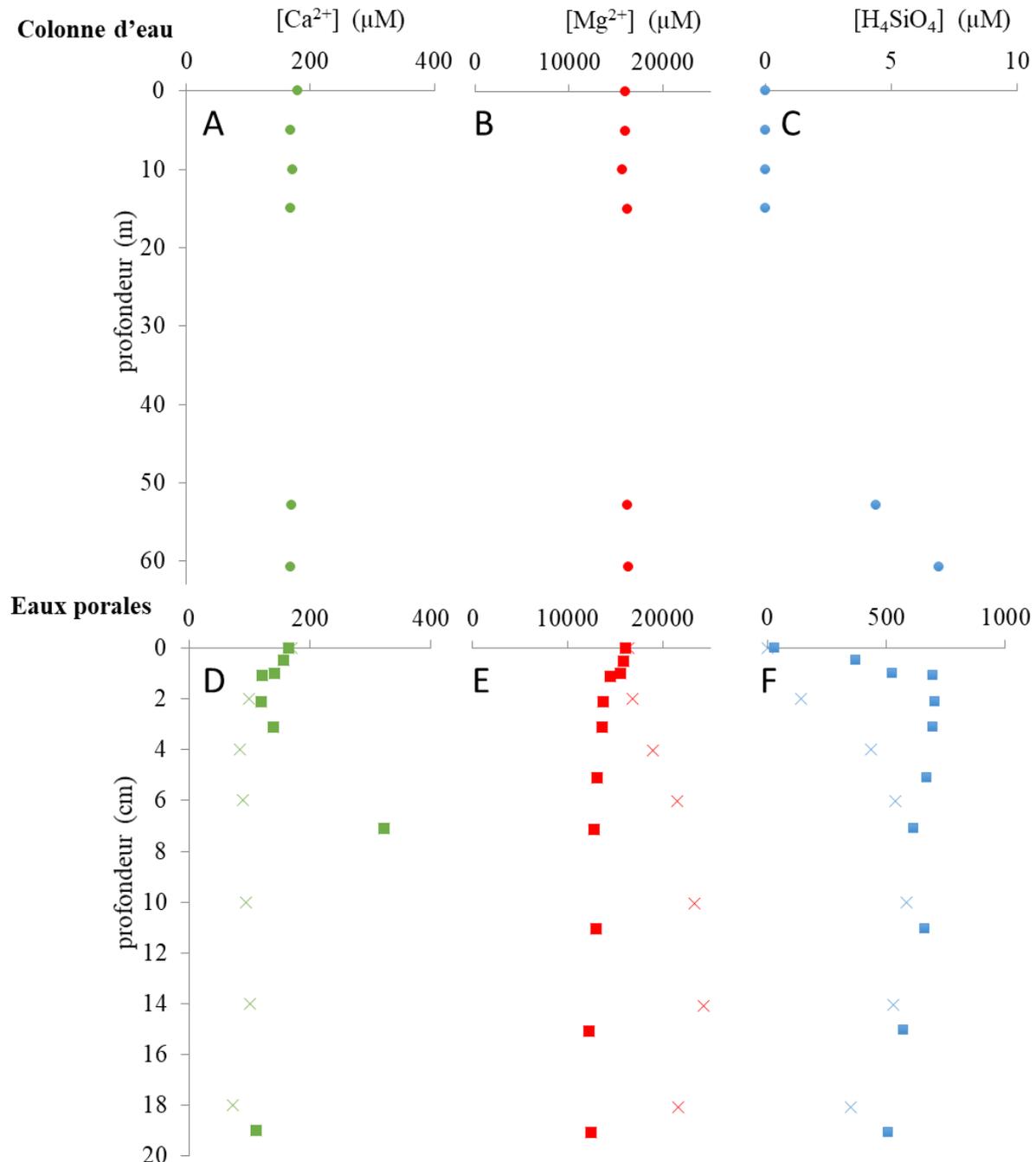


Figure 4. Graphique de la concentration de Ca^{2+} (A et D), Mg^{2+} (B et E) et H_4SiO_4 (C et F) de la colonne d'eau (●) (A-C) et des eaux porales prélevées au centre (■), et des eaux porales sur la rive Nord (×) (D-F) du lac d'Alchichica en fonction de la profondeur. Notez les différences d'unité pour les profondeurs pour les colonnes d'eau par rapport aux carottes. L'échelle de la concentration en H_4SiO_4 n'est pas la même dans la colonne d'eau et dans les eaux porales.

Enfin, l'analyse de la $[H_4SiO_4]$ montre que cette espèce chimique est plus concentrée dans les eaux porales des sédiments que dans les eaux de la colonne d'eau. En effet, la $[H_4SiO_4]$ augmente de 0 μM à 582 μM de 0 cm à 10 cm de profondeur dans les eaux porales de la carotte sur la rive Nord. Ensuite, la $[H_4SiO_4]$ diminue de 582 μM à 348 μM de 10 cm à 18 cm de profondeur (**Fig. 4F**). Enfin, la $[H_4SiO_4]$ des eaux porales du sédiment au centre du lac augmente également de 28 μM à environ 700 μM de 0 cm à 3,1 cm de profondeur. Puis comme dans les eaux porales sur la rive Nord du lac, on observe une diminution de 694 μM à 508 μM de 3,1 cm à 19 cm de profondeur (**Fig. 4F**).

A l'aide de ces analyses chimiques, nous avons déterminé l'état de saturation des eaux de la colonne d'eau et porales du lac d'Alchichica. On note que les eaux porales des sédiments prélevés au centre du lac sont sursaturées par rapport à la « sépiolite amorphe » décrite par Wollast (1968) et sous-saturés par rapport à la silice amorphe (**Fig. 5A**). Pour la carotte sur la rive Nord du lac d'Alchichica, comme les données de pH-métrie manquaient nous avons considéré d'un part que le pH variait de la même façon que les eaux porales des sédiments du centre du lac et d'autre part qu'il ne variait avec un pH constant de 8,5. Ainsi lorsque le pH varie on voit que les eaux porales sont sursaturées par rapport à la « sépiolite amorphe » due au pH élevé (**Fig. 5C**). De plus l'état de saturation se déplace vers la droite due à l'augmentation de l' $a_{H_4SiO_4}$ puis vers le bas à cause de la diminution du pH. Lorsque le pH varie pas dans les eaux porales on voit que les eaux porales sont sous-saturées par rapport à la « sépiolite amorphe » de 0 à 2 cm de profondeur. Puis dans un second temps l'augmentation de l' $a_{H_4SiO_4}$ fait passer les eaux porales d'un état sous-saturé à sursaturé par rapport à cette phase. Ainsi, le pH et l' $a_{H_4SiO_4}$ dans les eaux porales de la rive Nord ont tendance à diriger la saturation vis-à-vis des silicates de Mg. À noter que l'eau de surface du lac d'Alchichica est sous-saturée par rapport à la « sépiolite amorphe » mais également au quartz dans les 15 premiers mètres de profondeur (**Fig. 5A et C**).

Nous avons réalisé des diagrammes montrant le domaine de stabilité des carbonates. Il a été montré que ce type de représentation semblait prédire avec pertinence la dominance d'une phase plutôt que l'autre dans ces environnements de basse température (par exemple, Milesi et al., 2018). Ce diagramme montre que les eaux porales de la carotte sédimentaire au centre du lac d'Alchichica sont plutôt proches de la ligne de séparation aragonite/hydromagnésite mais dans le champ de stabilité de l'aragonite (**Fig. 5B**). En revanche, concernant les eaux porales de la carotte sédimentaire prélevée sur la rive nord du lac, on voit qu'elles sont dans le champ de stabilité

d'hydromagnésite que l'on fasse varier le pH ou non (**Fig. 5B et D**). L'eau du lac elle est plutôt dans le champ de stabilité de l'aragonite à toutes les profondeurs au moment du prélèvement.

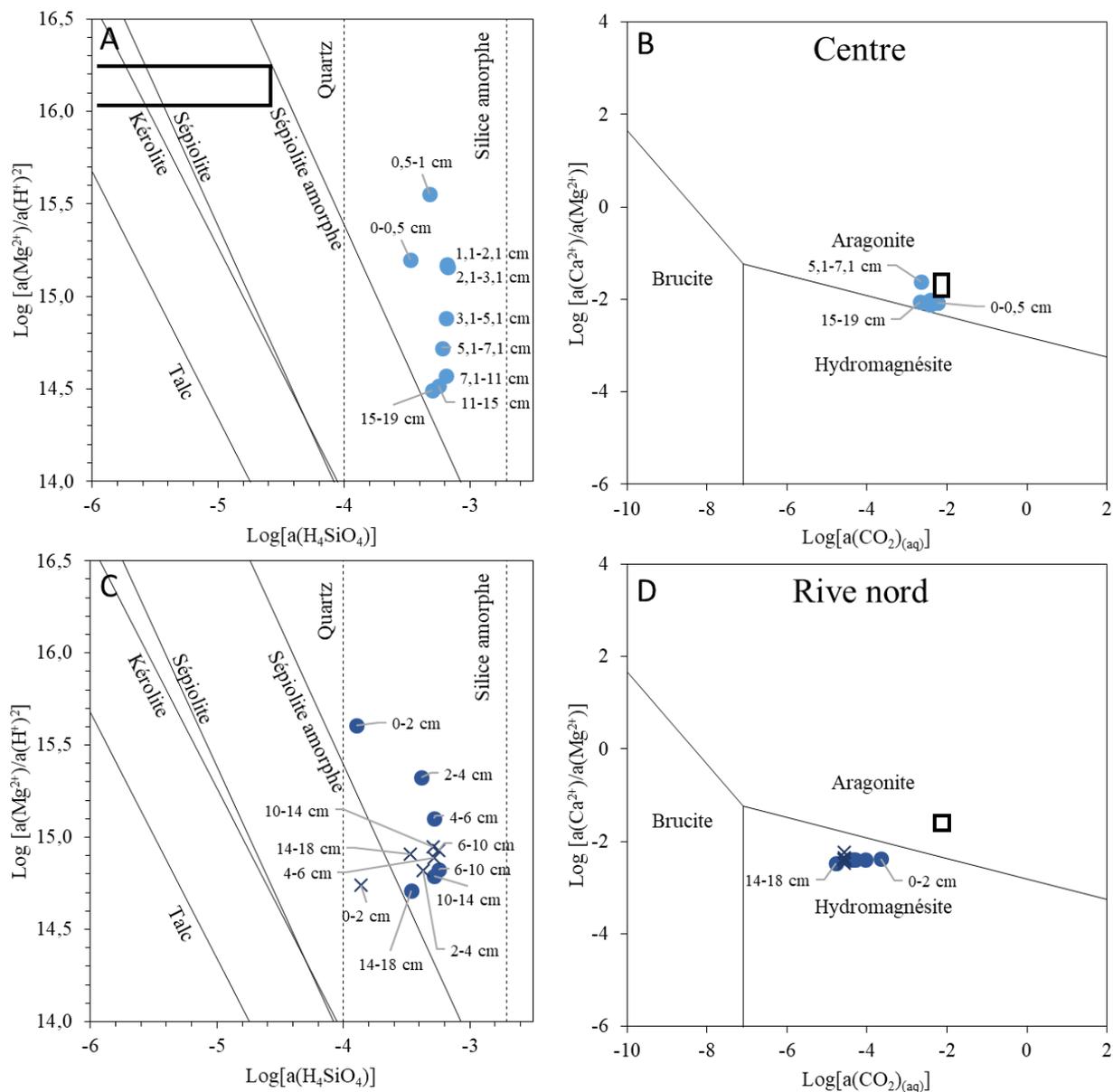


Figure 5. Diagramme de solubilité montrant les solubilités apparentes de différentes phases de silicates de magnésium (A et C) et domaine de stabilité des carbonates (B et D) pour les eaux porales des sédiments du lac d'Alchichica prélevés au centre du lac (A et B) ou sur la rive Nord du lac (C et D). Pour le système Ca-Mg-C-O-H, les lignes indiquent les équilibres métastables entre brucite, aragonite et hydromagnésite. Les étiquettes de certains points indiquent la profondeur. Pour le système Mg-Si-O-H, les traits pleins représentent les lignes de solubilité de la kérolite et sépiolite (Stoessel, 1988), sépiolite amorphe (Wollast et al., 1968). La composition chimique de la colonne d'eau du centre du lac d'Alchichica est représentée par une boîte noire tronquée ou non. Dans le cas de des eaux porales de la rive Nord, les ronds représentent les conditions où l'on fait varier le pH, les croix celles où le pH de varie pas.

3.1.2. Caractérisation minéralogique globale par DRX et spectroscopie infrarouge

Les analyses en DRX montrent la présence de 4 pics larges à 5,56, 4,52, 2,53 et 1,53 Å caractéristiques des smectites trioctaédriques (saponite, stévensite) et également d'un talc hydraté (kérolite) dans les sédiments au centre du lac d'Alchichica en dessous d'une profondeur de 3,1 cm (**Fig. 6**). Le large pic à 7,3 Å (002) est caractéristique des smectites trioctaédrique (par exemple, Faust et al., 1953). De plus, le fait que ces pics soient larges suggère que ces phases sont peu cristallisées. Fait intéressant, le signal de l'hydromagnésite décroît de 0 à 3,1 cm pour ne plus être présent de 3,1 à 20 cm dans la carotte sédimentaire au centre de ce lac (**Fig. 6**). L'aragonite a été détectée tout le long de cette carotte sédimentaire. Les pics de diffraction caractéristiques des feldspaths de type anorthite ($32,5^\circ$ [-204] et $32,7^\circ$ [004]) sont retrouvés dans toutes les carottes sédimentaires (**Fig. 6**). Le quartz a été identifié à l'aide des pics à $24,2^\circ$ ([100]) et 31° ([011]) dans les diffractogrammes du sédiment prélevé au centre du lac (**Fig. 6**). Enfin le pic à $34,8^\circ$ ([-220]) a été indexé pour le diopside (**Fig. 6**).

Contrairement à ceux du centre du lac, les sédiments prélevés sur la rive nord du lac ne présentent aucun pic de diffraction indicateur de smectites trioctaédriques ou de talc hydraté (**Fig. 7**). On constate également la présence d'hydromagnésite et d'aragonite de 0 à 18 cm de profondeur dans le sédiment prélevé au niveau de la rive nord du lac d'Alchichica (**Fig. 7**). Dans les sédiments de la rive nord l'anorthite et le quartz ont également été détectées.

Sédiment au centre du lac d'Alchichica

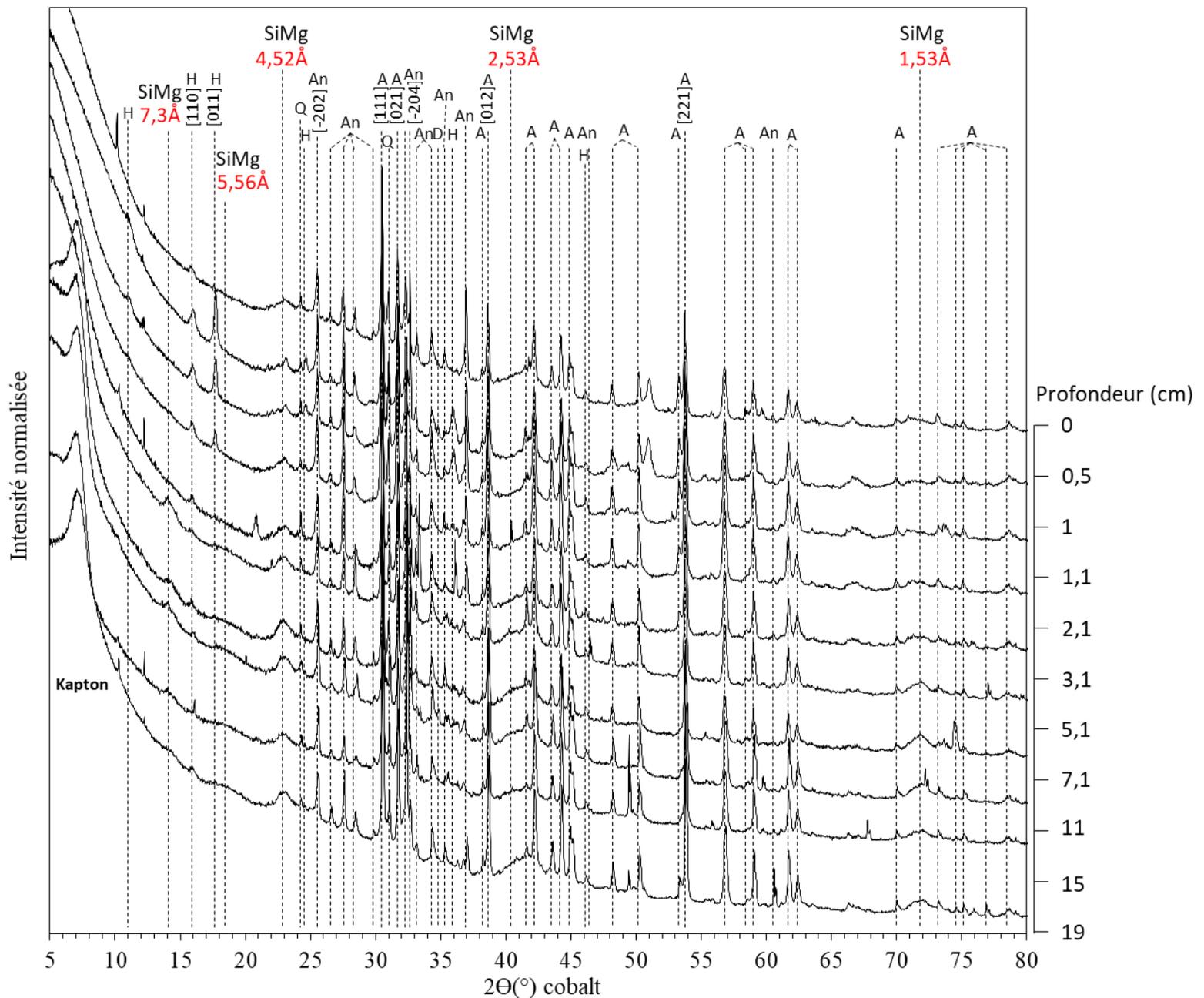


Figure 6. Superposition des diffractogrammes des différentes profondeurs de la carotte prélevée au centre du lac d'Alchichica. Les sédiments sont principalement composés d'aragonite et de silicates de magnésium. A: aragonite; SiMg: kérolite, smectite; H: hydromagnésite; An: anorthite; Q: quartz; D: diopside.

Sédiment sur la rive Nord du lac d'Alchichica

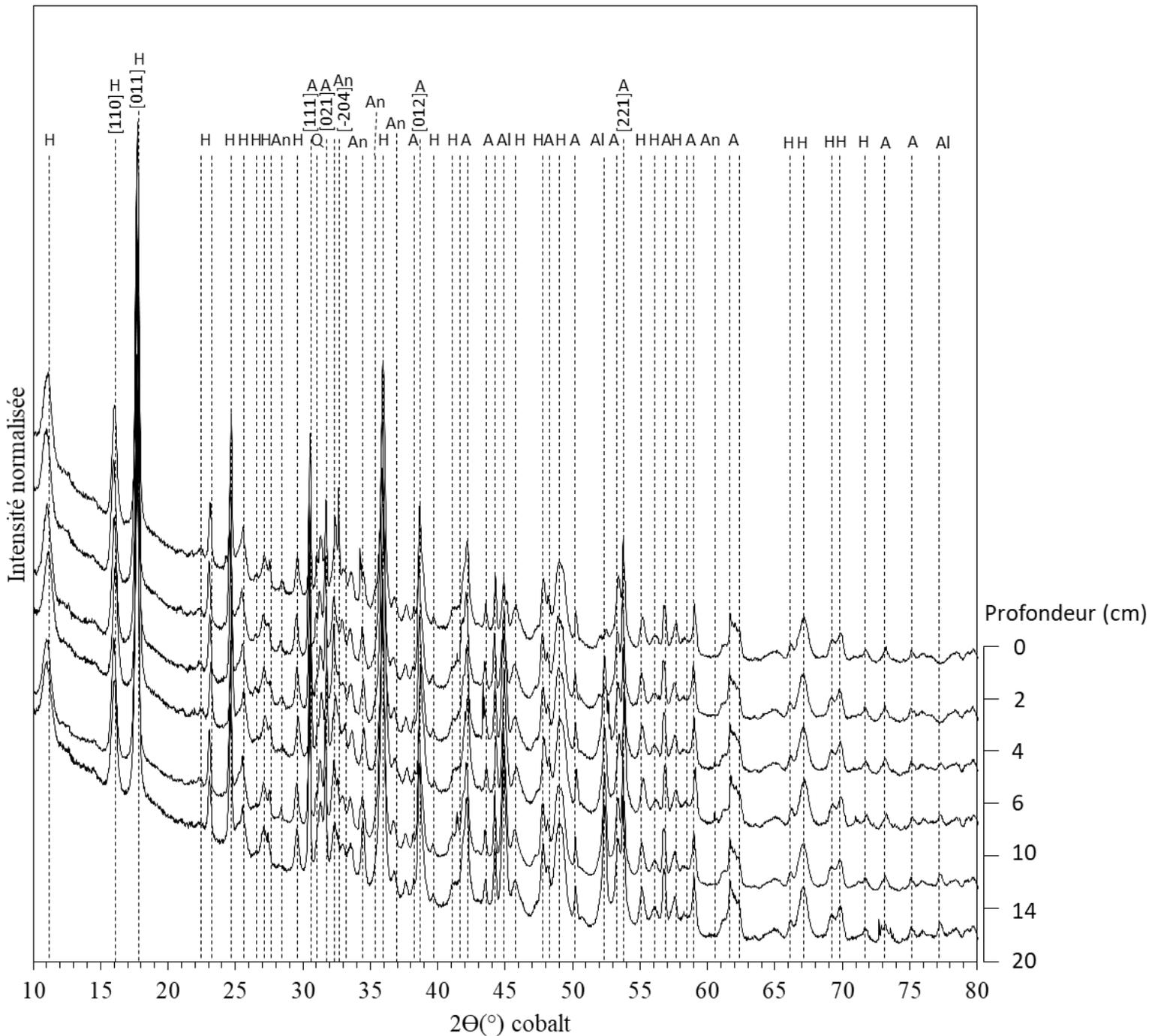


Figure 7. Superposition des diffractogrammes des différentes profondeurs de la carotte prélevée sur la rive Nord du lac d'Alchichica à 1 m sous l'eau. Les sédiments sont principalement composés d'aragonite et d'hydromagnésite. A: aragonite ; H: hydromagnésite ; An: anorthite ; Q: quartz.

En spectroscopie FTIR, les bandes observées dans les deux carottes sédimentaires sont cohérentes avec les observations de DRX. Des bandes observées dans les sédiments prélevés au centre du lac Alchichica sont observées à 465, 531, 667 cm^{-1} caractéristiques des silicates trioctaédriques et sont indexées comme indicatrices de talc hydraté de type kérolite et de certaines smectites (saponite ou stévensite). On trouve également d'autres bandes confirmant la présence de kérolite et/ou de smectites trioctaédriques qui sont celles des étirements Si-O à 1025 cm^{-1} et $\text{Mg}_3\text{-OH}$ à 3680 cm^{-1} (Fig. 8). De plus l'étirement OH de SiOH et de l'eau est présent vers 3400 cm^{-1} et

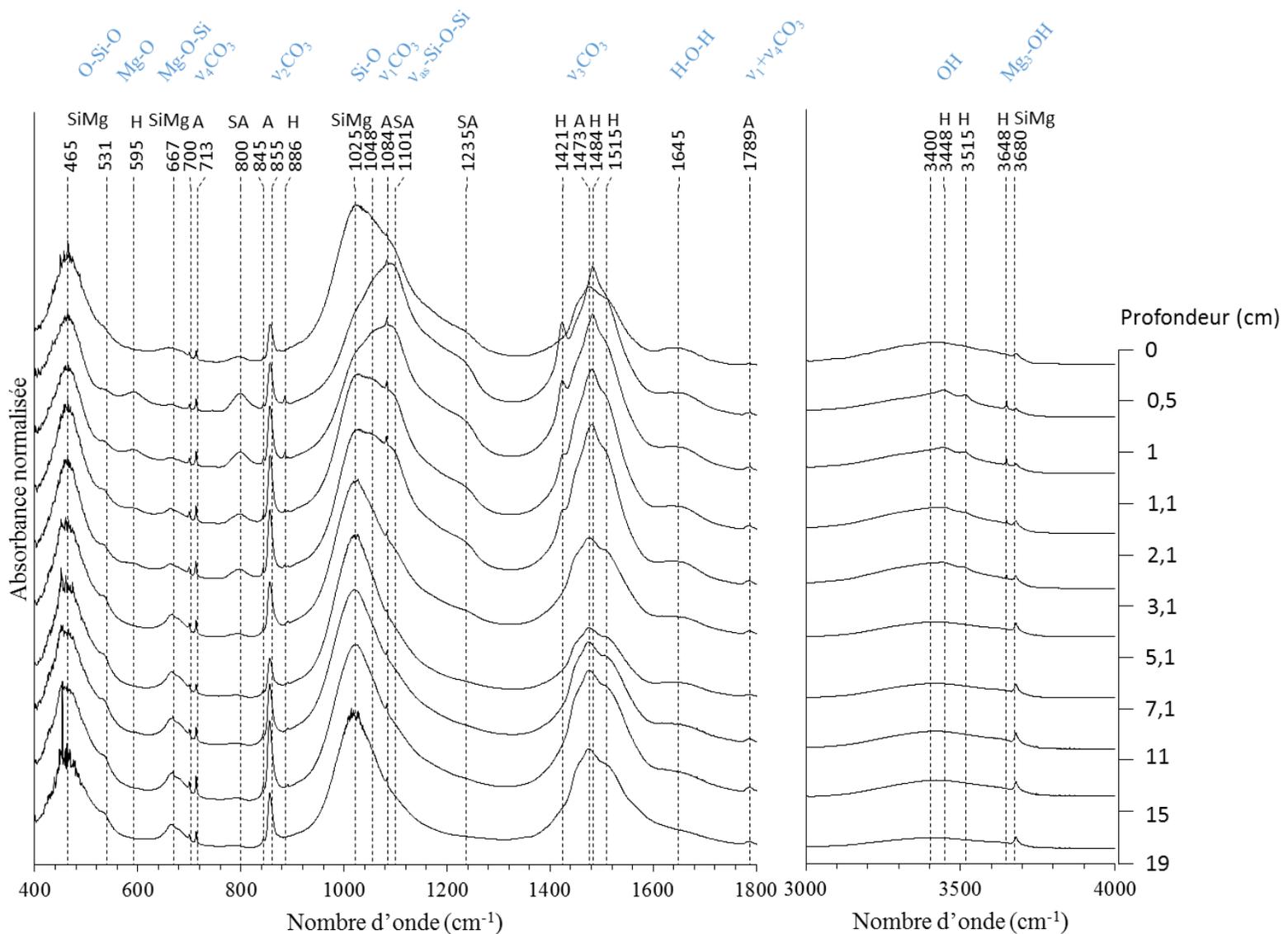


Figure 8. Superposition des spectres des différentes profondeurs de la carotte prélevée au centre du lac d'Alchichica obtenues en FTIR. A: aragonite; SiMg : kérolite, smectites ; H: hydromagnésite; SA : silice amorphe.

la vibration de flexion de l'eau vers 1645 cm^{-1} (**Fig. 8**). On note également des absorptions dans la région des étirements Si-O à 1101 et 1235 cm^{-1} de moins en moins présentes en fonction de la profondeur (**Fig. 8**). Les bandes d'absorption à 595 , 3448 , 3515 et 3648 cm^{-1} , dont la dernière est caractéristique des vibrations $\text{Mg}_3\text{-OH}$ de l'hydromagnésite sont présentes et de moins en moins intenses de $0,5$ à $3,1\text{ cm}$ dans la carotte du centre du lac, ce qui est cohérent avec les observations des diffractogrammes de ces sédiments (**Fig. 8**). On retrouve bien les vibrations $\nu_4\text{CO}_3$ à 700 et 713 cm^{-1} , $\nu_2\text{CO}_3$ à 845 et 855 cm^{-1} , $\nu_1\text{CO}_3$ à 1084 cm^{-1} et $\nu_1\text{CO}_3 + \nu_4\text{CO}_3$ à 1789 cm^{-1} caractéristiques de l'aragonite (**Fig. 8**). Enfin on peut voir un épaulement vers 1048 cm^{-1} dans la région des vibrations Si-O qui peut être associé à la présence de quartz et/ou de feldspaths (**Fig. 8**).

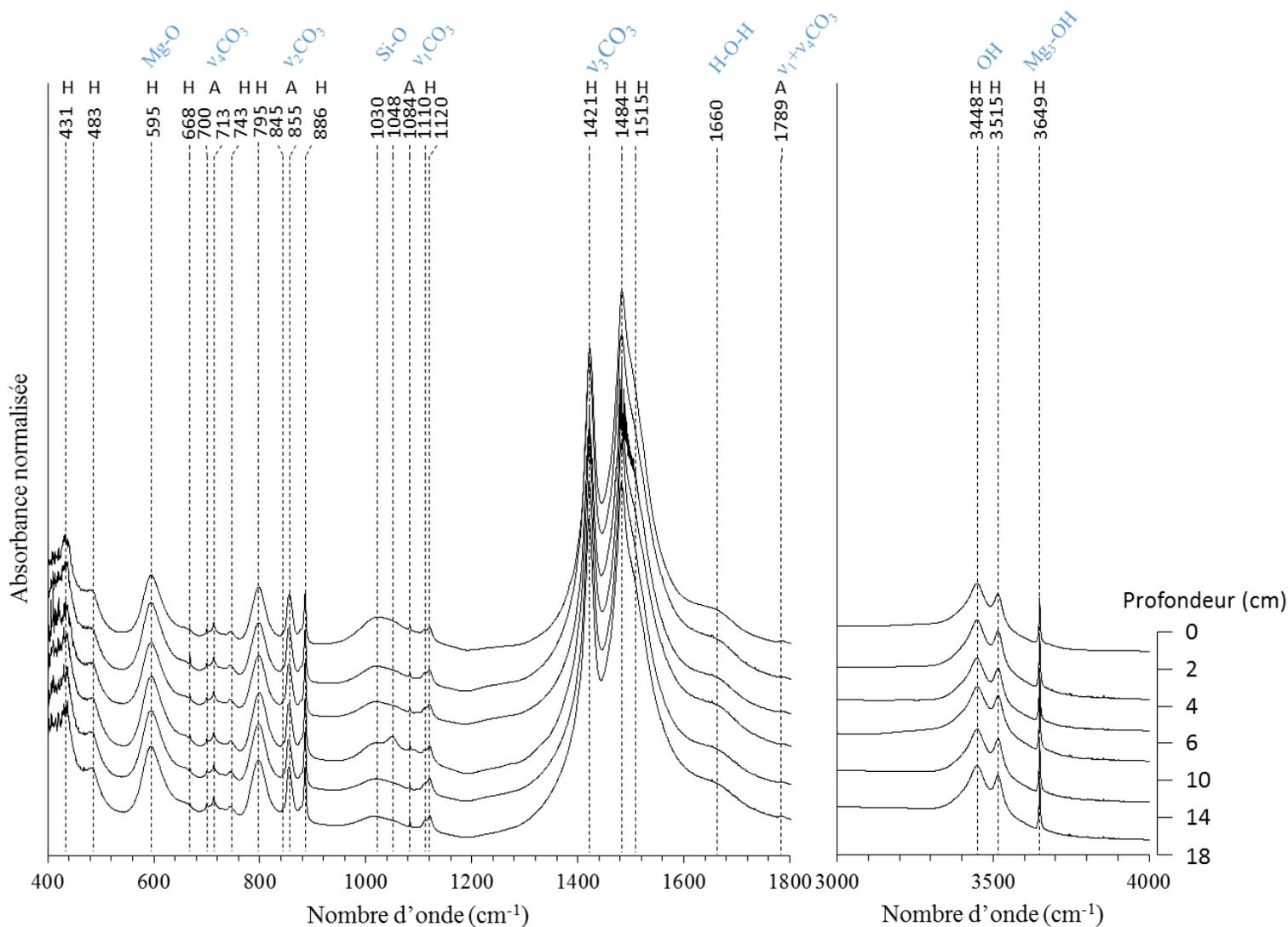


Figure 9. Superposition des spectres des différentes profondeurs de la carotte prélevée sur la rive Nord du lac d'Alchichica à 1 m sous l'eau obtenues en FTIR. A: aragonite, H: hydromagnésite.

Contrairement aux sédiments du centre du lac, ceux de la rive Nord du lac présentent des spectres FTIR qui n'évoluent pas en fonction de la profondeur (**Fig. 9**). On voit clairement de fortes bandes associées à l'hydromagnésite à 1421, 1484, 1515, 3448, 3515 et 3648 cm^{-1} (**Fig. 9**). On retrouve également les bandes associées à l'aragonite (**Fig. 9**). On note la présence de la vibration de flexion de l'eau vers 1660 cm^{-1} (**Fig. 9**). Cependant, on ne voit pas les bandes caractéristiques des silicates de Mg situés vers 1020 et 3680 cm^{-1} (**Fig. 9**). Enfin des bandes larges sont détectées à 1030 et 1048 cm^{-1} dans la région des vibrations Si-O qui peuvent être associées à la présence de quartz et/ou de feldspaths. L'intensité de la bande à 1048 cm^{-1} atteint son maximum entre 6 et 10 cm de profondeur, (**Fig. 9**).

3.1.3. Etude des sédiments par microscopies électroniques à balayage et en transmission et stœchiométrie des phases minérales

Les observations en microscopie électronique à balayage de la carotte prélevée sur la rive Nord du lac d'Alchichica montre bien la présence d'hydromagnésite, qui est majoritaire, et d'aragonite (**Fig. 10A et B**). De plus, les observations ont confirmé qu'il n'y avait pas de silicate de magnésium (**Fig. 10A et B**). Enfin on peut remarquer que les frustules de diatomées ne sont pas altérées et sont donc composées exclusivement de Si (**Fig. 10C et E**).

Les échantillons de la carotte sédimentaire prélevée au centre du lac d'Alchichica ont été enrobés puis polis afin d'avoir une surface plane à l'échelle nanométrique et d'effectuer des analyses quantitatives avec l'EDXS. On note que certains précipités d'aragonite se trouvent dans des plages d'hydromagnésite (**Fig. 11D et E**). On a également mis en évidence des grains qui d'après l'analyse EDXS ont une stœchiométrie de $(\text{Fe}_{0,3}\text{Mg}_{0,7})_2\text{SiO}_4$, compatible avec celle d'une olivine (**Fig. 11F**). L'observation en MEB montre la présence d'hydromagnésite dans l'échantillon compris entre 0,5 et 1 cm de profondeur (AL2016-C1_2) avec des frustules de diatomées en forme de demi-cercle aplati ou de sphère composées exclusivement de SiO_2 (**Fig. 11A-C**).

Lors de l'observation des échantillons AL2016-C1_10 compris entre 15 et 19 cm de profondeur, on remarque qu'il n'y a plus d'hydromagnésite et que les frustules sont composées principalement de Si et Mg et également de Ca, Al, K, Fe et Na (**Fig. 12A-C**). Leurs rapports Mg/Si et $(\text{Mg}+\text{Al}+\text{Fe})/\text{Si}$ sont de $0,66 \pm 0,15$ et $0,74 \pm 0,18$ ($n = 12$) respectivement (**Tableau 4**). Le rapport Mg/Si aurait été compatible avec celui d'une sépiolite $[\text{Mg}_4\text{Si}_6\text{O}_{15}(\text{OH})_2 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})]$. Cependant au vu des différents éléments chimiques (lesquels ?) composant cette phase et du rapport

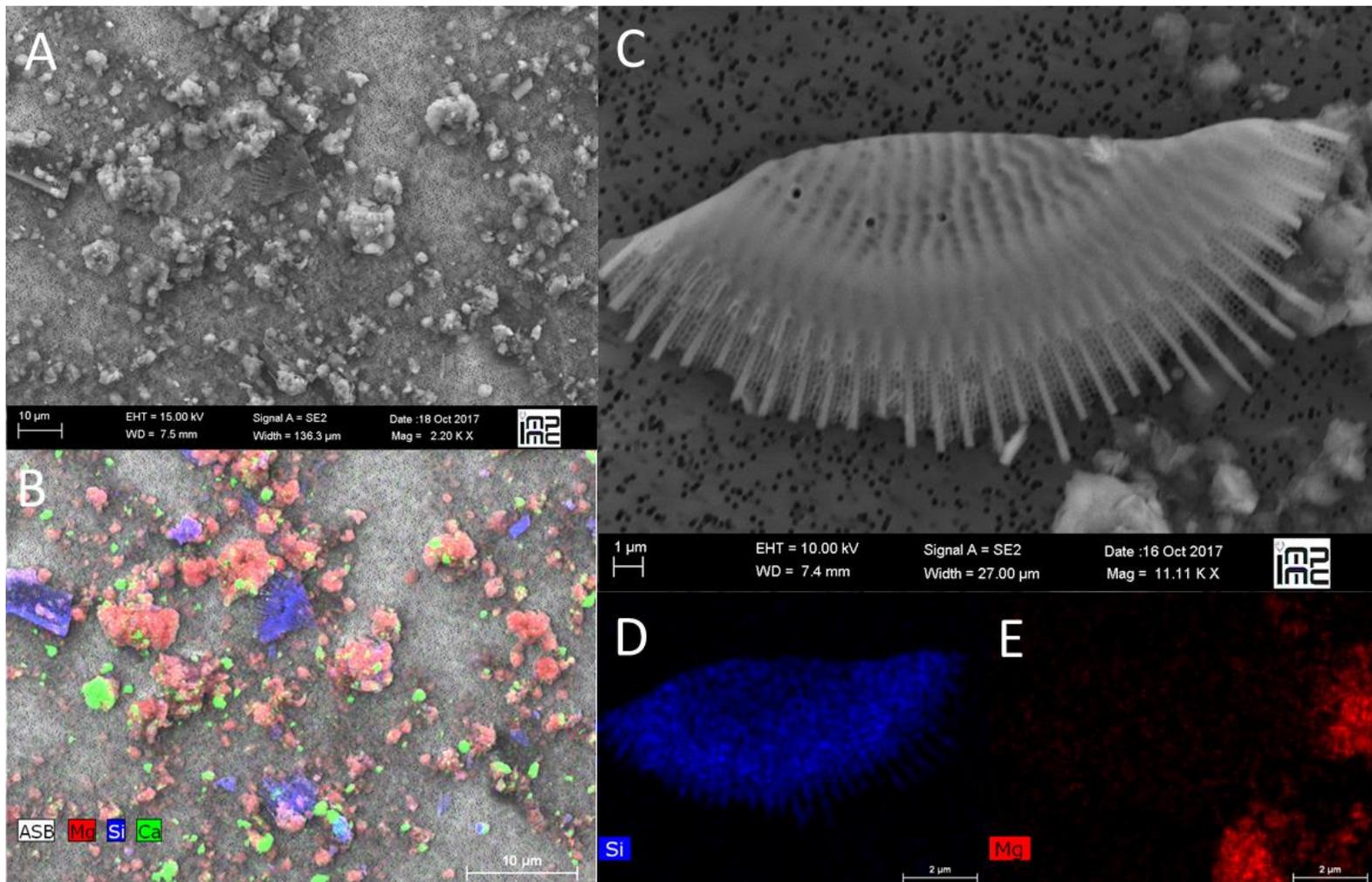


Figure 10. Observation en microscopie électronique à balayage du sédiment prélevé en subsurface sur la rive Nord du lac d'Alchichica. On peut une image obtenue en imagerie SE2 de l'échantillon présentant, des précipités d'aragonite, d'hydromagnésite et des frustules de diatomées (A), avec les cartographies EDXS associées du silicium, du calcium et du magnésium (B). On peut voir une frustule de diatomée avec des précipités d'hydromagnésite et d'aragonite obtenues par imagerie en mode SE2 (A). La cartographie élémentaire du Si (D) et du Mg (E).

(Mg+Al+Fe)/Si, il pourrait s'agir d'une phase de type stévensite hydratée $[(Ca,Na)_xMg_{3-x}(Si_4O_{10})(OH)_2.nH_2O]$. On peut alors calculer la formule de cette phase de type stévensite, pauvre en Al : $Na_{0,12}K_{0,009}Ca_{0,31}Fe_{0,2}Al_{0,15}Mg_{2,65}Si_4O_{10}(OH)_2.nH_2O$ (**Fig. 11A-C et 12D-F**). Autre fait intéressant : en dehors des silicates de Mg remplaçant des frustules de diatomées, nous retrouvons systématiquement des silicates de magnésium autour des feldspaths dans les échantillons de faibles (1-1,1 cm) et plus fortes (15-19 cm) profondeurs de la carotte, avec plus d'Al, K, et Na et moins de Mg que la phase composant les frustules de diatomées, (**Fig. 11A-C et 12D-F**). On évalue ainsi pour ces silicates les rapports Mg/Si et (Mg+Al+Fe)/Si à $0,42 \pm 0,14$ et $0,69 \pm 0,15$ respectivement

(Tableau 4). Le Mg/Si pourrait évoquer une montmorillonite $\text{Na}_x(\text{Al}_{2-x}\text{Mg}_x)\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Cependant encore une fois au vu des différents éléments chimiques Ca, Fe et K composant cette phase et du rapport $(\text{Mg}+\text{Al}+\text{Fe})/\text{Si}$, il pourrait s'agir d'une phase de type stévensite hydratée $[(\text{Ca},\text{Na})_x\text{Mg}_{3-x}(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}]$. Ainsi nous avons déterminé la formule de cette phase de type stévensite riche en Al : $\text{Na}_{0,21}\text{K}_{0,12}\text{Ca}_{0,31}\text{Fe}_{0,2}\text{Al}_{0,9}\text{Mg}_{1,7}\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

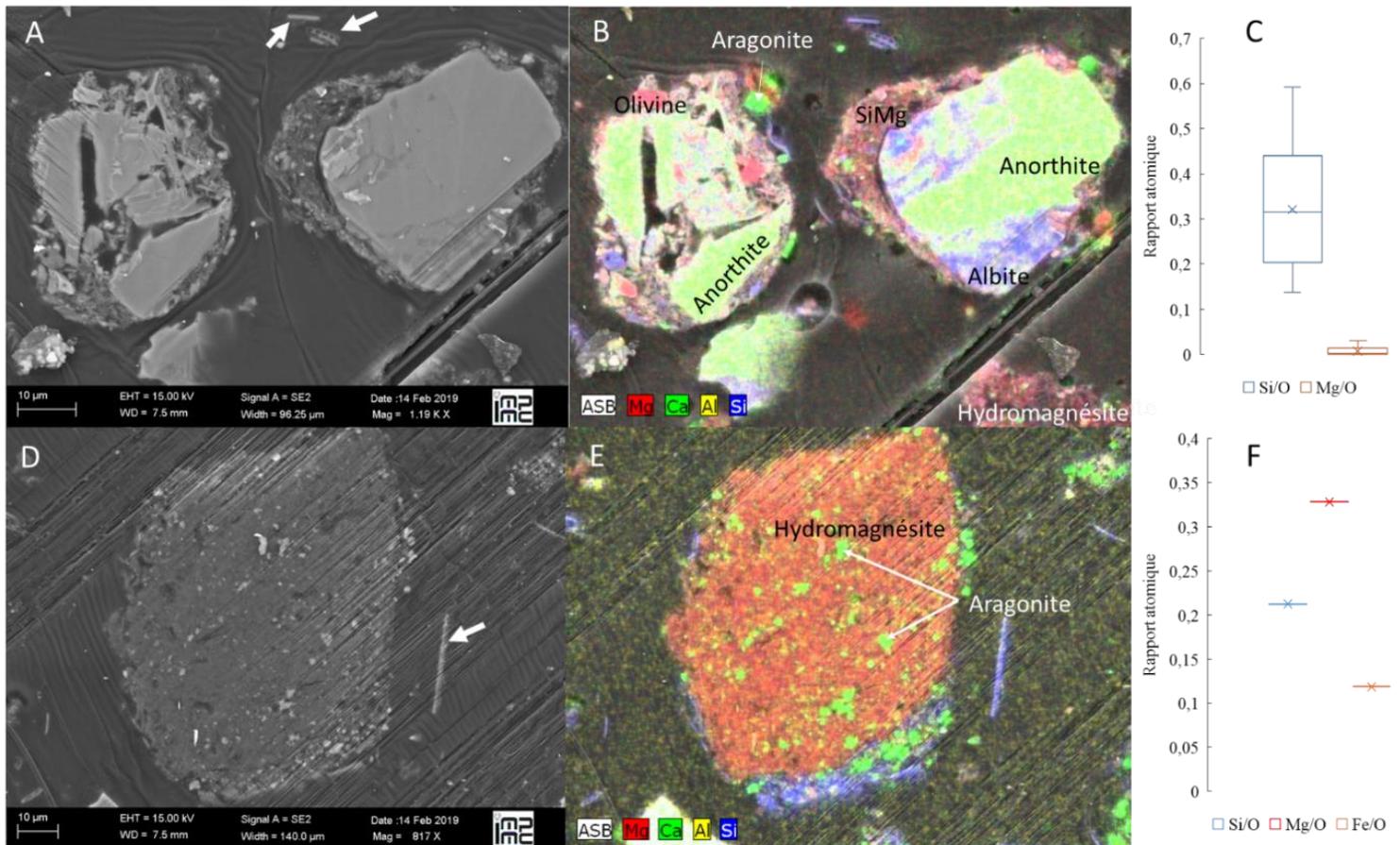


Figure 11. Analyses au MEB en mode SE2 de l'échantillon sédimentaire enrobé entre 1 et 1,1 cm dans les sédiments sur au centre du lac d'Alchichica. Image MEB de feldspaths entouré de saponite (SiMg) (A) avec les analyses EDXS associées du silicium, du calcium, du magnésium et de l'aluminium (B). Les analyses quantitatives effectuées sur les frustules de diatomées (17 mesures), ici représentés par des boîtes à moustache des différents rapports atomiques (C). On peut également voir une plage d'hydromagnésite avec des précipités d'aragonite à l'intérieur (D) avec les cartographies EDXS associées du silicium, du calcium, du magnésium et de l'aluminium (E). Les analyses quantitatives effectuées sur les grains d'olivine que l'on peut par exemple retrouver en B (4 mesures), ici représentés par des boîtes à moustache des différents rapports atomiques (F). Les flèches blanches indiquent certaines frustules de diatomées qui ont fait l'objet d'analyses EDXS.

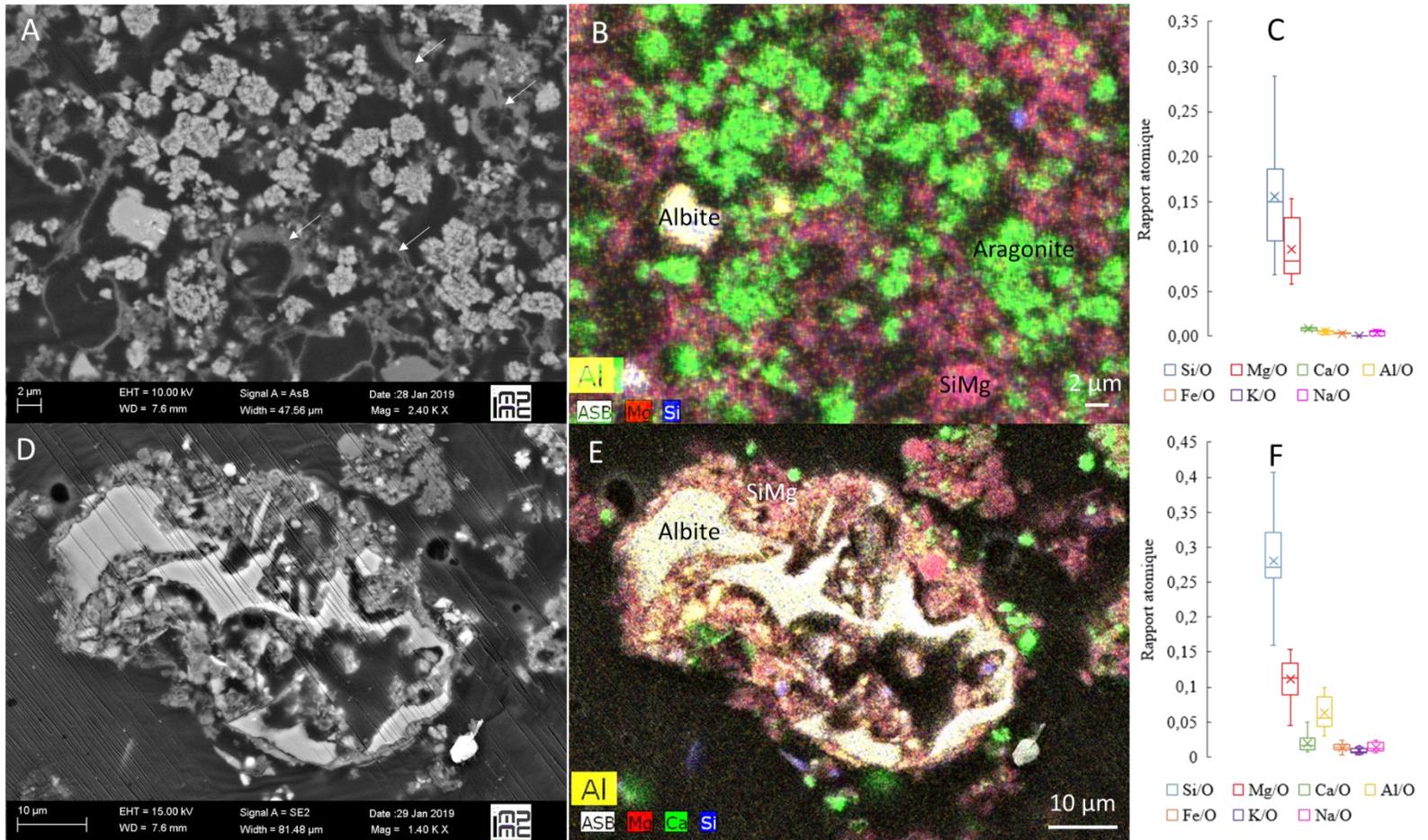


Figure 12. Analyses au MEB de l'échantillon sédimentaire enrobé entre 15 et 19 cm dans les sédiments au centre du lac d'Alchichica. Image MEB où les frustules de diatomées sont remplacées par la phase de saponite (A) avec les analyses EDXS associées du silicium, du calcium, du magnésium et de l'aluminium (B et E). Les analyses quantitatives effectuées sur les frustules de diatomées (12 mesures), ici représentés par des boîtes à moustache des différents rapports atomiques (C). Les flèches blanches indiquent les frustules de diatomées. On peut également voir une albite complètement altérée entourée de phases silicatées magnésiennes (D) avec les analyses EDXS associées du silicium, du calcium, du magnésium et de l'aluminium (E). Les analyses quantitatives effectuées sur les phases silicatées magnésiennes autour des feldspaths (20 mesures), ici représentés par des boîtes à moustache des différents rapports atomiques (F).

Tableau 4. Analyses semi-quantitatives par MEB-EDXS des silicates de Mg associés aux feldspath (notés SiMg) ou remplaçant les frustules de diatomée (notés frustule de diatomée) dans l'échantillon AL2016-C1_10.

| SiMg n = 20 | [Si] (% at) | [Mg] (% at) | [Al] (% at) | [Ca] (% at) | [Fe] (% at) | [K] (% at) | [Na] (% at) | Mg/Si | (Mg+Fe+Al)/Si |
|------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|----------------|-------|---------------|
| Moyenne (% at) | 10,4 | 4,13 | 2,41 | 0,73 | 0,52 | 0,33 | 0,53 | 0,42 | 0,69 |
| Ecart-type (% at) | 2,26 | 0,92 | 0,85 | 0,57 | 0,25 | 0,17 | 0,28 | 0,14 | 0,13 |

| Frustule de diatomée n = 12 | [Si] (% at) | [Mg] (% at) | [Al] (% at) | [Ca] (% at) | [Fe] (% at) | [K] (% at) | [Na] (% at) | Mg/Si | (Mg+Fe+Al)/Si |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|----------------|-------|---------------|
| Moyenne (% at) | 5,53 | 3,44 | 0,19 | 1,76 | 0,22 | 0,01 | 0,16 | 0,66 | 0,74 |
| Ecart-type (% at) | 4,32 | 2,07 | 0,26 | 3,02 | 0,23 | 0,06 | 0,10 | 0,15 | 0,18 |

Nous avons dans un second temps prélevé une lame FIB d'environ 100 nm d'épaisseur dans l'échantillon enrésiné de 15 à 19 cm de profondeur (AL2016-C1_10) afin de déterminer si les frustules de diatomées étaient complètement remplacées par la phase silicatée. L'observation en STEM montre que l'aspect du silicate de magnésium est très fibreux et la diffraction électronique montre que cette phase est amorphe (**Fig. 13A et E**). De plus, l'analyse EDXS montre que les frustules de diatomée sont complètement remplacées par la phase silicatée magnésienne (**Fig. 13B et F**). Enfin, on peut noter la faible teneur en Al, Ca et Fe dans ce silicate magnésien qui comparativement à l'analyse faite en MEB-EDXS ne montre pas de K et Na (**Fig. 13C, D et F**) (**Tableau 5**). D'après l'analyse MET-EDXS le rapport Mg/Si mesuré ($0,63 \pm 0,04$) est identique à celui obtenu en MEB-EDXS ($0,66 \pm 0,15$). Le rapport (Mg+Al+Fe)/Si mesuré ($0,66 \pm 0,04$) est lui aussi similaire à celui obtenue en MEB-EDX ($0,74 \pm 0,18$) au vu des incertitudes. La présence de Fe et Ca est compatible avec une smectite de type stévensite. La formule de cette smectite de type stévensite est $\text{Ca}_{0,18}\text{Fe}_{0,07}\text{Al}_{0,05}\text{Mg}_{2,55}\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2.n\text{H}_2\text{O}$. Nous avons également déterminé la composition des autres phases silicatées magnésiennes que l'on retrouve autour des feldspaths (**Tableau 5**). D'après l'analyse MET-EDXS leur rapport Mg/Si ($0,67 \pm 0,04$) est plus élevé que celui mesuré en MEB alors que le rapport (Mg+Al+Fe)/Si ($0,70 \pm 0,04$) est très similaire à celui mesuré en MEB.

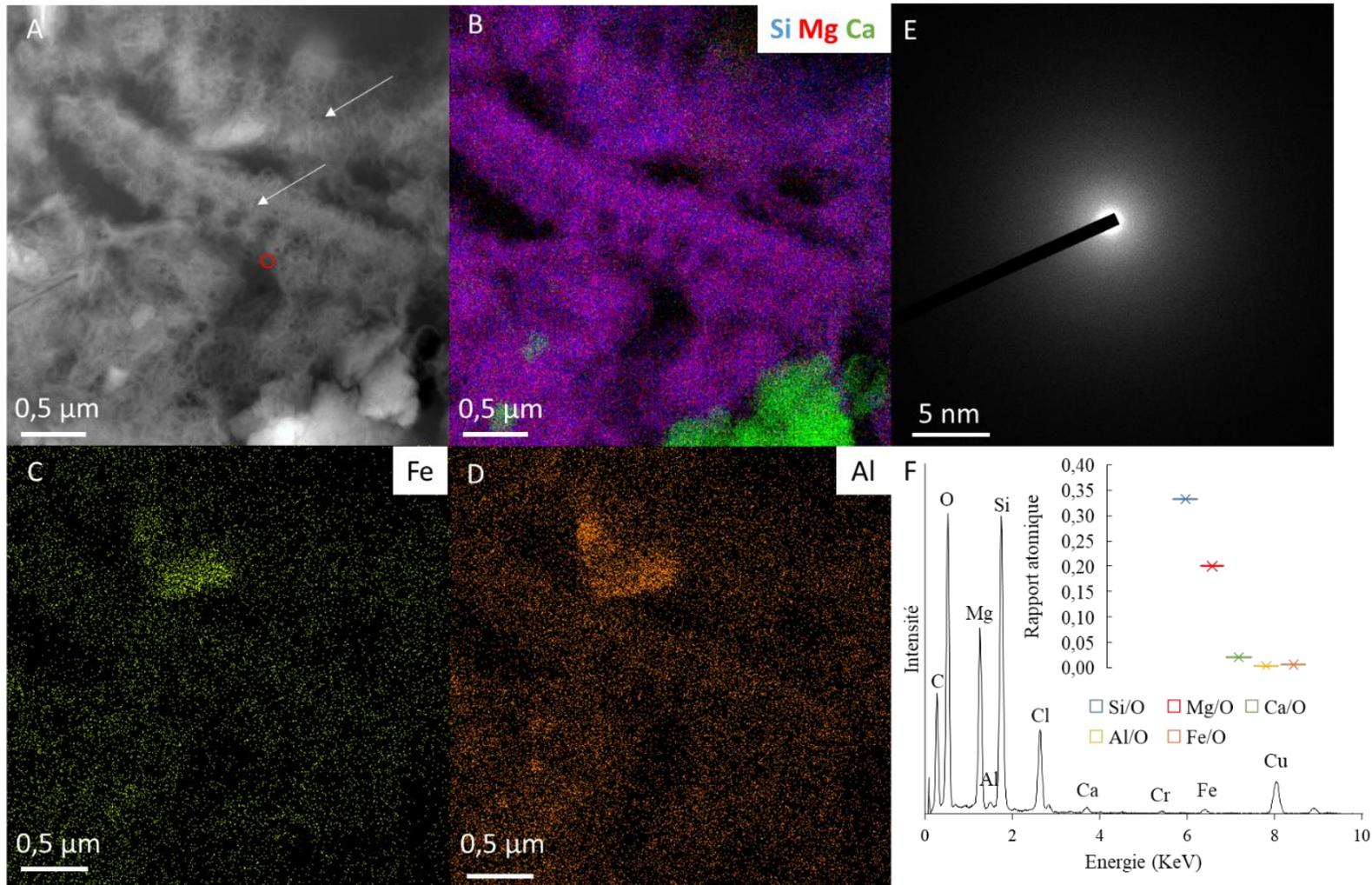


Figure 13. Analyses au STEM en mode HAADF d'une lame mince réalisée en FIB de l'échantillon compris entre 15 et 19 cm de la carotte sédimentaire du centre du lac d'Alchichica. On peut y voir un fragment de frustule de diatomée complètement remplacé par la phase kérolite/smectite (A). La superposition des cartographies élémentaires du Si, Mg et Ca y est représentée (B) ; les cartographies élémentaires du Fe (C) et Al (D) sont montrées. Un cliché de diffraction électronique obtenues à partir du diaphragme de sélection d'aire de 100 nm issue de zone délimitée par le cercle rouge (E). Le spectre de l'analyse EDXS des frustules indiqués par les flèches blanches avec également un graphique des rapports atomiques associés des 2 frustules de diatomées (F).

Tableau 5. Analyses à la microsonde électronique obtenues en MET-EDXS sur les frustules de diatomée et les phases silicatées magnésiennes de l'échantillon AL2016-C1_10.

| SiMg n = 5 | [Si] (% at) | [Mg] (% at) | [Al] (% at) | [Ca] (% at) | [Fe] (% at) | Mg/Si | (Mg+Fe+Al)/Si |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|---------------|
| Moyenne (% at) | 23,12 | 15,39 | 0,31 | 0,45 | 0,38 | 0,67 | 0,70 |
| Ecart-type (% at) | 2,54 | 1,49 | 0,15 | 0,11 | 0,06 | 0,04 | 0,04 |

| Fustule de diatomée n = 2 | [Si] (% at) | [Mg] (% at) | [Al] (% at) | [Ca] (% at) | [Fe] (% at) | Mg/Si | (Mg+Fe+Al)/Si |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------|---------------|
| Moyenne (% at) | 22,08 | 13,95 | 0,24 | 0,60 | 0,35 | 0,63 | 0,66 |
| Ecart-type (% at) | 1,11 | 1,61 | 0,04 | 0,87 | 0,00 | 0,04 | 0,04 |

3.1.4. Quantification de la teneur des phases minérales

Les résultats de la composition relative des sédiments du centre et de la rive nord du lac d'Alchichica ont été déterminés grâce aux formules présentées dans le **tableau 6**. A l'aide de l'ensemble des analyses chimiques globales, des analyses minéralogiques obtenues en FTIR et DRX ainsi que des analyses en microscopie nous avons pu déterminer les teneurs des différentes phases minérales en fonction de la profondeur pour les deux carottes prélevées dans le lac d'Alchichica (**Fig. 14A et B**). Premièrement, pour le sédiment prélevé au centre du lac, nous avons fait l'hypothèse que la phase porteuse du Mg est l'hydromagnésite à 1 cm de profondeur. D'après les analyses minéralogiques et microscopiques l'hydromagnésite est entièrement dissoute à partir de 5,1 cm de profondeur. Ainsi les phases porteuses de Mg de 5,1 cm à 19 cm sont les phases de type stévensite pauvre en Al composant les frustules de diatomées et celles riches en Al se trouvant à la périphérie des feldspaths de type anorthite et albite. Afin de faciliter les calculs nous avons fait une moyenne géométrique des formules obtenues en MEB-EDXS des deux phases de type stévensite dont la formule chimique est : $\text{Na}_{0,165}\text{K}_{0,0645}\text{Ca}_{0,31}\text{Fe}_{0,2}\text{Al}_{0,5025}\text{Mg}_{2,175}\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. De plus, nous avons calculé les compositions relatives des différentes phases pour la profondeur à 1 cm et celle à 19 cm car les calculs impliquant la dissolution de l'hydromagnésite, le remplacement

des frustules de diatomées par la smectite de type stévensite pauvre en Al, mais également l'altération des feldspaths produisant la smectite de type stévensite riche en Al étaient extrêmement compliqués à déterminer. En outre, nous avons également fait la moyenne géométrique des feldspaths de type anorthite et albite pour avoir un feldspath de type labradorite de formule chimique : $\text{Na}_{0,5}\text{Ca}_{0,5}\text{Al}_{1,5}\text{Si}_{2,5}\text{O}_8$. Enfin une autre hypothèse est que la composition des feldspaths est la même dans le sédiment prélevé au niveau de la rive nord du lac d'Alchichica.

Tableau 6. Méthode pour la quantification des phases minérales de la carotte sédimentaire au centre et de la rive Nord du lac d'Alchichica. [X] sont les concentrations en % molaire de Na, Mg, Al, Ca et Si obtenue par ICP-OES.

| | Minéral | Formule chimique | Calcul |
|--|----------------|---|---|
| Sédiment au centre du lac d'Alchichica | Feldspaths | $\text{Na}_{0,5}\text{Ca}_{0,5}\text{Al}_{1,5}\text{Si}_{2,5}\text{O}_8$ | Feld = $[\text{Na}]/0,5 - (\text{Sté} \cdot 0,165)$ |
| | Stévensite | $\text{Na}_{0,165}\text{K}_{0,0645}\text{Ca}_{0,31}\text{Fe}_{0,2}\text{Al}_{0,5025}\text{Mg}_{2,175}\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ | Sté = $[\text{Mg}]/2,175$ à 19 cm de profondeur |
| | Aragonite | CaCO_3 | Ara = $[\text{Ca}] - [(\text{Sté} \cdot 0,31) + (\text{Feld} \cdot 0,5)]$ |
| | Silice amorphe | $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ | $\text{SiO}_2 = [\text{Si}] - [(\text{Sté} \cdot 4) + (\text{Feld} \cdot 2,5)]$ |
| | Hydromagnésite | $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_4$ | Hydromagn = $[\text{Mg}]/5$ à 1 cm de profondeur |
| Sédiment de la rive nord du lac d'Alchichica | Feldspaths | $\text{Na}_{0,5}\text{Ca}_{0,5}\text{Al}_{1,5}\text{Si}_{2,5}\text{O}_8$ | Feld = $[\text{Al}]/1,5$ |
| | Aragonite | CaCO_3 | Arag = $[\text{Ca}] - (0,5 \cdot \text{Feld})$ |
| | Silice amorphe | $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ | $\text{SiO}_2 = [\text{Si}] - (3 \cdot \text{Feld})$ |
| | Hydromagnésite | $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_4$ | Hydromagn = $[\text{Mg}]/5$ |

Ainsi, le premier résultat pour le sédiment prélevé au centre du lac montre donc une variation dans la composition relative en fonction de la profondeur (**Fig. 14A**). D'après les analyses minéralogique et microscopique, il y aurait un mélange entre une smectite de type stévensite hydratée riche en Al et une autre pauvre en Al qui devient majoritaire à part de 5,1 cm de profondeur avec une teneur estimée à 48,9 % en poids à 19 cm de profondeur. En parallèle les teneurs en silice amorphe et hydromagnésite diminuent de 31,7 à 2,46 % en poids et 19,8 à 0 % en poids respectivement de 1 à 19 cm de profondeur. La teneur en aragonite quant à elle, elle augmente de 0 à 19 cm passant de 20,2 à 30,6 % en poids. Concernant les feldspaths leur teneur est de 28,4 % en poids à 1 cm et diminue légèrement à 24,2 % à 19 cm de profondeur. Enfin nous avons obtenues des données TOC pour la profondeur à 19 cm mais pour 0 cm de profondeur. Celle-ci est de 1,9 % en poids à 19 cm de profondeur. Contrairement au sédiment au centre, le sédiment prélevé sur la

rive nord du lac présente peu de variations (**Fig. 14B**). L'hydromagnésite est la phase minérale majeure de cette carotte sédimentaire avec près de 69 % en poids tout le long de la carotte sédimentaire sauf entre 6 et 10 cm de profondeur où sa teneur passe à 71 % en poids. La seconde phase majeure de cette carotte sédimentaire est l'aragonite avec une teneur qui augmente de 13,1 à 16,5 % en poids de 0 à 18 cm de profondeur. En outre, les feldspaths ont une teneur qui décroît de 10 à 8,7 % en poids de 0 à 18 cm de profondeur ce qui reste largement inférieure à la teneur en feldspath du sédiment au centre du lac. La silice amorphe est très peu présente dans ce sédiment de la rive nord avec une teneur qui diminue en fonction de la profondeur passant de 6,4 à 4,7 % en poids de 0 à 18 cm de profondeur. Enfin, la contribution en poids de la matière organique est très faible avec des valeurs qui diminuent de 1 à 0,4 % en poids de 0 à 18 cm de profondeur.

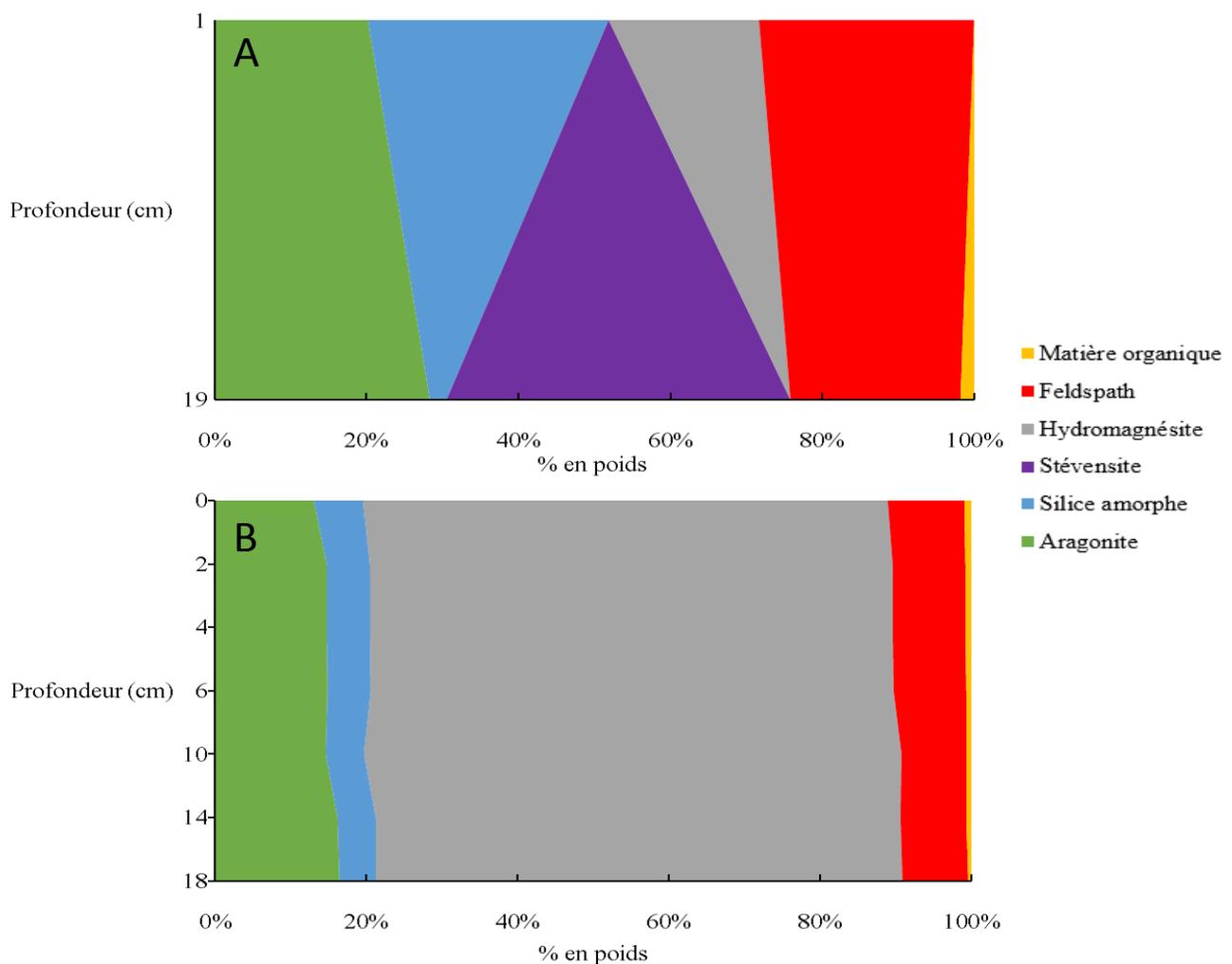


Figure 14. Teneur en matières minérales (% en poids) en fonction de la profondeur dans les carottes sédimentaires prélevées au centre (A) et sur la rive Nord (B) du lac d'Alchichica.

3.2. Analyses du sédiment du lac de La Preciosa

3.2.1. Etude de la géochimie globale des eaux de surface et des eaux porales

Les analyses chimiques des échantillons de la colonne d'eau prélevés en Mai 2016 au centre du lac de La Preciosa montrent une $[Ca^{2+}]$ qui augmente de 80 μM à 262 μM entre 0 et 15 m puis reste stable aux alentours de 230 μM jusqu'au fond du lac (**Fig. 15A**). Contrairement à la $[Ca^{2+}]$, les $[Mg^{2+}]$ et $[H_4SiO_4]$ ne montrent pas de variations en fonction de la profondeur (**Fig. 15B et C**). Concernant la chimie des eaux porales, on note que la $[Ca^{2+}]$ augmente de 240 μM à 364 μM de 0 à 19 cm de profondeur. La même observation est faite pour la $[H_4SiO_4]$ qui augmente de 546 μM à 0 cm de profondeur pour finalement être à plus de 1050 μM à 19 cm de profondeur (**Fig. 15D et F**). Enfin, la $[Mg^{2+}]$ diminue légèrement de 7870 μM à 7581 μM de 0 cm à 3 cm de profondeur, puis augmente de 7581 μM à 8020 μM de 3 cm à 19 cm de profondeur (**Fig. 15E**).

Pour rappel, les pH des eaux porales n'ont pas été mesurées. Ainsi, nous avons fait varier le pH comme c'est le cas dans les eaux porales du lac d'Alchichica et d'autre part nous l'avons laissé constant à un pH alcalin de 8,5.

On note que les eaux porales des sédiments prélevés au centre du lac sont sursaturées par rapport à la « sépiolite amorphe » décrite par Wollast, (1968) et sous saturées par rapport à la silice amorphe dans les conditions où le pH varie ou non (**Fig. 16A**). À noter que l'eau de surface du lac est également sursaturée par rapport à la sépiolite amorphe et sous saturée par rapport à la silice amorphe (**Fig. 16A**). On montre également que les eaux porales de la carotte sédimentaire et l'eau du lac sont dans le champ de stabilité de l'aragonite (**Fig. 16B**).

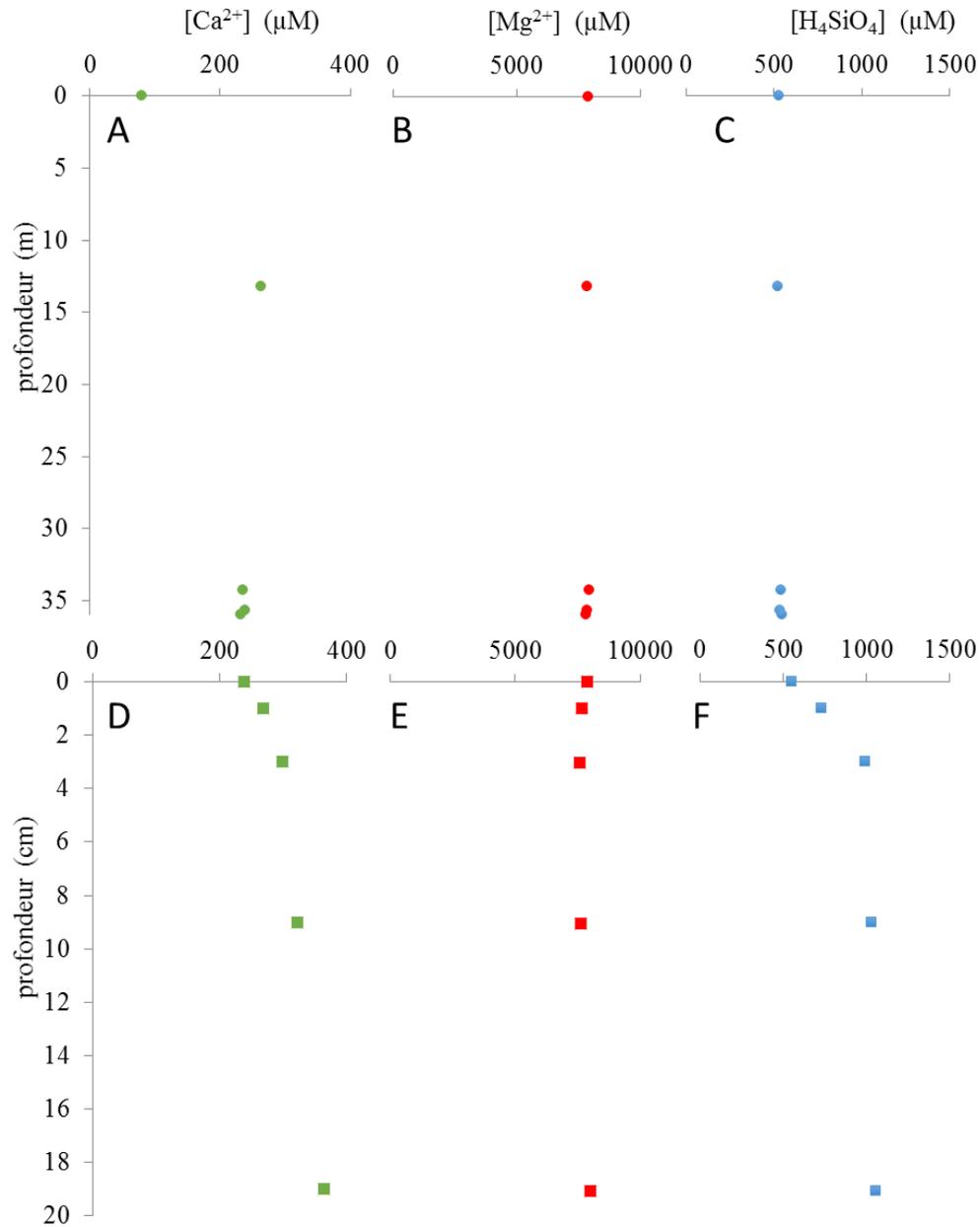


Figure 15. Graphique de la concentration de Ca^{2+} (A et D), Mg^{2+} (B et E) et H_4SiO_4 (C et F) de la colonne d'eau (\bullet) (A-C) et des eaux porales prélevées au centre (\blacksquare) (D-F) du lac de La Preciosa en fonction de la profondeur.

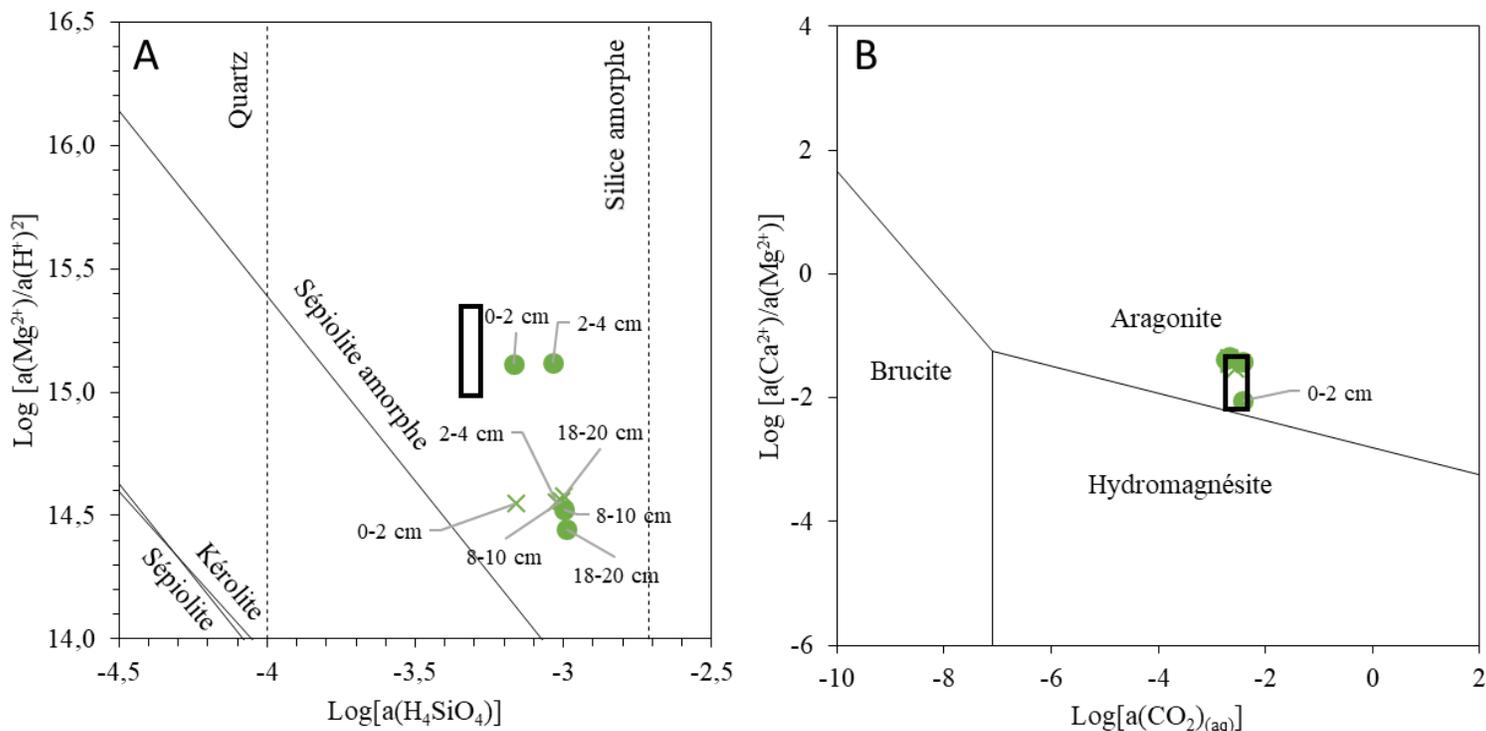


Figure 16. Diagramme de solubilité montrant les solubilités apparentes de différentes phases de silicates de magnésium (A) et domaine de stabilité des carbonates (B) pour les eaux porales des sédiments au centre du lac La Preciosa. Pour le système Ca-Mg-C-O-H, les lignes indiquent les équilibres métastables entre brucite, aragonite et hydromagnésite. La composition chimique de la colonne d'eau du lac de La Preciosa est représentée par des boîtes noires. Les étiquettes de certains points indiquent la profondeur. Pour le système Mg-Si-O-H, les traits pleins représentent les lignes de solubilité de la kérolite et sépiolite (Stoessel, 1988), sépiolite amorphe (Wollast et al., 1968). Les ronds représentent les conditions où l'on fait varier le pH, les croix celles où le pH de varie pas.

3.2.2. Caractérisation minéralogique globale par DRX et spectroscopie infrarouge

Suite à l'analyse globale en DRX de la carotte de La Preciosa, nous avons identifié qu'elle est composée principalement d'aragonite et d'anorthite (**Fig. 17A**). On observe peu de variation dans les profils de diffraction en fonction de la profondeur. De plus, on note deux pics très faibles et larges associés à des phases peu cristallisées et hydratées qui sont la silice amorphe et un silicate de magnésium trioctaédrique de type smectite ou kérolite, respectivement à 5,8 Å et à 4,5 Å (**Fig. 17A**). Il s'avère difficile de déterminer d'autres pics larges correspondant aux silicates de magnésium se trouvant entre 40 et 41° et 71 et 72° $2\theta(\text{Co})$ (**Fig. 17B et C**). Enfin, nous pouvons associer certains pics à la présence de quartz.

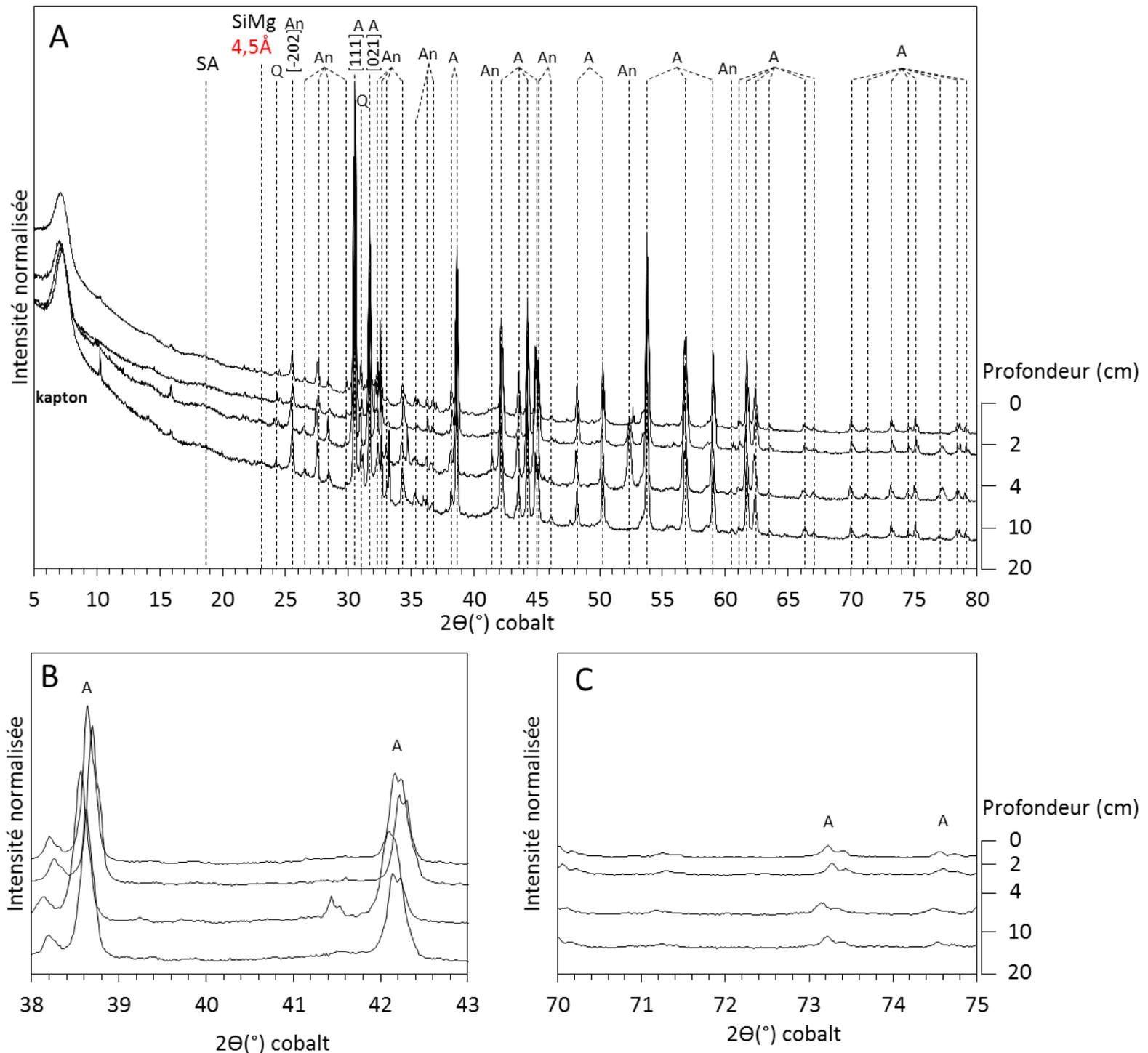


Figure 17. Superposition des diffractogrammes des différentes profondeurs de la carotte prélevée au centre du lac de La Preciosa principalement composées d'aragonite et d'anorthite (A). Superposition des diffractogrammes des différentes profondeurs de la carotte prélevée au centre du lac de La Preciosa de la région entre 38 et 43° 2θ(Co) (B) et 70 à 75° 2θ(Co) (C). A: aragonite; An: anorthite; Q: Quartz SiMg: kérolite, smectite ; SA : silice amorphe.

L'analyse en infrarouge nous apporte des informations supplémentaires. En effet, on observe des bandes à 473 et 540 cm^{-1} qui sont caractéristiques des silicates trioctaédriques tels que la kéroélite et/ou une smectite (saponite ou stévensite) ainsi que des bandes indexées comme les étirements Si-O à 1026 cm^{-1} et Mg₃-OH à 3680 cm^{-1} (**Fig. 18**). A noter tout de même que la bande à 3680 cm^{-1} est assez large et peu intense. Les bandes à 3625 cm^{-1} sont indexées pour une saponite ferrugineuse liées aux étirements Mg₂Fe³⁺OH (Quakernaat, 1970). La bande à 910 cm^{-1} de faible intensité est quant à elle associée aux vibrations d'étirement du silanol (Si-OH) des silicates de magnésium mais également de la silice amorphe (**Fig. 18**). Ainsi, on note également des absorptions dans la région des étirements Si-O à 1101 et 1235 cm^{-1} caractéristiques de la présence de silice amorphe (**Fig. 18**). De plus l'étirement OH de SiOH et de l'eau est présent vers 3400 cm^{-1} et la vibration de flexion de l'eau vers 1660 cm^{-1} (**Fig. 18**). Enfin, les vibrations $\nu_1\text{CO}_3$ et $\nu_3\text{CO}_3$ de l'aragonite respectivement à 1084 cm^{-1} et 1483 cm^{-1} sont observées.

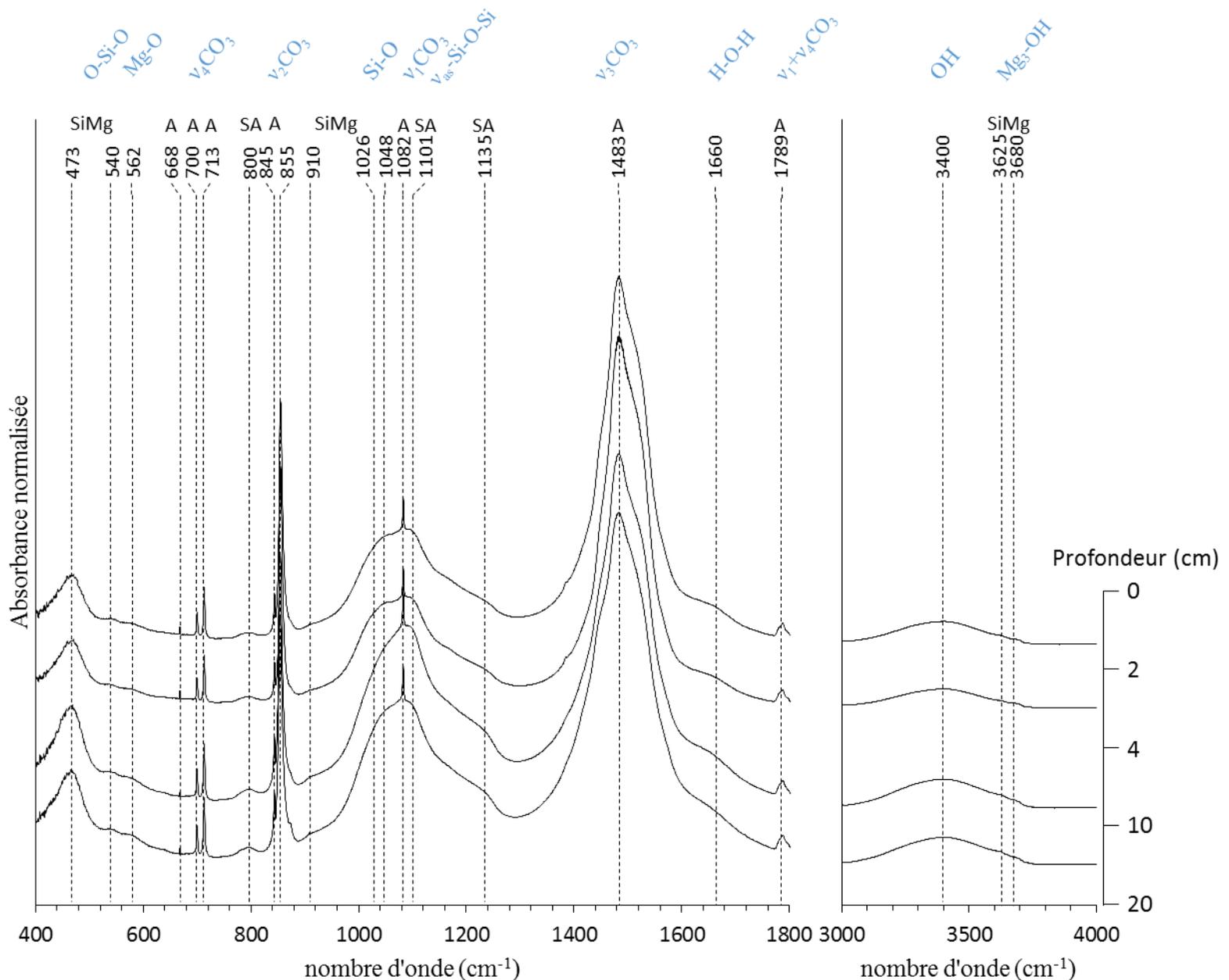


Figure 18. Superposition des spectres des différentes profondeurs de la carotte prélevée au centre du lac de La Preciosa obtenues en FTIR. A: aragonite, SiMg : kérolite, smectite ; SA : silice amorphe.

3.2.3. Etude des phases minérales par microscopie électronique

Les observations en microscopie électronique à balayage de l'échantillon Prec2016-C3_9 compris entre 6 et 10 cm de profondeur, nous ont permis de confirmer que la phase principale du sédiment de La Preciosa est l'aragonite (**Fig. 19A et B**). On peut également voir qu'il y a de

nombreuses frustule de diatomées (**Fig. 19A et C**). Ces frustules ont différentes morphologies. En effet, certaines sont plutôt en forme de disques avec sur les bords effilochés, d'autres sont allongées. Enfin, la plupart des frustules sont fragmentées en plusieurs morceaux.

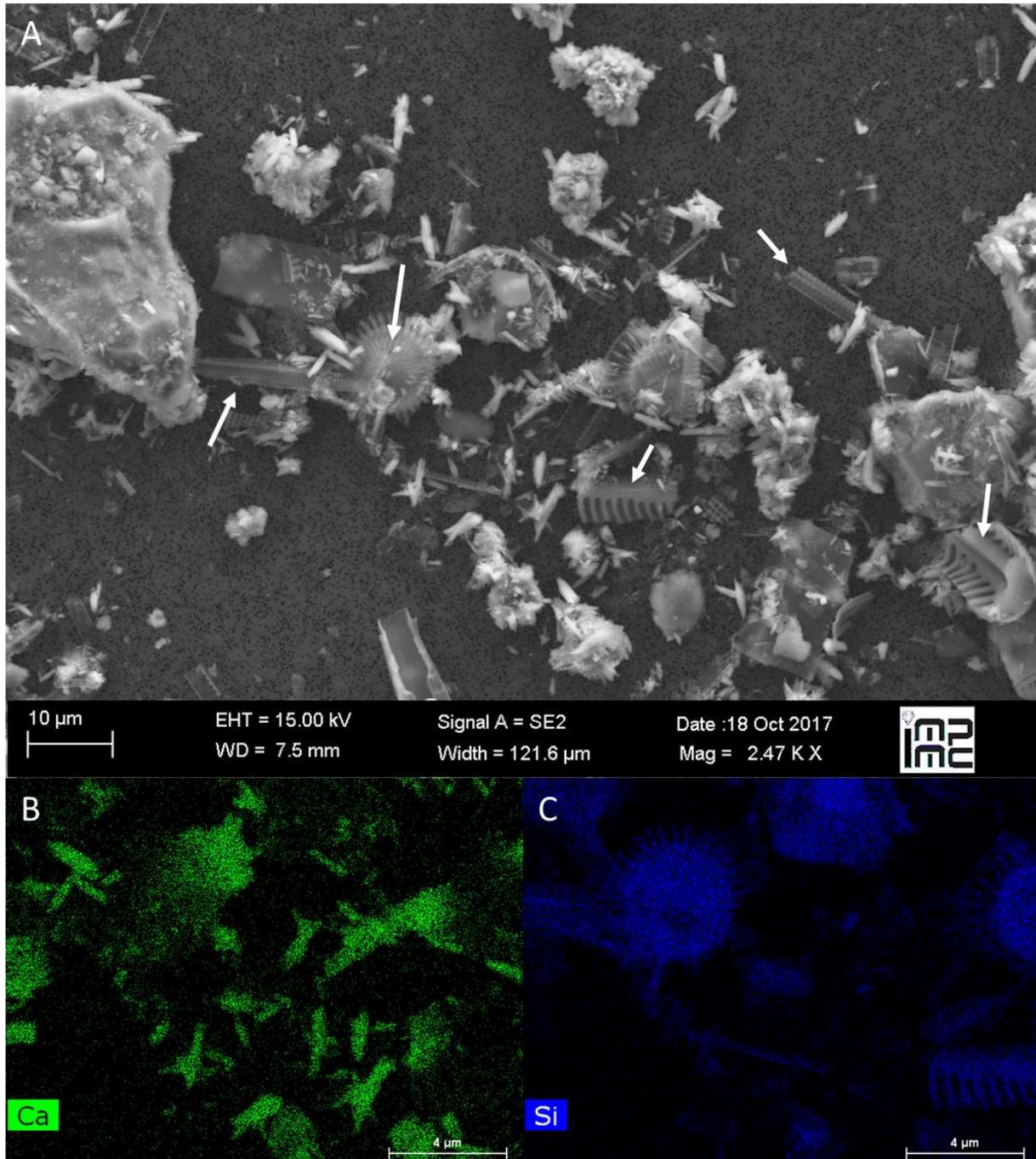


Figure 19. Observation en microscopie électronique à balayage de l'échantillon Prec2016-C3_9 compris entre 6 et 10 cm de profondeur prélevé au centre du lac La Preciosa. Ici, sont présentés l'image obtenue en mode SE2 on peut voir des précipités et des frustules de diatomées (A) et les cartographies de la chimie élémentaire du Ca (B) et du Si (C). Les flèches blanches indiquent les frustules de diatomées.

Les silicates de magnésium étant très peu présents, l'échantillon se trouvant à une profondeur entre 0 cm et 2 cm de profondeur a été décarbonaté à l'acide acétique. L'échantillon a été placé sur une grille MET. L'observation de l'échantillon nous a permis de mettre en évidence des colliers de silicate de magnésium avec du Fe, Ca et de faible teneur en Mn, Al et S (**Fig. 20A-C**). L'analyse en MET-EDXS de l'anneaux, faites sur 1 zone d'analyse, montrent que ce précipité a une composition chimique constitué de $2,72 \pm 0,17$ at% d'aluminium, $2,14 \pm 0,19$ at% de calcium, $7,13 \pm 0,05$ at% de fer, de $0,76 \pm 0,53$ at% de manganèse, de $9,82 \pm 0,5$ at% de magnésium et de $20,07 \pm 0,02$ at% de silicium, le reste étant l'oxygène mais également le carbone de la grille (**Fig. 20C**). D'après l'analyse minéralogique en FTIR et DRX et microscopique MET-EDXS nous avons émis l'hypothèse que les anneaux sont les seuls silicate de magnésium dans cet échantillon et que c'est bien eux que l'on a détecté par les analyses minéralogiques globales comme étant une smectite de type saponite ferrugineuse de formule : $\text{Ca}_{0,38}\text{Mn}_{0,13}(\text{Mg}_{1,72}\text{Fe}_{1,28})(\text{Si}_{3,52}\text{Al}_{0,48})\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Ici on considère que le Fe est Fe(III).

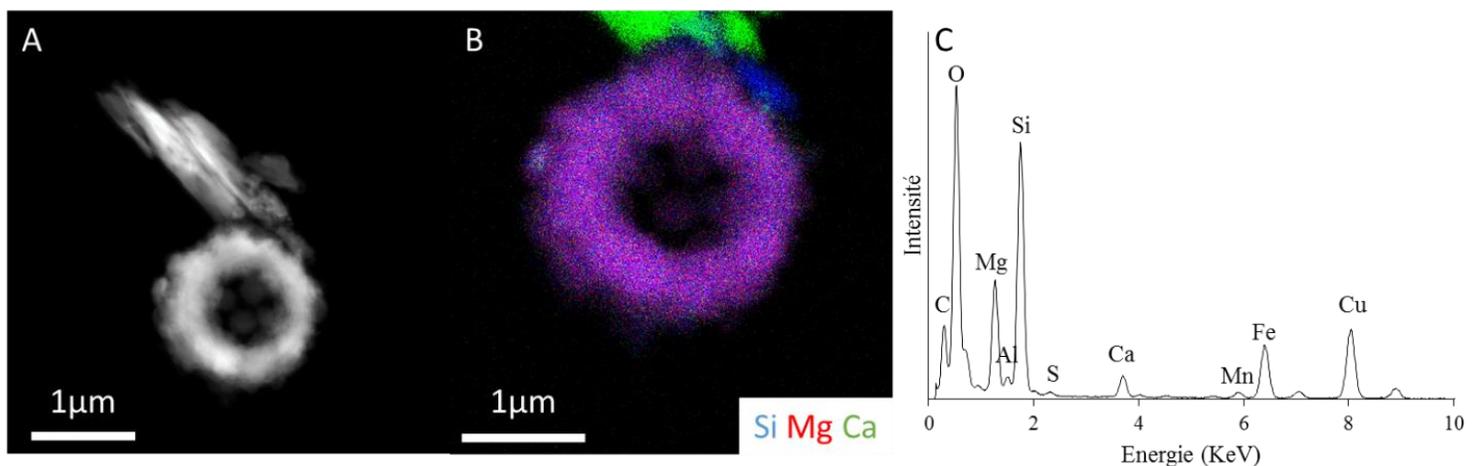


Figure 20. Observation en microscopie électronique à transmission en mode HAADF d'un échantillon décarbonaté du sédiment prélevé au centre du lac La Preciosa. On peut voir un précipité d'aragonite et un collier de silicate de magnésium (A). L'overlay du Ca, Si et Mg est représenté (B), ainsi que le spectre EDXS du collier de silicate de magnésium (C).

3.2.4. Quantification de la proportion relative des phases minérales dans les sédiments

La proportion relative des phases minérales du sédiment de La Preciosa a été déterminée grâce aux formules présentés dans le **tableau 7**. Les résultats nous montrent quelques variations dans la teneur des différentes phases minérales en fonction de la profondeur (**Fig. 21**). En effet, on peut voir que l'aragonite est bien la phase minérale majeure de ce sédiment avec une teneur qui diminue avec la profondeur passant de 63,6 % à 53,8 % en poids de 0 cm à 20 cm (**Fig. 21**). La silice amorphe ainsi que les feldspaths voient leur teneur relative augmenter avec la profondeur passant de 25,6 % à 31,1 % en poids et 5,2 % à 8,2 % en poids respectivement (**Fig. 21**). Quant à la saponite qui est la phase minérale la moins représentée dans le sédiment sa teneur reste relativement stable en fonction de la profondeur autour de 4 à 5 % en poids (**Fig. 21**). Enfin les données TOC nous permises d'avoir la teneur en matière organique qui est peu présente. Cependant elle varie légèrement. Elle diminue de 1,87 à 1,76 % en poids de 0 à 4 cm puis augmente à 2,1 % en poids jusqu'à 10 cm de profondeur. Enfin elle diminue à 1,75 % en poids du sédiment jusqu'à 20 cm (**Fig 21**).

Tableau 7. Méthode pour la quantification des phases minérales. [X] sont les concentrations en % molaire de Fe, Al, Ca et Si obtenue par ICP-OES.

| Minéral | Formule chimique | Calcul |
|-----------------------|--|---|
| Saponite Ferrugineuse | $\text{Ca}_{0,38}\text{Mn}_{0,13}(\text{Mg}_{1,72}\text{Fe}_{1,28})(\text{Si}_{3,52}\text{Al}_{0,48})\text{O}_{10}(\text{OH})_2.n\text{H}_2\text{O}$ | $\text{Sap} = [\text{Fe}]/1,28$ |
| Anorthite | $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$ | $\text{An} = [\text{Al}]/2 - \text{Sap} * 0,48$ |
| Aragonite | CaCO_3 | $\text{Ara} = [\text{Ca}] - (\text{An} + \text{Sap} * 0,38)$ |
| Silice amorphe | $\text{SiO}_2.n\text{H}_2\text{O}$ | $\text{Si} = [\text{Si}] - (\text{An} * 2 + \text{Sap} * 3,52)$ |

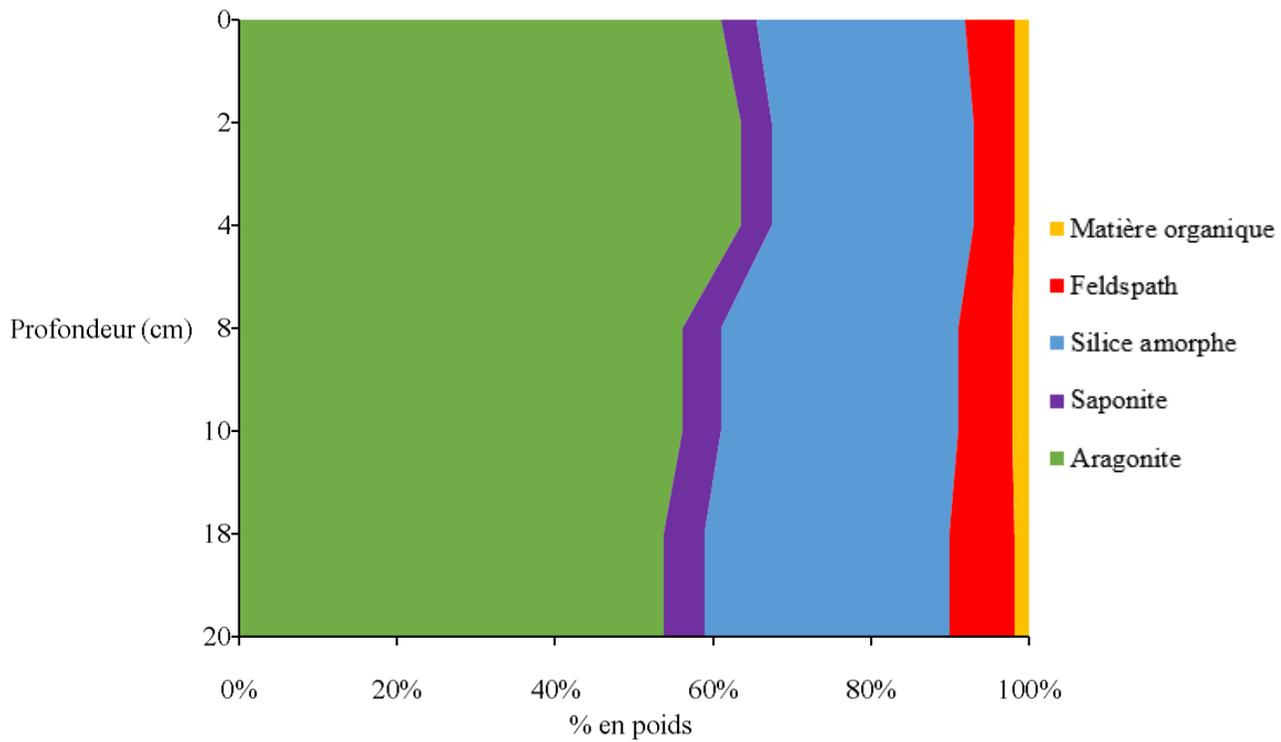


Figure 21. Proportion massique des phases minérales en (% en poids) en fonction de la profondeur dans la carotte sédimentaire prélevée au centre du lac de La Preciosa.

3.3. Analyses du sédiment du lac d'Atexcac

3.3.1. Etude de la composition chimique de la colonne d'eau et des eaux porales des sédiments du lac d'Atexcac

L'analyse chimique de la colonne d'eau dont des échantillons ont été prélevés à différentes profondeurs au centre du lac d'Atexcac montre que les $[Ca^{2+}]$, $[Mg^{2+}]$ et $[H_4SiO_4]$ restent relativement constantes en fonction de la profondeur avec tout de même de légères variations pour la $[Ca^{2+}]$ et $[H_4SiO_4]$ (**Fig. 22A-C**). Concernant les eaux porales du sédiment prélevé au centre du lac, on note que les $[Ca^{2+}]$ et $[Mg^{2+}]$ restent également relativement constantes de 0 cm à 9,5 cm de profondeur avec des légères variations pour la $[Ca^{2+}]$ (**Fig. 22D et E**). Cependant, pour la $[H_4SiO_4]$ on voit qu'elle diminue de 0 cm à 9,5 cm de 770 μM à 580 μM (**Fig. 22F**).

On note que les eaux porales des sédiments prélevés au centre du lac d'Atexcac sont sursaturées par rapport à la sépiolite amorphe décrite par Wollast (1968) et sont sous-saturées par rapport à la silice amorphe (**Fig. 23A**). À noter que la colonne d'eau du lac est également sursaturée par rapport à la sépiolite amorphe et sous-saturée par rapport à la silice amorphe (**Fig. 23A**). Contrairement aux lac d'Alchichica et La Preciosa, la colonne d'eau du lac d'Atexcac est plus sursaturée vis-à-vis de la « sépiolite amorphe » que les eaux porales. Ceci est dû à des concentrations en acide orthosilicique et pH plus élevés. On montre également que les eaux porales de la carotte sédimentaire et l'eau du lac restent dans le champ de stabilité de l'aragonite plutôt que celui de l'hydromagnésite (**Fig. 23B**).

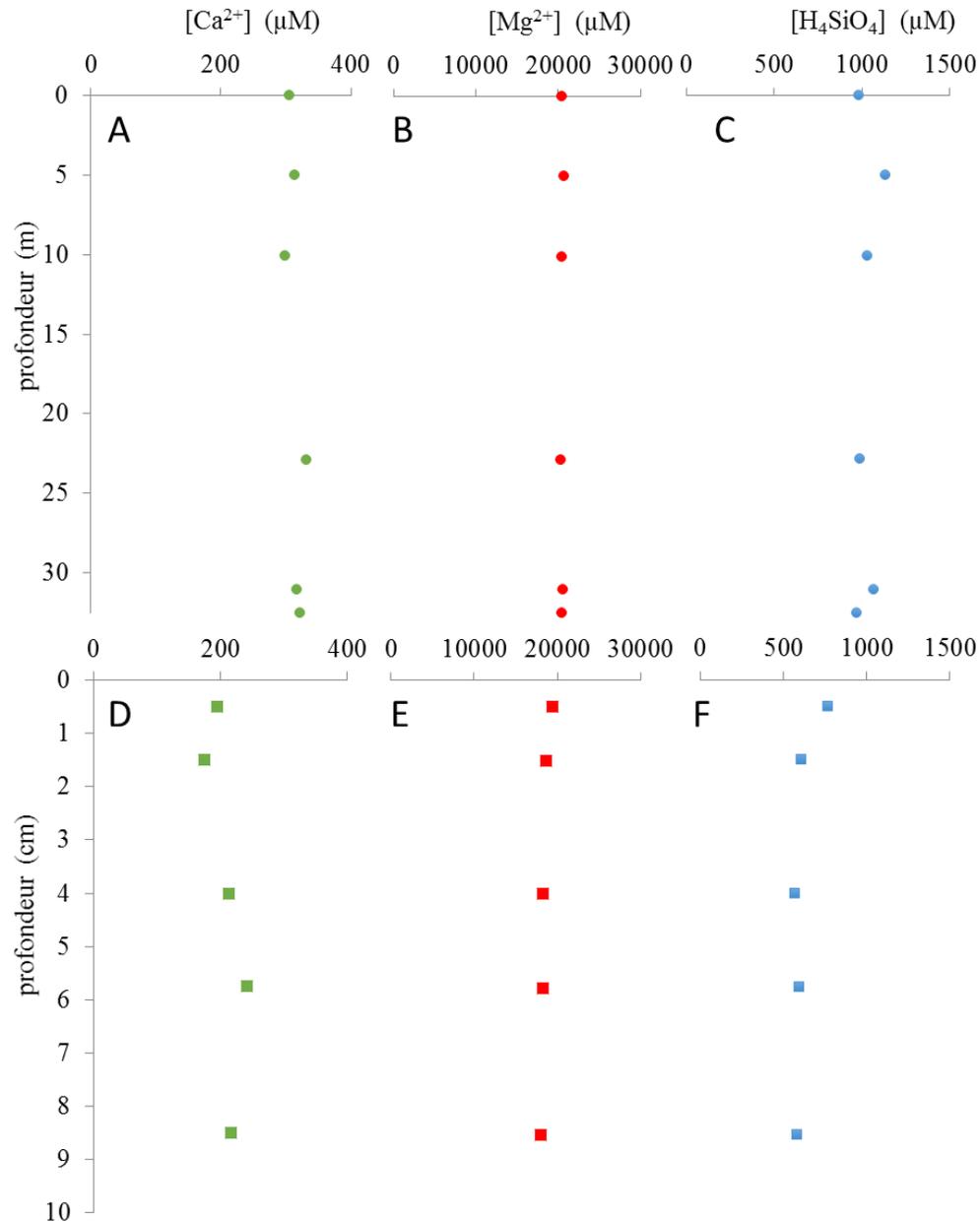


Figure 22. Graphique de la concentration de Ca^{2+} (A et D), Mg^{2+} (B et E) et H_4SiO_4 (C et F) de la colonne d'eau (●) (A-C) et des eaux porales prélevées au centre (■) (D-F) du lac d'Atexcac en fonction de la profondeur.

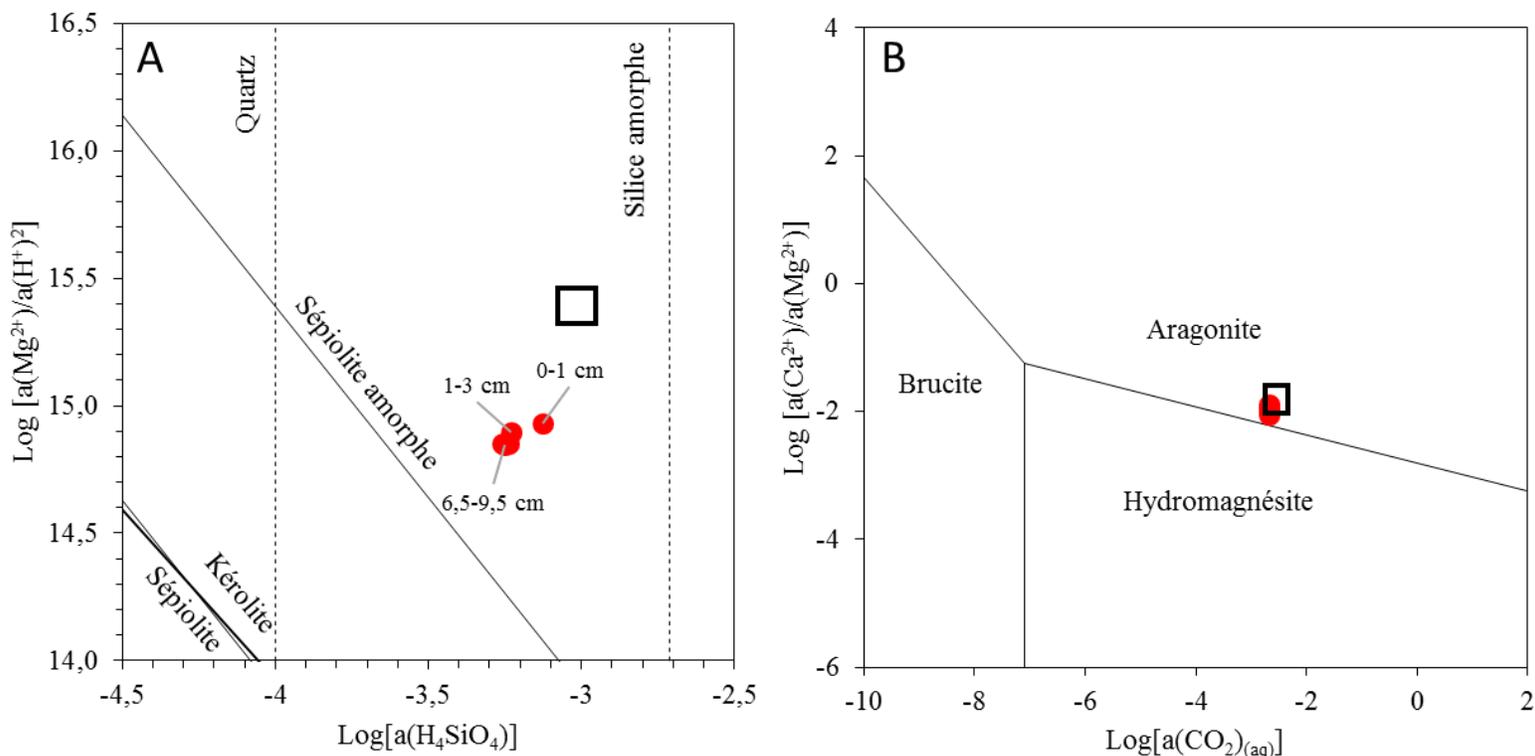


Figure 23. Diagramme de solubilité montrant les solubilités apparentes de différentes phases de silicates de magnésium (A) et domaine de stabilité des carbonates (B) pour les eaux porales des sédiments au centre du lac d'Atexcac. Pour le système Ca-Mg-C-O-H, les lignes indiquent les équilibres métastables entre brucite, aragonite et hydromagnésite. La composition chimique de la colonne d'eau du lac d'Atexcac est représenté par des boîtes noires. Les étiquettes de certains points indiquent la profondeur. Pour le système Mg-Si-O-H, les traits pleins représentent les lignes de solubilité de la kérolite et sépiolite (Stoessel, 1988), sépiolite amorphe (Wollast et al., 1968).

3.3.2. Caractérisation minéralogique par DRX et spectroscopie infrarouge

L'analyse en DRX des échantillons de la carotte d'Atexcac, montre qu'ils sont composés principalement d'aragonite (**Fig. 24**). On observe peu de variations dans les diffractogrammes en fonction de la profondeur. De plus, on note deux pics très faibles et larges associés à des phases peu cristallisées et hydratées qui sont la silice amorphe et un silicate de magnésium trioctaédrique de type smectite ou kérolite, respectivement à 5,8 Å et à 4,5 Å (**Fig. 24**). Il s'avère difficile de déterminer d'autres pics larges correspondant aux silicates de magnésium. Enfin, nous pouvons associer un pic à la présence de quartz.

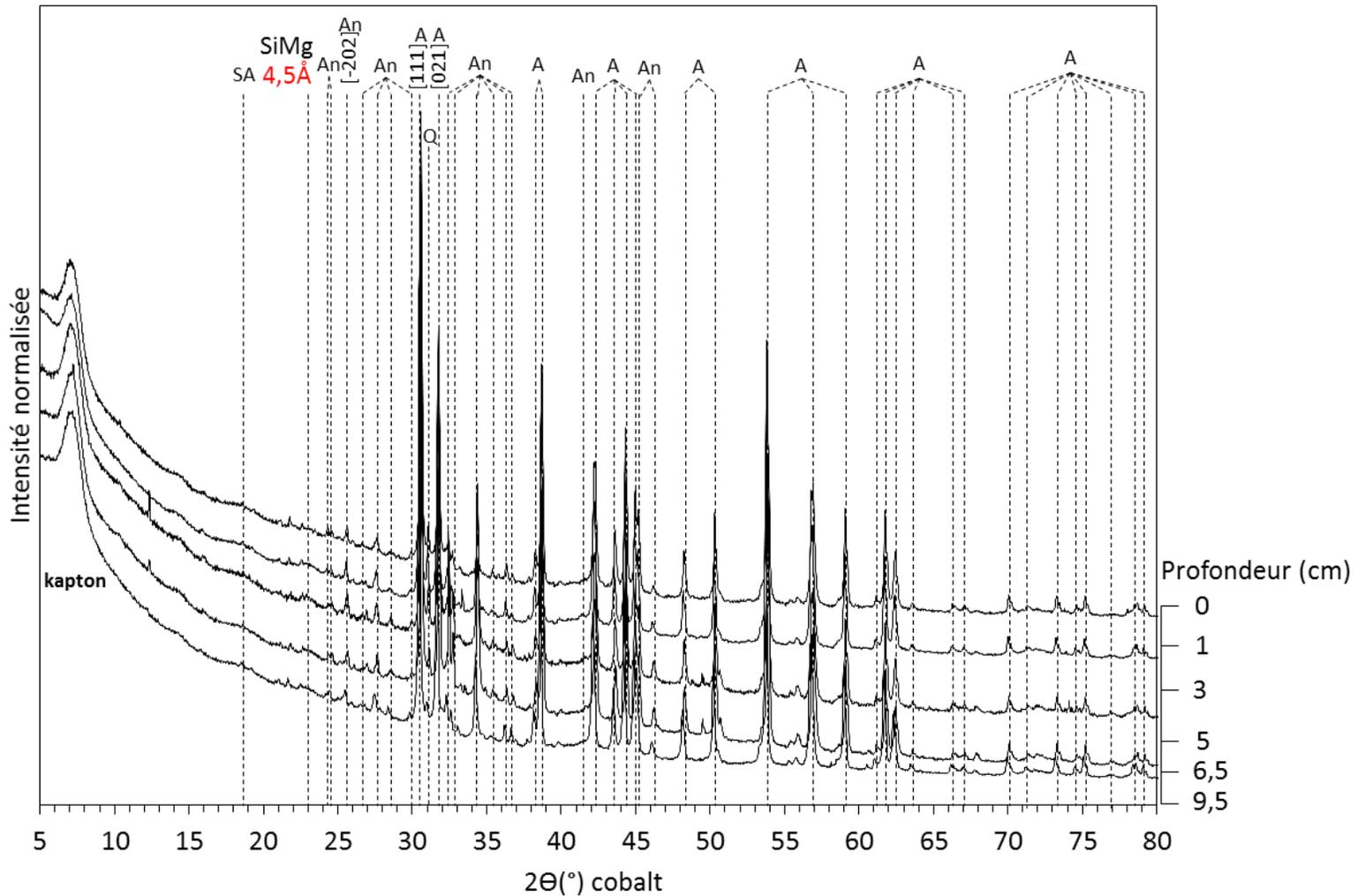


Figure 24. Superposition des diffractogrammes des différentes profondeurs de la carotte prélevée au centre du lac d'Atexcac principalement composées d'aragonite. A: aragonite; An: anorthite; Q: Quartz; SiMg: kérolyte, smectite.

L'analyse en infrarouge nous apporte des informations supplémentaires. En effet, concernant la phase de silicate de magnésium, les bandes de vibrations à 466 et 538 cm^{-1} sont caractéristiques des silicates trioctaédriques et sont interprétées comme indicatrices de la kérolyte et/ou des smectites (saponite et/ou stévensite). La présence de ces phases silicates est confirmée par celle des étirements Si-O à 1027 cm^{-1} et $\text{Mg}_3\text{-OH}$ à 3679 cm^{-1} (**Fig. 25**). On observe également une bande de faible intensité à 910 cm^{-1} que l'on attribue à la kérolyte. De plus l'étirement OH de SiOH et de l'eau est présent vers 3400 cm^{-1} et la vibration de flexion de l'eau vers 1660 cm^{-1} (**Fig. 25**). On note également des absorptions à 800 cm^{-1} caractéristiques de la présence de silice amorphe. Les vibrations $\nu_1\text{CO}_3$ (1083 cm^{-1}) et $\nu_3\text{CO}_3$ (1473 cm^{-1}) de l'aragonite sont observées.

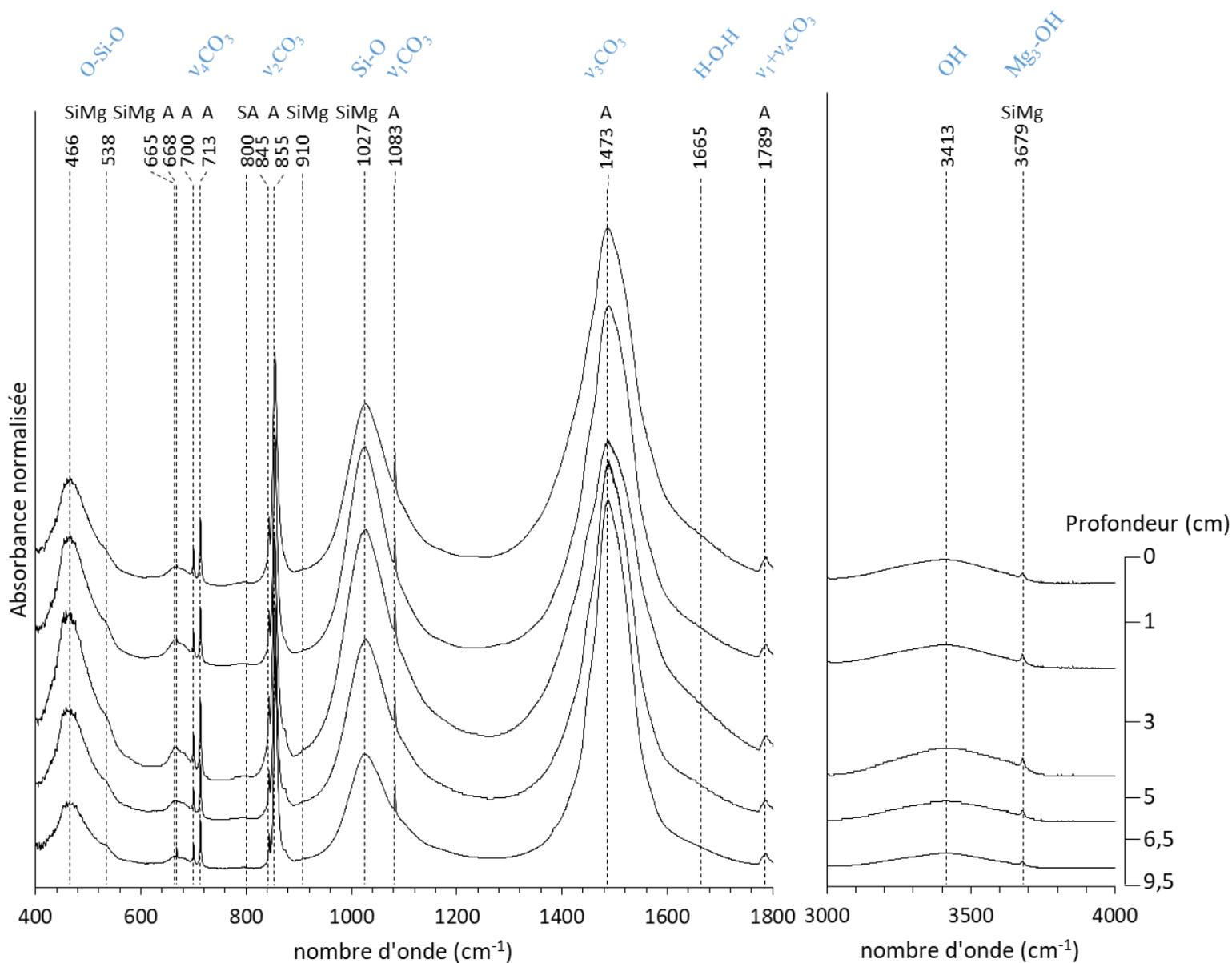


Figure 25. Superposition des spectres des différentes profondeurs de la carotte prélevée au centre du lac d'Atexcac obtenues en FTIR. A : aragonite, SiMg : kérolite, smectite ; SA : silice amorphe.

3.3.3. Etude des phases minérales par microscopie électronique

Les observations en microscopie électronique à balayage nous ont permis de confirmer que la phase principale du sédiment d'Atexcac était l'aragonite (**Fig. 26A et D**). Nous avons également retrouvé des grains avec du Si et Al, probablement un plagioclase (**Fig. 26A, B et E**). Enfin, l'analyse montre la présence d'une grande quantité de silicate de magnésium avec du Ca, Na et Fe. Cependant aucune analyse quantitative n'a été réalisée sur les échantillons d'Atexcac. Il est

possible au vu des données minéralogiques et des éléments chimiques composant ces phases minérales qu'il s'agisse une smectite trioctaédrique de type saponite (**Fig. 26A, B, C et F**). Ces silicates ont une morphologie arrondie et sont aggloméré entre eux pour former des structures sans une organisation particulière.

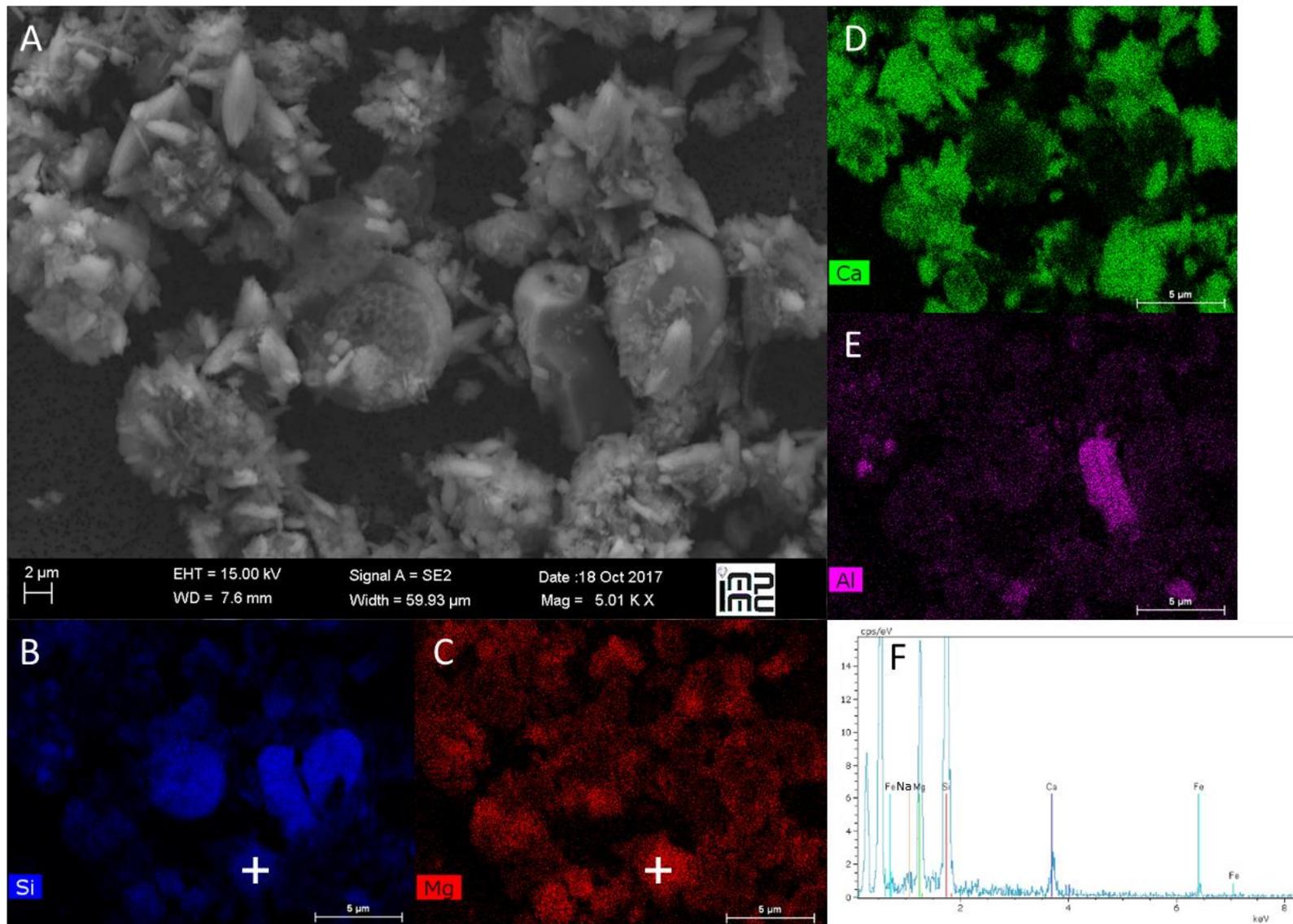


Figure 26. Observation en microscopie électronique à balayage du sédiment prélevé au centre du lac d'Atexcac. Ici, sont présentées l'image obtenues en mode SE2 (A) et les cartographies du Si (B), du Mg (C), du Ca (D) et de l'Al (E) et le spectre EDXS du grain indiqué par la croix blanche (F).

3.3.4. Quantification de la proportion relative des phases minérales dans les sédiments d'Atexcac

Les résultats de la composition relative des phases minérales composant les sédiments d'Atexcac ont été déterminés grâce aux calculs présentés dans le **tableau 8**. En effet nous avons fait l'hypothèse que le plagioclase présent dans les sédiments d'Atexcac est un feldspath de type anorthite. De la même manière, nous n'avons pas effectué d'analyses quantitatives sur les silicates de magnésium présent dans ces sédiments, mais nous avons fait l'hypothèse que cette phase est une smectite de type saponite. Lorsque l'on analyse les données de composition chimique globale obtenues en ICP-OES du sédiment prélevé au centre du lac d'Atexcac et que l'on tente d'estimer l'abondance normative des phases le constituant, on peut voir que la phase minérale majeure est l'aragonite (**Fig. 27**). De plus, on peut voir que le % en poids d'aragonite diminue de 0 à 3 cm de profondeur de 62,2 à 55,4 % en poids. Puis de 3 cm à 6,5 cm de profondeur celle-ci stagne aux alentours de 54 % en poids puis elle augmente dans les derniers centimètres (6,5 cm à 9,5 de profondeur) pour atteindre une teneur de 62,4 % en poids (**Fig. 27**). Les deux phases majoritaires dans cette carotte sédimentaire sont la silice amorphe et la saponite. La teneur en saponite varie en fonction de la profondeur. En effet, sur les 3 premiers centimètres sa teneur augmente de 16,4 % à 21,7 % en poids, puis elle diminue tout le long de la carotte pour retrouver sa teneur initiale de 16,7 % en poids (**Fig. 27**). La silice amorphe quant à elle augmente de 0 à 6,5 cm de profondeur avec des valeurs qui passent de 17,6 à 21 % en poids (**Fig. 27**). L'anorthite est quant à elle peu présente dans ce sédiment avec une abondance d'environ 3 % en poids à la surface qui augmente jusqu'à 6,5 cm de profondeur pour atteindre 5,2 % en poids, puis diminue à 3,6 % en poids sur les 3 derniers centimètres (**Fig. 27**). Enfin, la matière organique représente peu de poids dans la carotte sédimentaire avec des valeurs comprises entre 0,7 et 0,8 % en masse.

Tableau 8. Méthode pour la quantification des phases minérales. [X] sont les concentrations en % molaire de Mg, Al, Ca et Si obtenue par ICP-OES

| Minéral | Formule chimique | Calcul |
|----------------|--|--|
| Anorthite | $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$ | $\text{An} = [\text{Al}]/2$ |
| Aragonite | CaCO_3 | $\text{Ara} = [\text{Ca}] - \text{An}$ |
| Silice amorphe | $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ | $\text{Si} = [\text{Si}] - (\text{Sap} \cdot 4)$ |
| Saponite | $(\text{Ca}, \text{Na})_{0,3}(\text{Mg}, \text{Fe})_3(\text{Si}, \text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | $\text{Sap} = [\text{Mg}]/3$ |

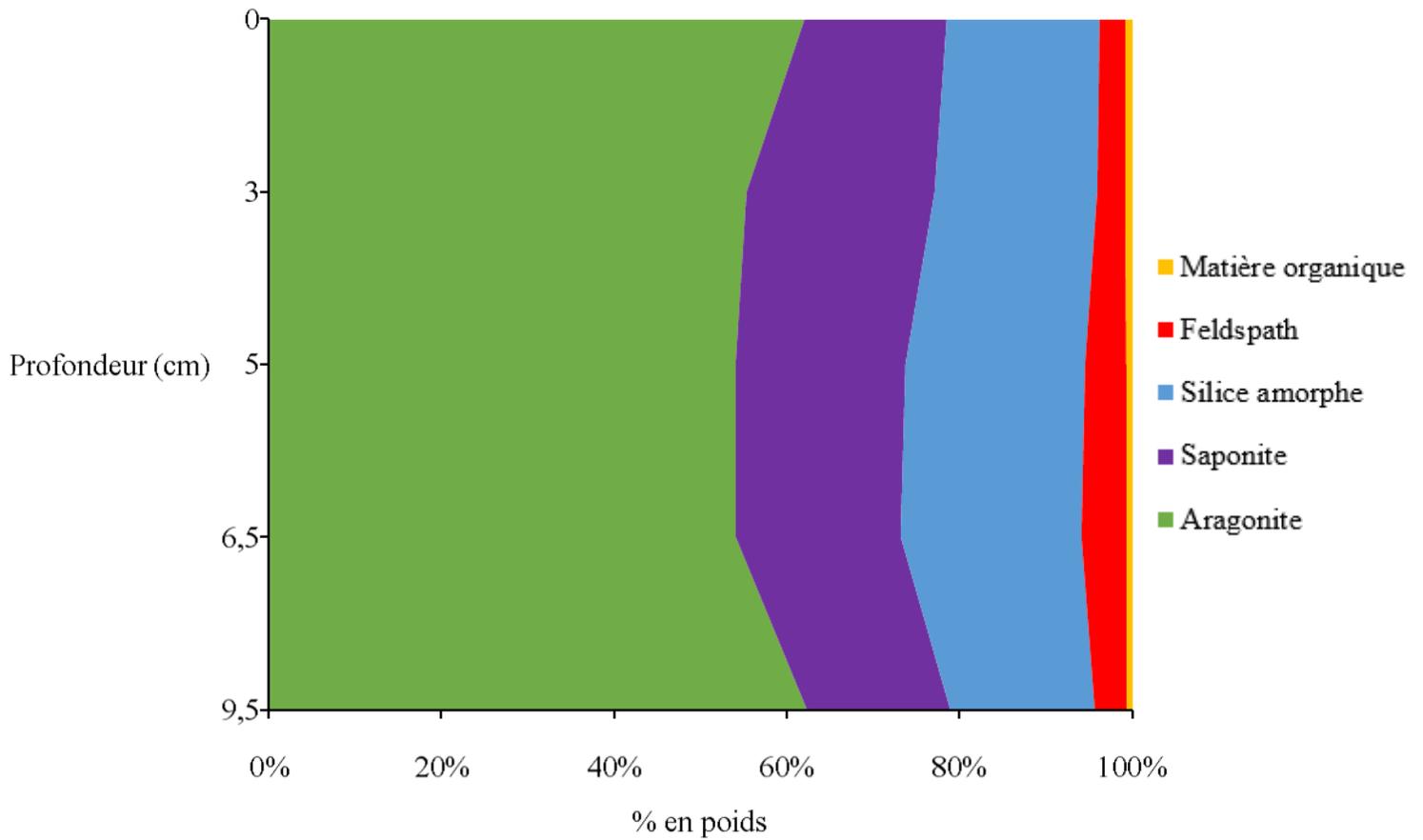


Figure 27. Teneur en matières minérales (% en poids) en fonction de la profondeur dans la carotte sédimentaire prélevée au centre du lac d'Atexcac.

4. Discussion

4.1. Nature et distribution des phases silicatées magnésiennes dans les sédiments des lacs alcalins : implications environnementales

Ici, on distingue 3 types de phases minérales selon leur mode de formation. Des minéraux détritiques constituant les basaltes et/ou roches sédimentaires environnantes des cratères de volcan. Les phases primaires qui sont les minéraux formés de manière authigène dans la colonne d'eau. Enfin, les phases secondaires qui sont les minéraux authigènes formés secondairement par diagenèse dans le sédiment. On voit des variations avec la profondeur des compositions minéralogique et chimique dans les sédiments. *A priori*, il peut y avoir 2 explications possibles (non incompatibles d'ailleurs) : 1) Dans le sédiment on voit ce qu'il y avait dans la colonne d'eau et donc ce qu'il y avait dans la colonne d'eau a varié au cours des temps soit de manière saisonnière, soit au cours des années. 2) *A contrario*, ce qui était dans la colonne d'eau n'a pas varié mais on voit plutôt la superposition des transformations qui a eu lieu dans le sédiment avec le temps et la profondeur.

Deux sédiments ont été étudiés pour le lac d'Alchichica. Près du rivage Nord d'Alchichica, le faciès de boue noir qui tire sur le grisâtre en profondeur est dominé par de l'hydromagnésite et des grains de taille millimétrique constitués de morceaux de microbialite (aragonite) et est pauvre en feldspaths, mettant en évidence la faible contribution détritique volcanique. Ici, les sédiments sur le rivage nord ne nous permettent pas d'identifier des conditions environnementales ayant changé dans le temps. *A contrario*, Dans la zone centrale du lac, le faciès de boue très noire est dominant avec une composante détritique qui augmente lorsque l'on s'éloigne de la rive. Le sédiment supérieur (0 à 3,1 cm de profondeur) se compose principalement de carbonate de Ca et Mg (aragonite et hydromagnésite), de silice amorphe (frustules de diatomée) et de silicate primaires et feldspaths, tandis qu'en profondeur (5,1 à 19 cm de profondeur), la texture du sédiment devient compacte et plus clair et l'hydromagnésite et la silice amorphe sont remplacés par une smectite de type stévensite pauvre en Al. Nous proposons qu'il existe une diagenèse précoce aboutissant à la formation de cette phase de type stévensite pauvre en Al par une dissolution de l'hydromagnésite et des frustules de diatomées. Nous avons également décrit une phase de type stévensite riche en Al qui sont associées aux feldspaths dans le sédiment au centre du lac. On suppose que cette phase est une argile détritique résultant d'une altération des grains de roches volcaniques dans le

sédiment. Finalement, la présence de fortes teneurs en Al dans la structure du silicate de magnésium pourrait directement être reliée à l'altération des feldspaths environnants. Cette altération des feldspaths en silicate de magnésium a également été rapportée récemment par Milesi et al. (2018) dans le lac alcalin Dziani Dzaha.

Concernant, le lac de La Preciosa, le sédiment était plutôt grisâtre selon les photos de la carotte sédimentaire faites après prélèvement. Les sédiments sont composés majoritairement d'aragonite, de feldspaths et de silice amorphe issue des frustules de diatomée. On détecte le signal en FTIR et DRX d'un silicate de magnésium qui serait également une smectite mais cette fois-ci de type saponite ferrugineuse. Fait intéressant, des colliers composés majoritairement de Si et Mg et Fe dans une moindre mesure de Mn et Al ont été retrouvés. Ces colliers seraient cette smectite de type saponite ferrugineuse détectée par la FTIR et la DRX. On sait que ces colliers sont formés par une cyanobactérie qui a été observée lors de la thèse de Nina Zeyen. Par conséquent, cette phase retrouvées dans les sédiments est formée dans la colonne d'eau et n'est pas formée diagenétiquement dans le sédiment comme cela est le cas pour les sédiments au centre du lac d'Alchichica. Ainsi, il serait possible de détecter la biominéralisation des silicates de magnésium en étudiant les sédiments. Finalement ici le contributeur majeur à la présence de silicates dans les sédiments du lac de La Preciosa pourrait être cette cyanobactérie produisant des anneaux de smectite de type saponite ferrugineuse.

De plus le sédiment prélevé au centre du lac d'Atexcac présente les mêmes caractéristiques que le sédiment de La Preciosa, une couleur plutôt claire composée majoritairement d'aragonite, de feldspaths et de silice amorphe avec des fortes teneurs en smectite de type saponite. Ici les silicates de magnésium de type saponite ne ressemble pas à des colliers. Ainsi il est peu probable que des micro-organismes aient participé à leur formation. Cependant, il peut y avoir deux possibilités de formation de cette phase soit 1) elle est héritée de la colonne d'eau car des silicates de magnésium de type kérolite ont été rapportés par Zeyen et al. (2015) dans les microbialites de ce lac, soit 2) il pourrait aussi s'agir d'une argile détritique héritée de l'altération de feldspaths environnantes comme pour les sédiments du lac d'Alchichica.

Enfin, une corrélation positive (en log-log) a été rapportée par Zeyen et al. (2017) entre l'alcalinité et la concentration en sodium dans les différents lacs alcalins mexicains. Ils ont proposé que les lacs d'Alchichica et d'Atexcac pourraient avoir subi une évaporation beaucoup plus forte et/ou une altération des roches volcaniques plus importante que le lac de La Preciosa, d'où leur

alcalinité et salinité plus forte. Le caractère plus salin dû à la forte évaporation et/ou altération des roches volcaniques des lacs d'Alchichica et d'Atexcac pourrait également être relié à la présence de silicates de magnésium riche en Al formés diagénetiquement dans les sédiments. Nous avons également montré qu'il y a près de 49 % en poids de silicate de magnésium dans les sédiments d'Alchichica à 19 cm de profondeur ce qui beaucoup plus que les sédiments du lac d'Atexcac et encore plus que pour les sédiments de La Preciosa. Nous avons extrapolé les pH des eaux porales du sédiment du lac de La Preciosa par rapport à ceux d'Atexcac mais ceux-ci sont peut-être bien en-dessous expliquant la plus faible teneur en silicate de Mg. Il est également possible que la forte teneur en silice biogénique en surface couplée à la présence d'hydromagnésite soit à l'origine de la forte présence de silicate de Mg. Ainsi, les règles générales exposées ici devront être vérifiées pour les nombreuses autres occurrences de silicates de magnésium connus dans les sédiments et offriront un cadre solide pour une meilleure interprétation des conditions paléo-environnementales dans lesquelles se sont formés les anciens silicates de magnésium dans les sédiments lacustres.

4.2. Formation diagénetique dans le dépôt sédimentaire de silicates de magnésium de faible cristallinité par transformation de diatomées

D'autres auteurs avaient aussi rapporté la présence de smectite trioctaédrique dans des sédiments de la formation éocène lacustre de Green River (Bradley et Fahey, 1962 ; Bradley et Eugster, 1969 ; Dyni et al., 1973) et des talcs dans les sédiments du Néoprotérozoïque de la formation marine d'Akademikerbreen au Canada (Tosca et al., 2011). De plus, il a été rapporté des diagénèses précoces de smectite de type saponite dans les sédiments du lac alcalin Dziani Dzaha issue de l'altération des silicates primaires (Milesi et al., 2018). En outre il a également été décrit des smectites de type saponite et/ou stévensite remplaçant les frustules de diatomée dans les sédiments de type évaporitique des lacs d'Altiplano bolivien (Badaut et Risacher, 1983). Comme nous l'avons observé dans les sédiments du lac d'Alchichica, il y a également une diagénèse précoce de smectite de type stévensite pauvre en Al remplaçant les frustules de diatomées. Les eaux de surface sont sous-saturées par rapport aux silicates de magnésium, sauf la partie ouest du lac (Zeyen et al., 2017).

On pourrait trouver surprenant le fait de trouver des silicates de magnésium dans les sédiments du centre de ce lac alors qu'ils sont absents au niveau de la rive Nord de du lac d'Alchichica. Une des hypothèses est que c'est la forte proportion de silice amorphe en surface de

sédiments qui est à l'origine de la diagenèse de silicate de Mg. En effet, plus la profondeur d'eau est importante plus il y a potentiellement de « cadavres » de diatomées qui s'accumulent. La colonne d'eau étant sous-saturée par rapport à la silice amorphe, les frustules se dissolvent lorsque les diatomées meurent. Par conséquent, on observe une augmentation progressive de la $[H_4SiO_4]$ plus on se rapproche du fond du lac et qui est moins importante dans la partie en subsurface du lac (Zeyen et al., 2017). Badaut et Risacher (1983), ont montré que l'étape suivant la dissolution des frustules de diatomées est la précipitation de silicate de magnésium à la surface de celles-ci. Dans une troisième étape qu'ils ont appelé l'étape de « persistance » cette phase silicatée magnésienne remplace totalement la frustule de diatomée et se maintient dans le temps. Leur conclusion est que la silice biogénique issue de la dissolution de la diatomée participe directement à la formation des noyaux de smectite riche en magnésium. Autrement dit, l'apport local de H_4SiO_4 permet la formation de silicates-Mg à la surface des frustules lorsque les conditions physico-chimiques (pH, forte activité en Mg^{2+}) sont réunies. Nous venons préciser ce processus qui permet également de former une smectite pauvre en Al car finalement il y a peu d'Al dans les frustules de diatomées, par conséquent il y a moins d'Al dans le produit précipitant.

On constate, dans les sédiments au maximum de profondeur du lac d'Alchichica, une disparition de l'hydromagnésite et de la silice amorphe au profit de la smectite de type stévensite. On sait que les eaux porales de cette carotte sédimentaire sont plutôt dans le champ de stabilité de l'aragonite sur le premier centimètre puis après il semble qu'elles se rapprochent du champ de stabilité de l'aragonite-hydromagnésite. Ainsi, dans un premier temps il pourrait y avoir dissolution de l'hydromagnésite dans les premiers centimètres de la carotte qui apporte les ions Mg^{2+} permettant la formation de smectite de type stévensite pauvre en Al au niveau des frustules de diatomées. La vitesse de sédimentation a été déterminée au niveau de la rive Nord-Est du lac d'Alchichica par Caballero et al. (2003) et est de 0,033 cm/an entre 53 et 83 cm de profondeur. Ainsi, nous voyons que la dissolution totale de l'hydromagnésite est réalisée en moins de 154 ans (5,1 cm). Un autre paramètre important permettant d'expliquer la dissolution de l'hydromagnésite est le pH. En effet, on remarque une diminution du pH dans les premiers centimètres de la carotte. A contrario, lorsque l'on ne fait pas varier le pH dans les eaux porales de la rive Nord du lac on voit bien que dans un premier temps celles-ci sont sous-saturées par rapport à la « sépiolite amorphe ». Cette diminution du pH est vraisemblablement liée à la décomposition de la matière organique et déstabiliserait l'hydromagnésite comme le propose Milesi et al. (2018). Ici, cette

proposition restera une hypothèse. En effet, la matière organique n'a pas été mesurée dans les 5 premiers centimètres de la carotte sédimentaire au centre du lac d'Alchichica. Cependant, nous avons mesuré sa teneur dans la carotte sédimentaire sur la rive nord du lac d'Alchichica et on voit que celle-ci est deux fois moins importante que celle de la carotte sédimentaire au centre du lac à 19 cm de profondeur. De plus, les valeurs de la concentration en matière organique des sédiments dans le **tableau 3** montrent que celle-ci diminue d'environ 2,7 % en poids à 1,9 % en poids de 5,1 cm à 19 cm. Il est possible que cette teneur soit encore plus importante dans les premiers centimètres de la carotte sédimentaire du centre du lac. En effet, Caballero et al. (2003) ont estimé que cette valeur était plutôt à 8 % en poids. Enfin nous n'avons pas mesuré les valeurs de pH rencontrés dans la carotte sédimentaire de la rive nord du lac, elles ont été extrapolées de celles de la carotte sédimentaire du centre. Il est probable que les valeurs de pH sur la rive nord soient plus élevées et ne diminuent que très peu, ne déstabilisant pas l'hydromagnésite. Finalement, on remarque la présence préférentielle dans les sédiments de la rive nord du lac d'Alchichica d'hydromagnésite car celle-ci n'est pas déstabilisée par la dégradation de la matière organique. Par conséquent la concentration en Mg^{2+} n'est pas contrôlée dans son cas par la précipitation de smectite de type stévensite.

Ainsi nous sommes capables de proposer un schéma représentatif de la transformation de la silice biogénique des frustule de diatomées et de l'hydromagnésite en smectite de type stévensite pauvre en Al en fonction du temps (**Fig. 28**). En effet, dans la première étape la silice biogénique composant la frustule de diatomée et l'hydromagnésite se dissolvent. La dissolution de ces deux phases est causée par la diminution du pH probablement dû à la dégradation de la matière organique. Cette smectite commence à précipiter directement au niveau de la surface de la frustule dont le microenvironnement est fortement concentré en H_4SiO_4 . La frustule commence donc à se transformer. Enfin, la dissolution de silice biogénique et d'hydromagnésite continue avec le temps, puis au bout de 150 ans, le réservoir d'hydromagnésite est complètement épuisé. En parallèle, la silice biogénique a totalement été remplacée par la phase de type stévensite pauvre en Al. Cette structure de frustule de stévensite se maintient jusqu'à 44 cm de profondeur (1452 ans) car en effet après cette profondeur on ne retrouve plus de frustule de diatomée (Caballero et al. 2003).

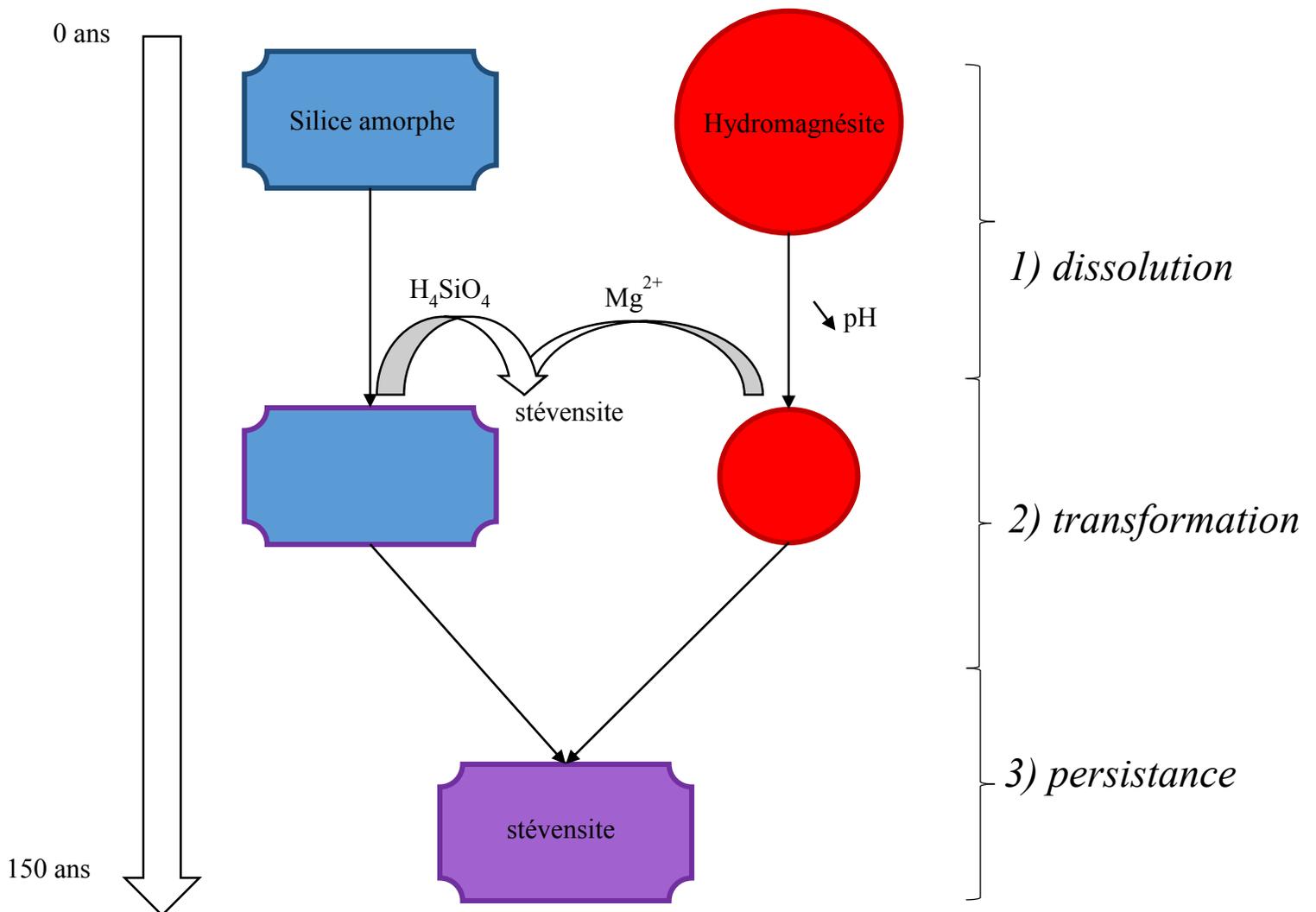


Figure 28. Schéma représentatif de la transformation des frustules de diatomée ayant lieu dans le sédiment au centre du lac d'Alchichica. La première étape est la dissolution de l'hydromagnésite et de la silice biogénique due à une diminution du pH. Cette diminution entraîne la transformation de la silice biogénique en smectite de type stévensite pauvre en Al au niveau de la surface de la frustule. Enfin au bout de 150 ans les frustules de diatomées sont totalement remplacées par la smectite et persistent sous cette forme pendant au moins 1452 ans.

4.3. Implications de la distribution et précipitation des silicates de magnésium dans les lacs alcalins mexicains

Des silicates de magnésium (stévensite, kérolite et talc) ont été identifiés dans des roches réservoirs de carbonates créacés lacustres de l'Atlantique Sud (Bertani et Carozzi, 1985a, 1985b ; Wright, 2012 ; Tosca et Wright, 2015). Il semble que leur formation se produise dans les lacs où prédominent les terrains volcaniques (Cerling, 1994 ; Wright, 2012). Cependant, la source de Si et

de Mg, à l'origine de la quantité de silicate de Mg trouvée dans ces roches, fait l'objet de discussions.

Nous avons vu dans les sédiments du centre du lac d'Alchichica la formation d'une smectite de type stévensite riche en Al. Au vu de la localisation de cette phase à la périphérie des feldspaths et sa composition riche en Al, nous supposons que c'est l'altération de ces feldspaths qui permet la formation de la smectite de type stévensite riche en Al. Très tôt, Pedro (1960a, 1960b, 1961, 1964) observe la néoformation discrète d'une smectite magnésienne, autour des fragments de basalte altérés à 25 °C en système ouvert. Cependant, de très nombreux travaux se sont consacrés à l'étude de la palagonitisation, c'est-à-dire la formation de palagonite qui est un mélange de minéraux produits par l'altération, en interaction avec l'eau, de matériaux volcaniques vitreux de nature basaltique. Ces travaux montrent qu'au cours des premiers stades de l'altération, apparaissent d'abord des smectites trioctaédriques (saponites, stévensites), puis elles sont remplacées, au fur et à mesure de la progression de l'altération, par des smectites dioctaédriques ferrifères ou aluminoferrifères (Desprairies et Bonnot, 1980 ; Noack et Duplay 1983). Plus récemment, Wright (2012) a suggéré que des apports détritiques printaniers, en plus de l'altération des terrains volcaniques, auraient peut-être été nécessaires pour permettre la formation de carbonates et de silicates de magnésium. Dans l'ensemble, Milesi et al. (2018) propose que la décomposition de la matière organique et l'apport de CO₂ volcanique sont à l'origine de la diminution du pH et donc de la déstabilisation de l'hydromagnésite qui apporte le Mg²⁺. Cependant,

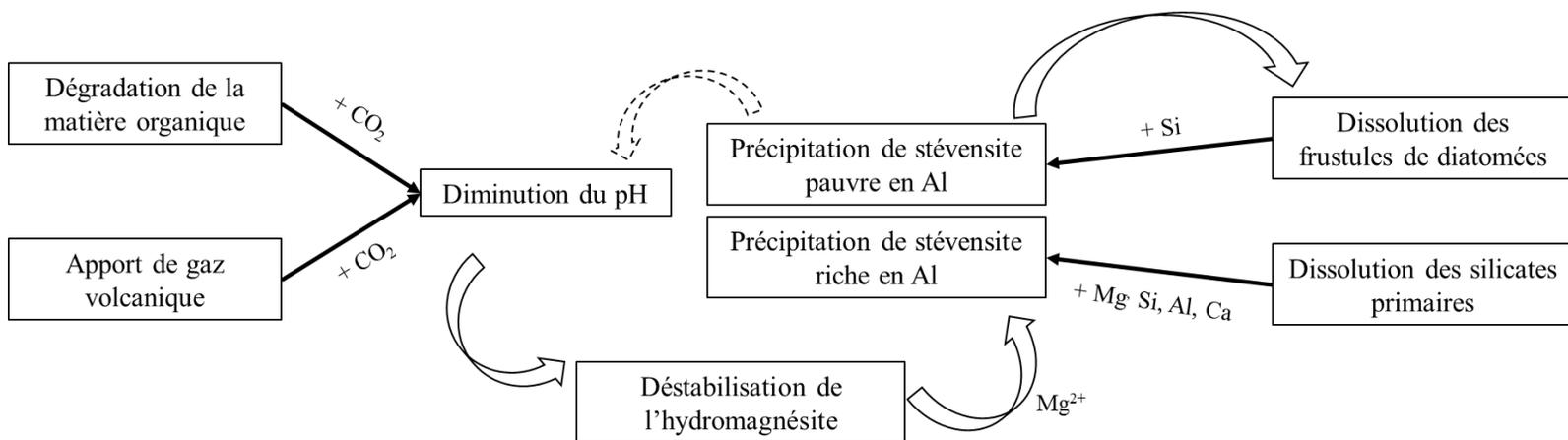


Figure 29. Modèle de formation diagénétique des smectites de type stévensite dans les sédiments du lac d'Alchichica. Les flèches en pointillés indiquent l'effet de rétroaction possible entre la déstabilisation de l'hydromagnésite et la précipitation des smectites de type stévensite (modifié de Milesi et al., 2018).

l'apport de CO₂ volcanique reste à être mesuré sur le terrain dans le cas du lac d'Alchichica, mais il peut être une composante expliquant la déstabilisation de l'hydromagnésite (**Fig. 29**). Dans le cas du lac d'Atexcac, nous n'avons pas retrouvé d'hydromagnésite dans les sédiments cependant il y en a dans les microbialites en surface (Zeyen et al., 2015). Par conséquent, elle se forme au moins en surface du lac. Peut-être disparaît-elle très vite soit dans la colonne d'eau soit dans le 1^{er} cm du sédiment. Auquel cas la formation de silicate de Mg dans les sédiments de ce lac serait similaire à ceux d'Alchichica. Quant à l'apport de Si, il viendrait de la dissolution des silicates primaires et de la dissolution des frustules ce qui semble être différent des silicates de Mg formés dans le lac alcalin Dziani Dzaha dont la source de Si proviendrait essentiellement des silicates primaires (Milesi et al., 2018) (**Fig. 29**).

Enfin, une corrélation positive a été observée entre le logarithme d'alcalinité et le logarithme de la concentration en sodium retrouvé dans différents lacs alcalins mexicains (Zeyen et al., 2017). On peut apprendre que les différents lacs forment une série évolutive avec une évaporation croissante et/ou un degré croissant d'altération des silicates composant les cratères. De plus, les microbialites de ces lacs apparaissent une fois que l'alcalinité est suffisante, ce qui se produit à un certain stade de cette série d'évaporation/altération. Ainsi, les lacs d'Alchichica et d'Atexcac semblent être des systèmes ayant subi une évaporation/altération des silicates plus importante que le lac de La Preciosa. De plus, Tosca et Materson (2014) ont montré la formation de stévensite à des salinités très élevées (salinité de l'eau de mer (35 g/L)), mais il n'est pas impossible qu'elle se forme à des salinités plus faibles. D'après l'analyse des frustules de diatomées, Caballero et al. (2003) ont pu déterminer que le lac d'Alchichica subissait une forte évaporation ce qui est en accord avec Zeyen et al. (2017) et qu'on pouvait en déduire qu'il s'agissait d'un climat subaride. Ainsi, la stévensite pourrait être un indicateur paléo-environnemental directement liée à des climats subarides.

5. Conclusion et Perspectives

En conclusion, nous avons montré que les lacs avaient des compositions chimiques des eaux poreuses et de la colonne d'eau différentes nous permettant d'étudier la formation de silicate de magnésium dans des conditions physico-chimiques différentes. Nous avons déterminé qu'on avait la formation de deux smectites de type stévensite, une avec peu d'Al qui compose les frustules de diatomées à partir de 5,1 cm de profondeur et une riche en Al qui est localisée au niveau de la

périphérie des silicates primaires. Afin de mieux comprendre la diagénèse de smectite de type stévensite pauvre en Al, nous avons essayé de reproduire les conditions physico-chimiques des eaux porales d'Alchichica en ajoutant de la diatomite à température ambiante pendant 1 ans. Nous n'avons pas observé de modification des frustules de diatomées à part quelques précipités très discret sur à leur surface. Il serait intéressant de reproduire la dégradation de la matière organique en diminuant le pH et en remplaçant la source de Mg par de l'hydromagnésite. Cela permettrait de valider l'hypothèse selon laquelle la dissolution d'hydromagnésite et de silice biogénique permettent la formation de cette smectite pauvre en Al. De plus, en variant les conditions physico-chimiques (salinité, pH, alcalinité, $[Mg^{2+}]$ et $[H_4SiO_4]$), il serait possible d'aller plus loin dans les interprétations en reliant la combinaison de paramètres chimiques à la formation de ces phases. Ces travaux auront pour but de mieux interpréter l'origine (paléo)-environnementales des smectites que l'on peut trouver dans l'ancien et dans l'actuel.

Nous avons également mis en évidence la formation de smectite de type saponite dans les sédiments du lac d'Atexcac. Les analyses de la stœchiométrie manquent pour cette phase. Il serait possible de mettre en place les protocoles utilisés pour l'étude des smectites dans le lac d'Alchichica afin d'avoir une meilleure idée de la nature de cette phase. Dans un second temps, des analyses minéralogiques en DRX et FTIR et en microscopie du particulaire de la colonne d'eau pourrait permettre de déterminer si cette smectite est plutôt produit dans la colonne ou plutôt par une diagénèse dans les sédiments.

Enfin, il nous manque des mesures de terrain sur certaines carottes sédimentaires. Il serait intéressant de carotter de nouveau les lacs qui ont été étudiés ici. Ainsi en plus des analyses chimiques des éléments majeurs composant les eaux porales et le solide et le pH, l'alcalinité pourrait être mesurée. Il serait intéressant d'acquérir des profils de CO_2 des sédiments afin de mieux comprendre son implication dans la formation des silicates de Mg et de déterminer si le CO_2 volcanique à un effet sur la formation des smectites dans les sédiments des lacs étudiés. De plus, le nombre de carottes pourrait être augmenté en prenant des carottes notamment à l'Ouest du lac d'Alchichica qui semble être sursaturé par rapport au silicate de magnésium et déterminer s'il y a les mêmes phases qu'au centre ou au Nord. De plus, des carottes sédimentaires sur les rives d'Atexcac et La Preciosa pourrait être prélevées. Dans le cas d'Atexcac, cela permettrait d'identifier s'il y a la formation de smectite de type saponite au niveau des rives et donc que la formation se produit bien dans la colonne d'eau. Dans le cas de La Preciosa cela permettrait de

déterminer si les cyanobactéries formant les anneaux de smectite de type saponite ferrugineuse sont présents mais également t s'ils ont la même composition que ceux retrouvés dans le centre. Ainsi, il serait possible de déterminer si ces anneaux enregistrent la composition chimique de l'eau de ce lac.

Chapitre III. Etude au laboratoire de la formation microbienne de silicates magnésiens hydratés, peu cristallisés

1. Intérêt de l'étude

1.1. Mise en évidence de la possibilité d'une voie de formation biotique de silicates de magnésium

Les argiles et les micro-organismes sont omniprésents à la surface de la Terre et, le plus souvent, étroitement associés (Tazaki, 2006). En effet, les micro-organismes présents dans le sol ont tendance à s'accumuler sur les surfaces des argiles ou à proximité, car ces dernières sont enrichies en ions, en eau et en matière organique (Theng et Orchard, 1995). Il est admis que le vivant est capable de former un certain nombre de minéraux (bio-minéraux) comme les carbonates (par exemple Dupraz et al., 2009 ; Couradeau et al., 2012), les oxydes Fe–Mn (par exemple, Miot et al., 2009), les phosphates hydratés (par exemple Cosmidis et al., 2015 ; Rivas-Lamelo et al., 2017) et les sulfures (par exemple Gleeson et al., 2011), ainsi que les silicates (minéraux argileux) (Tazaki, 2006). Par exemple, il est possible de relier les métabolismes microbiens à la formation de bio-minéraux comme par exemple la photosynthèse oxygénique à la formation de carbonate de calcium (par exemple, Visscher et Stolz, 2005 ; Dupraz, 2009). Tazaki (2006) explique par exemple que les minéraux biogéniques riches en fer nécessitant des conditions chimiques spécifiques ([Fe(II)], [Fe(III)], pH, le potentiel d'oxydo-réduction) pour leur formation et donc qu'il est possible de se servir de ces bio-minéraux comme d'indicateurs d'activités biologiques antérieures dans les contextes géologiques anciens et modernes d'où l'intérêt croissant porté à l'étude des silicates.

La formation des argiles a été et reste souvent considérée comme un processus purement abiotique. Pourtant, c'est sur la base de données obtenues en laboratoire ou dans l'environnement qu'au cours des dernières années, un nombre croissant d'études ont proposé l'implication de microorganismes dans la formation de phases silicatées magnésiennes, notamment dans des environnements alcalins et salins (Burne et al., 2014 ; Zeyen et al. 2015 ; Pace et al., 2016). L'observation de microbialites mexicains actuels en MEB suggère une croissance de cristaux d'aragonite qui pourrait être liée au remplacement progressif de silicates de magnésium faiblement cristallisés (Zeyen et al., 2015). Les phases mal cristallisées de Si-Mg, par exemple la stévensite (groupe minéral de smectite), la kérolite et la sépiolite, sont régulièrement qualifiées de composants authigènes des microbialites dans les lacs salins et alcalins modernes (Souza-Egipsy et al., 2005 ;

Burne et al., 2014 ; Zeyen et al., 2015). C'est pourquoi certains auteurs s'accordent sur le fait que les silicates magnésiens pourraient être une phase importante dans certains biofilms issus d'environnements alcalins et salins (Burne et al., 2014 ; Zeyen et al., 2015 ; Pace et al., 2016). Bien que le nombre d'études portant sur l'étude des microbialites riches en silicates de magnésium augmente, les acteurs de cette biominéralisation restent encore très flous.

Par ailleurs, il a été mis en évidence, par des observations en microscopie électronique à balayage d'échantillons de lac alcalins mexicains, des cyanobactéries qui forment des anneaux micrométriques composés de particules de silicates de Mg, Fe et Mn de quelques centaines de nanomètres au niveau de leur septum de division (non publié). Il s'agit d'un patron de biominéralisation inconnu à ce jour. De plus, un petit nombre d'étude ont mis en évidence expérimentalement que des microorganismes ou des biofilms pouvaient induire la formation de certaines argiles (Konhauser et al., 1998 ; Bontognali et al., 2014 ; Pace et al., 2016). Cependant, l'ampleur des processus, les mécanismes moléculaires et enfin l'impact sur les microorganismes impliqués restent inconnus.

Dans ce contexte de formation de basse température et marqué par la présence du vivant, il est difficile de caractériser ces phases du fait de leur faible cristallinité. De plus, il semblerait que ces silicates aient une structure minéralogique différente en fonction de leur environnement de formation (Tosca et Materson, 2014). Cependant à l'aide de multiples techniques de microscopie électronique, de diffraction des rayons X (DRX) ou encore de spectrométrie infrarouge (FTIR), ces phases minérales ont pu être caractérisées. Ces silicates de magnésium ont été interprétés comme étant des smectites : stévensite (Tettenhorst et Moore, 1978 ; Burne et al., 2014) ou nontronite (Pedro et al., 1978), de la sépiolite (Bristow et al., 2012), du talc (Tosca et al., 2011) ou de la kérolyte qui est un talc hydraté (Léveillé et al., 2000a, 2002 ; Zeyen et al. 2015).

1.2. L'impact des microorganismes sur la formation des silicates de magnésium

On sait que dans les biofilms actuels, les différents microorganismes et les métabolismes associés permettent la formation des microbialites actuels (Visscher et Stolz, 2005 ; Dupraz et al., 2009 ; Saghäi et al., 2015). Cependant, peu d'étude ont proposé des mécanismes impliquant des microorganismes dans la formation des silicates de magnésium. Il a été exposé précédemment (*Introduction*) qu'il est difficile de quantifier les facteurs chimiques clés contrôlant la précipitation

de silicates de magnésium. Cependant, à première vue, si l'on considère par exemple la réaction de précipitation de la kérolite :



Si l'on considère que c'est l'augmentation de la saturation de la solution qui joue un rôle majeur alors il faut tenir compte que les facteurs chimiques contrôlant la précipitation de cette phase dépendent i) de l'activité des ions Mg^{2+} , ii) de l'activité de H_4SiO_4 et iii) du pH de la solution. Cependant, ce sont plutôt les sites de nucléation qui comptent le plus, alors d'autres paramètres peuvent jouer un rôle dans la précipitation.

Il est possible d'observer le champ de stabilité thermodynamique de la phase minérale, en traçant un diagramme de solubilité (**Fig. 1**).

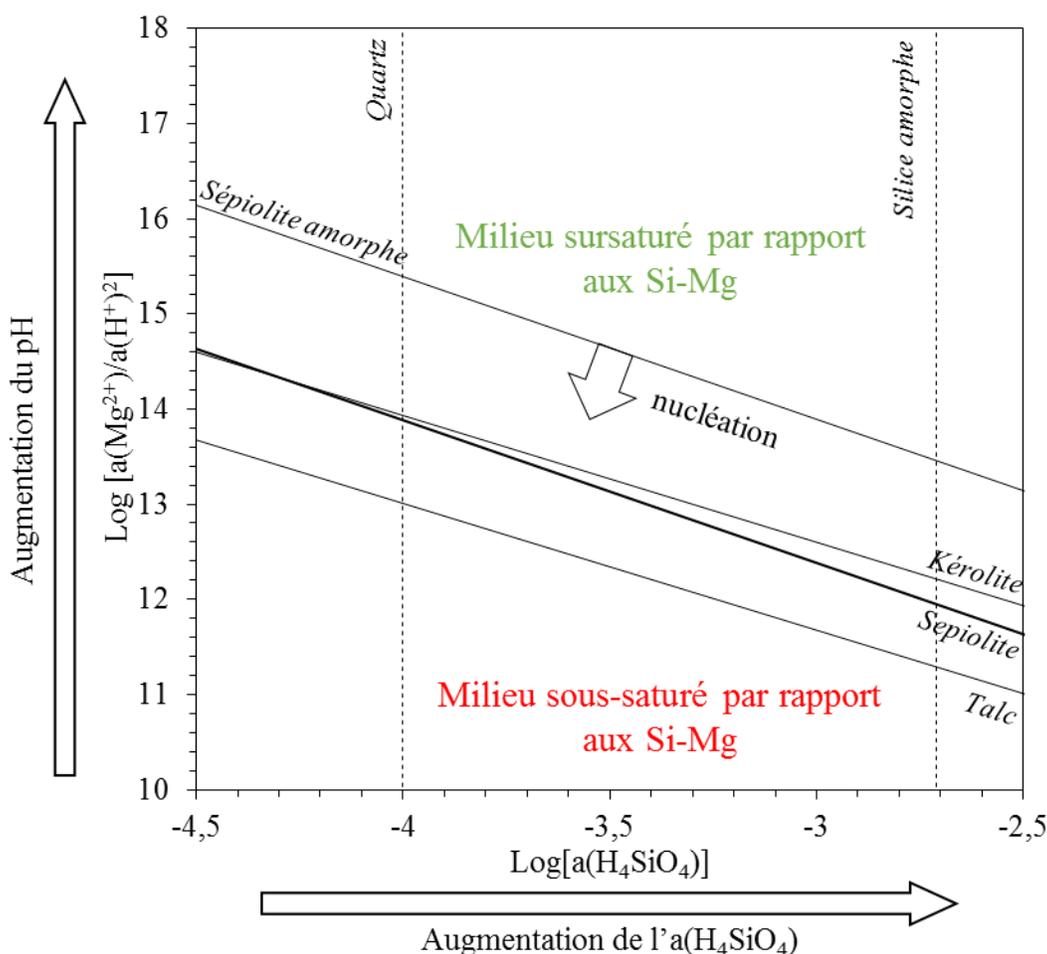


Figure 1. Diagramme de solubilité montrant les solubilités apparentes de différentes phases de silicates de magnésium. Ici, sont représentées les possibles voies d'influence sur la précipitation des silicates de magnésium que peuvent avoir les microorganismes. Les traits pleins représentent

les lignes de solubilité de la kérolite et sépiolite (Stoessel, 1988), et de la sépiolite amorphe (Wollast et al., 1968).

Par des analyses MEB et minéralogiques (DRX et FTIR), Pace et al. (2016) ont montré qu'un précurseur de la stévensite ou de la sépiolite précipite sur la matrice organique d'un biofilm. Des microorganismes pourraient induire la formation des phases silicatées magnésiennes en augmentant le pH comme le font un certain nombre de métabolismes (e.g., photosynthèse oxygénique) (Pace et al., 2016). Ainsi, l'état de saturation du milieu serait déplacé vers le haut dans le diagramme de solubilité (**Fig. 1**). Tosca et al. (2011) se sont intéressés aux paramètres chimiques de formation de silicates de magnésium de basses températures. Ils ont montré que ce type de phases se forme à des pH supérieurs ou égaux à 8,6. Pour les silicates de magnésium, la déprotonation de H_4SiO_4 à pH élevé semble être « l'interrupteur » qui permet la complexation du silicate-Mg, entraînant à son tour la nucléation et la précipitation du silicate-Mg. Lorsque l'on regarde dans l'environnement, ces phases ont été observées dans des lacs ayant des pH supérieurs (lacs de cratère mexicains) (Zeyen et al., 2015) et inférieurs (Burne et al., 2014 ; Pace et al., 2016) au pH de 8,6 (Tosca et al., 2011). Par conséquent, le pH ne semble pas être le seul paramètre chimique important pour la précipitation de ces minéraux. D'autre part, la $[\text{H}_4\text{SiO}_4]$ peut aussi être modulée indirectement par des microorganismes, comme les diatomées. Une fois mortes leurs frustules siliceux pourraient se dissoudre dans des solutions sous-saturées par rapport à la silice amorphe. Si le milieu est fermé ou en partie fermé, c'est-à-dire que le Si libéré ne l'est pas dans un volume infini, de la même manière que pour le pH, cela se traduirait par un déplacement de l'état de saturation de la solution vers la droite (**Fig. 1**). Enfin, si l'on considère les ions Mg^{2+} adsorbés sur la matrice organique du biofilm. Ces ions Mg^{2+} peuvent être relargués dans un microenvironnement au sein du biofilm lorsque la matrice organique extracellulaire est dégradée (par exemple, Pace et al., 2016, 2018). Ainsi dans notre diagramme de solubilité cela se traduirait par un déplacement de l'état de saturation de la solution vers le haut (**Fig. 1**).

Une dernière possibilité est que les microorganismes fournissent des surfaces qui abaissent l'énergie d'activation de la nucléation (effet template, Giuffrè et al., 2013) et donc diminuent la solubilité apparente de telles phases (**Fig. 1**). Ces surfaces de nucléation pourraient être la surface de cellules et/ou les substances polymériques extracellulaires (EPS) formées en abondance dans les biofilms (Léveillé et al., 2002 ; Souza-Egipsy et al., 2005 ; Bontognali et al., 2010). Cependant, une démonstration expérimentale reste à fournir. Plus récemment, Tosca et Masterson (2014) ont

plus particulièrement caractérisé les facteurs chimiques contrôlant l'identité des silicates de magnésium précipitant. Ces auteurs montrent qu'à des valeurs de salinité identiques à celle de l'eau de mer (i.e., salinité de 35 psu et NaCl de 460 mM) et un rapport Mg/Si de 5-7, la stévensite précipite à de forts pH (9,4) alors que la kérolite est dominante à des pH plus bas de 8,7 ; tandis qu'à des salinités basses (inférieures à 1 mM) la kérolite domine à de forts rapports Mg/Si (5-7) et à fort pH (9,4), alors que de la sépiolite se forme à des plus bas pH (8,7) et Mg/Si (~ 0,7). Ces expériences ont révélé l'importance de la salinité comme contrôle de la nature des silicates formés.

1.3. Objectifs

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude de la précipitation des silicates de magnésium avec 2 souches axéniques de cyanobactéries différentes afin de montrer que l'augmentation de pH par l'activité métabolique de microorganismes permet de faire passer un milieu d'un état sous-saturé à sursaturé par rapport aux silicates de magnésium et donc de faire précipiter ces mêmes phases minérales. De plus, il est également question de voir si une souche de cyanobactérie est capable, plus qu'une autre, de favoriser la précipitation en présentant des sites de nucléation (par exemple EPS, surface cellulaire) permettant d'abaisser l'énergie d'activation potentiellement nécessaire à la précipitation de silicate de magnésium. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'étude d'aquariums dans lesquels ont été mis des microbialites vivantes provenant des lacs alcalins de La Preciosa et d'Alchichica, mais également une expérience mimant les conditions physico-chimiques d'Atexcac dans laquelle des biofilms issues du lac d'Alchichica ont été incubés. Dans ce cas, nous avons étudié la précipitation des silicates de magnésium non seulement dans des biofilms constitués d'une diversité biologique relativement importante mais également dans des milieux alcalins où le pH est plus tamponné que dans le milieu de culture standard utilisé pour la culture de cyanobactéries. Dans ce second temps, nous nous sommes demandé où a lieu la précipitation des silicates de magnésium dans les biofilms : plutôt au niveau des cellules et/ou sur les polymères extracellulaires ? *A contrario* est-ce que c'est l'effet pH qui compte ou bien l'effet « template » ? Ou bien est-ce la concentration en silice dissous qui est le paramètre important ? Nous nous sommes également demandé quel peut être le ou les produit(s) formé(s) dans ces communautés diversifiées.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Protocole des expériences de biominéralisation de silicates par des souches axéniques

Dans un premier nous avons effectué des expériences de biominéralisation de silicate de magnésium avec 2 souches de cyanobactéries dans des milieux de culture non tamponnés (pour le pH) contenant du Mg^{2+} et H_4SiO_4 . Les milieux de culture étaient initialement sous saturés par rapport aux silicates de magnésium. L'hypothèse est que ces cyanobactéries, réalisant la photosynthèse oxygénique, vont augmenter le pH. L'augmentation du pH va provoquer un passage de la solution d'un état sous-saturé vers un état sursaturé par rapport aux silicates de magnésium et donc induire la précipitation. Il est à noter que d'autres phases minérales pourraient potentiellement précipiter suite à cette augmentation de pH et possiblement entrer en compétition avec l'a précipitation de silicates de Mg.

Deux souches cyanobactéries axéniques ont été utilisées. *Synechocystis* sp. PCC 6803 provenant de la collection Pasteur (notées PCC) et *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 qui a été isolée dans une source thermale au Japon, décrite par Nakamura et al. (2002) et Yamaoka et al. (1978). Elles ont été choisies car elles sont bien décrites, manipulables génétiquement pour de futures expériences, montrent une croissance rapide et induisent une augmentation de pH conséquente. Enfin, elles ont des températures de croissance différentes. Des prélèvements des cultures ont été faits toutes les 72 à 96 h environ. Les milieux de culture et la stérilisation de ces milieux ont été réalisés dans des erlenmeyers en polycarbonates de 1,5 L afin d'éviter l'apport de silice dans le milieu de culture par des bouteilles en verre. Pour cette expérience, nous avons réalisé un milieu BG-11 auquel nous avons ajouté une source de H_4SiO_4 sous forme de $Na_2SiO_3 \cdot 5H_2O$ à 0,5 mM (BG-11Si). Le pH du milieu a été ajusté à 7,7 à l'aide de HCl à 3 M. Un milieu BG-11 sans source de H_4SiO_4 a également été utilisé permettant d'avoir un témoin où il n'y aura pas de biominéralisation de silicate de magnésium et de contrôler l'impact de cette espèce chimique sur la croissance des souches de cyanobactéries.

Tableau 1. Composition des cations et des anions dans le milieu de culture BG-11Si à un pH de 7,71, 1 bars et à 25°C déterminés par Visual Minteq 3.0

| Cations | Concentrations à pH 7,71 (μM) | Anions | Concentrations à pH 7,71 (μM) |
|--------------------------|---|----------------------------|---|
| Na^+ | 19130 | NO_3^- | 17648 |
| H_4SiO_4 | 501,7 | Cl^- | 507,1 |
| K^+ | 463,9 | HCO_3^- | 452,0 |
| Mg^{2+} | 306,6 | CO_3^{2-} | 1,7 |
| Ca^{2+} | 244,9 | SO_4^{2-} | 304,9 |
| Fe^{2+} | 30 | HPO_4^{2-} | 160,6 |
| Mn^{2+} | 4,2 | H_2PO_4^- | 32,3 |
| Zn^{2+} | 0,5 | citrate | 58,4 |
| Cu^{2+} | 0,2 | H_3BO_3^- | 23,1 |
| Co^{2+} | 0,1 | MoO_4^{2-} | 0,8 |
| NH_4^+ | 29,2 | NH_3 | 0,7 |
| | | H_3SiO_4^- | 0,004 |

Les 2 souches de cyanobactéries ont été inoculées à partir de précultures en phase stationnaire de croissance à une DO (densité optique) d'environ 0,03 dans 750 mL de milieux BG-11 et BG-11Si. La souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 a été cultivée à 30 °C, en agitation et lumière continue. La souche *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 a été cultivée à 45 °C, sans agitation et en lumière continue. Un milieu BG-11Si non inoculé a été utilisé pour contrôler la précipitation abiotique pour chaque souche. Ces expériences ont été réalisées sans réplicats. Les erlenmeyers remplis ont été pesés avant chaque prélèvement pour évaluer l'intensité de l'évaporation au cours du temps. Le volume d'eau perdu déduit a été remplacé par de l'eau milliQ (18,2 M Ω) stérile. Dans les milieux de culture inoculés ou non, 15 mL ont été prélevés. Dans un premier temps, 1 mL a été utilisé afin de mesurer la densité optique (DO) à 730 nm et le pH. La DO a été mesurée contre du milieu de culture non inoculé. La précision de l'appareil est de 0,005 unité. La précision du pH-mètre est de 0,1 unité. Cependant, il est à noter que des variations de pCO₂ spontanées de près de 20% au cours du temps dans le témoin ont été mesurées dans une thèse précédente, notamment due à l'activité du personnel présent dans la pièce (thèse de Nithavong Cam, 2016). Puis, les 14 autres mL ont été filtrés à 0,22 μm et 1 mL du filtrat a été acidifié avec de l'acide nitrique (concentration finale de 2 %) pour dosage du calcium et/ou magnésium dissous en solution par ICP-AES à l'IPGP et colorimétrique et titration au laboratoire. Le dosage de H_4SiO_4 a été réalisé par la technique du « yellow silicomolybdate » au laboratoire (présentée section 2.3.3) et d'autre part a été sous-traité

à l'IPGP. Dans ce dernier cas, des prélèvements de 1 mL ont été dilués au 10^{ème} et la concentration de H₄SiO₄ a été déterminée par la technique de l'axflow à l'IPGP par Emmanuelle Raimbault (présentée dans le chapitre 2 section 2.2.2).

2.2. Aquariums et expériences de laboratoire contenant des microbialites et biofilms issus de différents lacs alcalins du Mexique (La Preciosa, Alchichica)

Nous disposons à l'IMPMC de plusieurs objets d'études pour étudier l'influence des microorganismes sur la précipitation des silicates de magnésium. Ainsi, des microbialites vivantes ont été rapportées des lacs mexicains lors de missions précédentes. Ces microbialites ont été placées dans des aquariums et de l'eau milliQ a été ajoutée et s'est mise en équilibre avec la partie minérale des microbialites. Ainsi, les solutions aqueuses des aquariums sont aujourd'hui à des pH et des compositions chimiques proches de ceux mesurés dans les lacs (**Tableau 1**). Ici, on parle de mésocosmes qui sont des hybrides entre l'expérience de laboratoire et la complexité du milieu naturel. Mais surtout on a une diversité de microorganismes dans ces aquariums qui font des biofilms. Dans le détail, les aquariums 1 et 2 (annotés « Aq 1 » et « Aq2 ») ont été réalisés en 2012 avec des microbialites du nord et de l'ouest du lac Alchichica respectivement (**Fig. 2A**). Le 3^{ème} aquarium (annoté « Aq3 ») a été réalisé en 2014 avec des microbialites de l'ouest du lac Alchichica (**Fig. 2B**). Enfin, l'aquarium 4 (annoté « Aq4 ») est le plus récent, réalisé en 2016, et est constitué de microbialites vivants du lac de La Preciosa (**Fig. 2B**). L'évaporation est ajustée à l'aide d'eau milliQ tous les 3 mois environ. Les aquariums sont dans une pièce climatisée à 20°C sous agitation pour l'aquarium 4. Auparavant les aquariums étaient sous lumière continue. Nous avons remarqué que les biofilms devenaient jaune verdâtres. Ainsi depuis 2018, nous utilisons la lumière naturelle et la couleur des biofilms est redevenue verte. Le deuxième objet que l'on a, est une expérience qui a été lancée en août 2014 et est nommé ici bouteille Atx-Alch (annoté « Bt_Atch-Alch ») (**Fig. 2C**). Cette fois-ci il s'agit d'un milieu synthétique qui mime les conditions chimiques du lac d'Atexcac réalisé au cours d'une thèse précédente (Nina Zeyen). Le milieu a été préparé de la façon suivante : Dans 1 L d'eau milliQ ont été ajoutés 52 mmol/L de NaCl, 2 mmol/L de K₂SO₄, 1,1 mmol/L de Na₂SiO₃.5H₂O et 50 mmol/L de MgCl₂.6H₂O ([Mg²⁺] = 20 mM dans le lac). Le pH a été ajusté à 8,1 avec du HCl. Puis, il a été incubé dans cette eau des biofilms provenant du lac d'Alchichica. L'expérience se déroule sans agitation, dans la pièce climatisée à 20 °C.

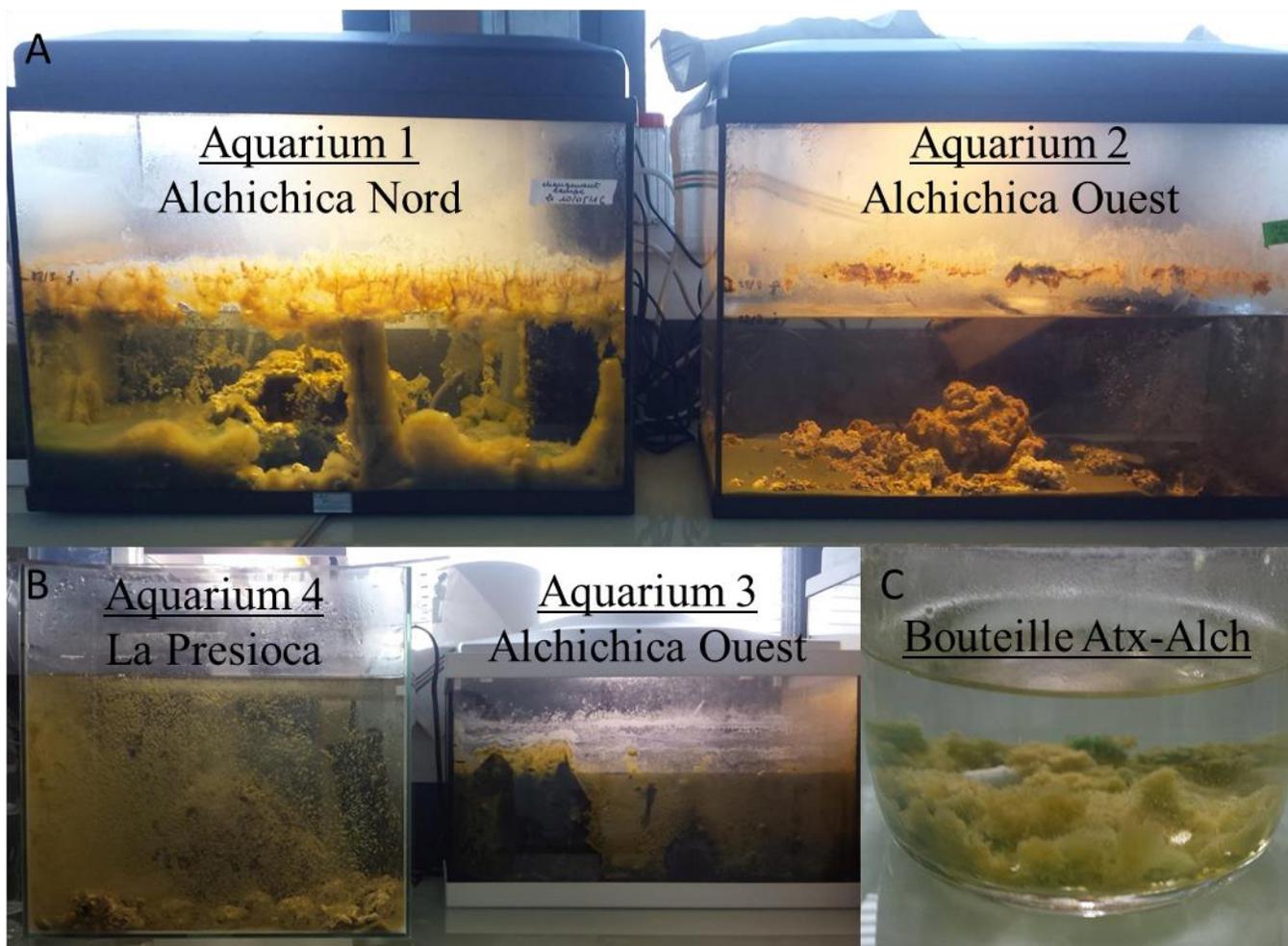


Figure 2. Photographies des différents objets d'étude avec des biofilms et microbialites des lacs mexicains. La Preciosa et Alchichica (A et B) et la bouteille Atx-Alch avec des biofilms de l'aquarium d'Alchichica dans une eau synthétique reproduisant les conditions physico-chimiques du lac d'Atexcac y sont représentés.

2.3. Analyses chimiques

2.3.1. Dosage du calcium dissous par colorimétrie (Moorhead et Biggs, 1974)

Un mélange v/v est fait entre i) une solution contenant 0,104 g.L⁻¹ d'o-crésolphtaléine complexone, 40 mM d'HCl et 1,5 g.L⁻¹ de 8-hydroxyquinoléine (réactif de coloration) et ii) une solution contenant 1 M de 2-amino,2-méthyl-1-propanol (réactif alcalin), est réalisé extemporanément. Dans un second temps, 12,5 µL de filtrat acidifié est ajouté à 500 µL de ce mélange. L'intérêt de la colorimétrie est qu'elle est rapide et facilement mise en place au laboratoire. La limite de quantification de la technique est déterminée par la limite de détection du spectromètre. Celle-ci est de 0,005 unité, ce qui correspond à environ 20 µM en concentration de

calcium dans l'échantillon mesuré. La DO à 570 nm de la solution est corrélée linéairement avec sa concentration en Ca^{2+} dans une gamme allant de 20 μM à 4000 μM . Une gamme étalon acidifiée (HNO_3 à 2%) est faite avec des concentrations croissantes de 20 μM à 500 μM .

2.3.2. Titration à l'EDTA de Mg^{2+} / Ca^{2+}

On peut doser les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} avec une méthode de complexométrie. Afin d'obtenir la concentration en Mg^{2+} , il suffit de soustraire la concentration de Ca^{2+} trouvée par la méthode de colorimétrie (Moorehead et Biggs, 1974) à la concentration totale de Ca^{2+} et Mg^{2+} trouvée avec la méthode complexométrique. Dix mL d'échantillon ont été filtrés préalablement à 0,22 μm puis mélangés à 20 mL de tampon ammoniacal (pH ~ 10,5). Dans cette solution une pointe de spatule d'un indicateur coloré, l'ériochrome T noir (environ 10 mg), est ajoutée. La solution devient violette/bleue. L'ériochrome T noir change de couleur, ici du violet/bleu vers rose, que dans une gamme de pH 7-11. Une burette de 20 mL (titre à 0,1 mL) est remplie d'EDTA à 0,0025 M qui va chélater les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} . L'EDTA dans la burette est ajoutée petit à petit à la solution ammoniacale et l'échantillon qui est agitée. Le volume à l'équivalence est obtenu lorsque la solution titrée change de couleur du violet au bleu. Il est ainsi possible de calculer le nombre de moles d'EDTA ajouté à la solution. Compte tenu du rapport $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} : \text{EDTA} = 1 : 1$, les moles de Ca^{2+} et de Mg^{2+} complexées avec l'EDTA peuvent être calculées en soustrayant l'excès d'EDTA aux moles totales d'EDTA ajoutées à l'échantillon. Ce résultat correspond aux moles de Ca^{2+} et Mg^{2+} dans la solution de l'échantillon.

Les résultats pour la concentration de Mg^{2+} obtenues par titration au laboratoire ont souvent donné des concentrations de Mg^{2+} supérieures à celles obtenues par ICP-AES à l'IPGP (**Fig. 3**). Premièrement, le protocole mis en place pour le dosage à l'ICP-AES fait intervenir des contrôles de qualité achetés dans le commerce et une gamme étalon réalisée par la responsable de la plateforme. Cela permet de contrôler l'efficacité des dosages. Deuxièmement, la $[\text{Mg}^{2+}]$ est déterminée par la titration totale de $[\text{Ca}^{2+}]$ et $[\text{Mg}^{2+}]$ totale en soustrayant la $[\text{Ca}^{2+}]$ obtenue par colorimétrie. La concentration totale de $[\text{Ca}^{2+}]$ et $[\text{Mg}^{2+}]$ totale est elle-même déterminée par un changement de couleur qui est parfois objectivement difficile à évaluer. De plus, on ajoute une étape introduisant potentiellement d'autres erreurs de mesure par le dosage de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en colorimétrie. Enfin, la titration nécessite un prélèvement d'un grand volume (10 mL) comparativement à l'ICP-AES (0,5 mL). Lors de la conception d'expérience, comme présenté par la suite, nécessitant de multiplier les conditions expérimentales, il vaut mieux privilégier des volumes moins importants qui impliquent

de prélever des petits volumes. Ainsi, pour des raisons de précision, répétabilité et fiabilité des résultats, mais également de conception d'expérience, nous présenterons par la suite la $[Mg^{2+}]$ obtenues par ICP-AES.

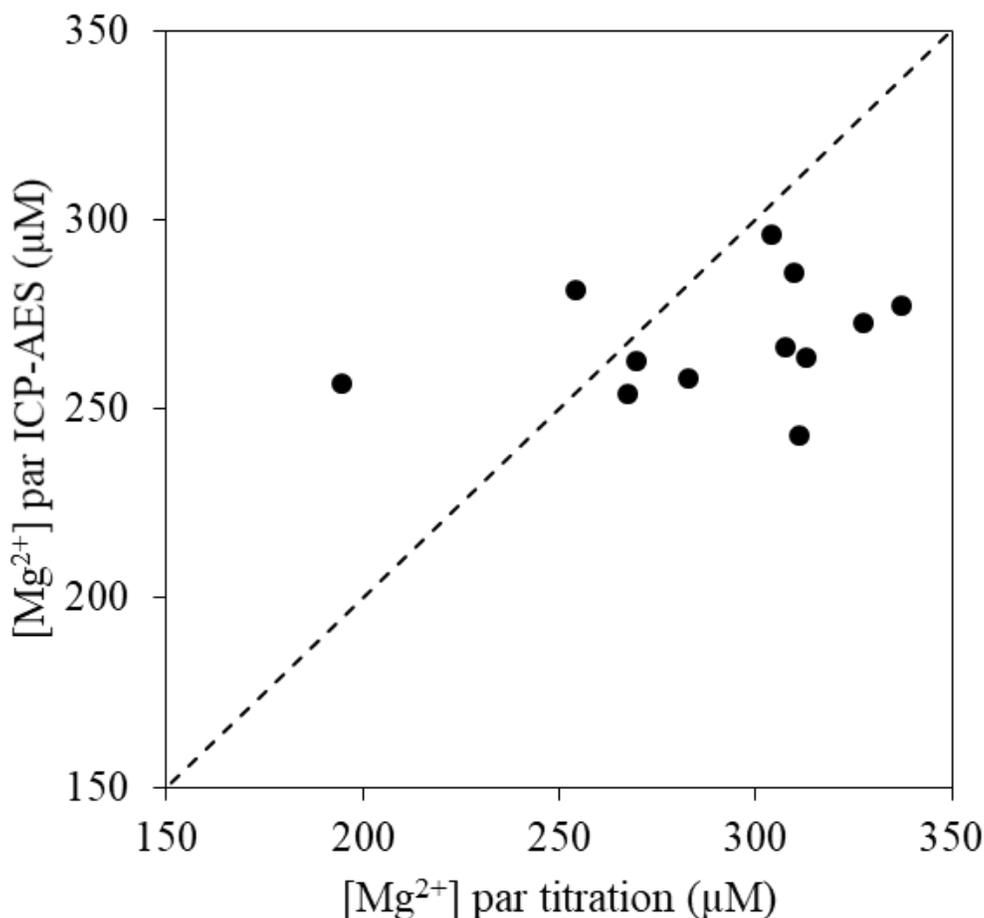


Figure 3. Graphique de la $[Mg^{2+}]$ déterminée par ICP-AES à l'IPGP en fonction de la $[Mg^{2+}]$ obtenue par titration au laboratoire.

2.3.3. Dosage colorimétrie de l' H_4SiO_4 par la technique du « yellow silicomolybdate » (Knudson et al., 1940)

La concentration en acide orthosilicique (H_4SiO_4) a été mesurée en utilisant la méthode colorimétrique du « yellow silicomolybdate » (Water Analysis Handbook, The Hach Company, Loveland, Colorado, USA). Le procédé au silicomolybdate est basé sur le principe que le molybdate d'ammonium réagit avec la silice dissoute, mais également le phosphate présent à pH faible (entre 1,6 et 2). La réaction donne des hétéropolyacides de couleur jaune. L'acide oxalique

est ajouté pour détruire l'acide molybdophosphorique en laissant le silicomolybdate intact, éliminant ainsi toute interférence de couleur des phosphates. Il faut mentionner que cette méthode mesure la silice soluble. Ce terme inclut non seulement l'ion silicate monomère mais également des espèces oligomères telles que des dimères, des trimères, des tétramères, etc. Le nombre exact d'unités réactives n'est pas connu.

Selon cette méthode, 1 ml d'échantillon filtré à 0,22 μm est placé en cuve spectrométrique. 0,5 ml de solution mère de molybdate d'ammonium (100 g.L^{-1}) (stable 2 semaines à 4°C à l'obscurité) et 0,25 ml de HCl à 8% sont ajoutés à l'échantillon, puis la solution est bien mélangée et laissée à l'air ambiant pendant 10 min. Le pH de cette solution doit être compris entre 1,6 et 2 afin d'avoir un maximum de couleur jaune (Knudson et al., 1940). Ensuite, on ajoute 0,5 ml de solution d'acide oxalique permettant de décomplexer Mo-P et on mélange à nouveau. La solution est laissée à l'air ambiant pendant 2 min. Le spectrophotomètre est réglé à zéro d'absorbance avec l'échantillon étalon à 0 μM de H_4SiO_4 . Enfin, l'absorbance de l'échantillon est mesurée à 400 nm. La DO à 400 nm de la solution est corrélée linéairement avec sa concentration en H_4SiO_4 dans une gamme allant de 0 μM à 2000 μM . Dans notre cas, nous avons réalisé une gamme étalon de $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ avec des concentrations croissantes de 0 μM à 1000 μM .

Les résultats pour la concentration de H_4SiO_4 obtenues par dosage colorimétrique « yellow silicomolybdate » au laboratoire montrent des concentrations de H_4SiO_4 supérieures à celles obtenues à l'IPGP par la technique de colorimétrie en flux continue Axflow (**Fig. 3**). En effet, lorsque le pH de la solution échantillon avec le molybdate d'ammonium acidifiée est en dessous de 1, le molybdate se complexe avec les phosphates. Même avec l'utilisation de l'acide oxalique, les complexes Mo-P ne se décomplexent pas. C'est pourquoi les concentrations obtenues étaient toujours supérieures car nous mesurons également la concentration en phosphate dans le milieu. Il était extrêmement difficile de déterminer le volume de HCl à ajouté dans la solution à acidifier. En effet, les dosages colorimétriques ont été réalisés sur des cultures de cyanobactérie et par conséquent le pH augmente en fonction du temps (l'augmentation dépendant elle-même de la souche) ce qui était compliqué à mettre en œuvre pour des mesures de routine. Dans les travaux qui suivront les concentrations en H_4SiO_4 présentées seront celles obtenues à l'IPGP par la colorimétrie en flux continue Axflow qui utilise par ailleurs des contrôles qualités issus du commerce pour contrôler la gamme étalon permettant une répétabilité et n'est pas sensible aux phosphates permettant une fiabilité des résultats. Cependant, la technique de dosage par « yellow

silicomolybdate » peut être utilisée dans des milieux tamponnés avec des concentrations en phosphates réduites au minimum. En effet, cette technique est rapide à effectuer et nécessite peu de volume de prélèvement adapté pour les expériences des petits volumes.

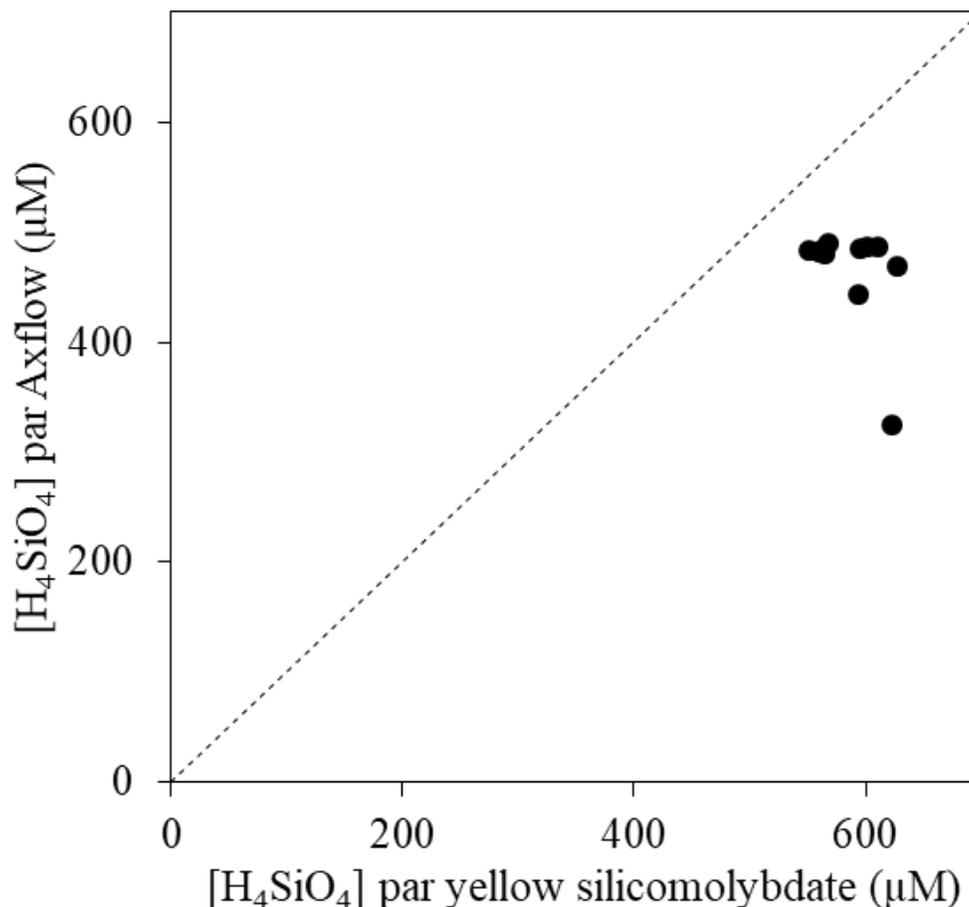


Figure 4. Graphique de la $[H_4SiO_4]$ déterminée par ICP-AES à l'IPGP en fonction de la $[H_4SiO_4]$ obtenue par titration au laboratoire.

2.3.4. Dosage colorimétrie de H_4SiO_4 en flux continue Axflow.

Comme décrit dans le chapitre 2 section 2.2.2.

2.3.5. Dosage multivarié par ICP-AES (Inductively coupled plasma - Atomic Emission Spectrometry)

Comme présenté dans le chapitre 1.

2.4. Caractérisations minéralogiques globales

2.4.1. Préparation des échantillons

Les biofilms ont été récupérés à l'aide d'une spatule et placés dans un tube Falcon de 50 mL en remplissant la totalité du tube. Les biofilms ont été lavés 3 fois avec de l'eau milliQ afin d'éviter toute précipitation de sels pendant le séchage. Une fois lavés, les biofilms ont été séchés pendant 2 semaines à 37 °C. Enfin, ils ont été broyés finement.

2.4.2. DRX

Comme décrit dans le chapitre 2.

2.4.3. FTIR

Comme décrit dans le chapitre 2.

2.5. Observations et caractérisations en microscopie des assemblages minéraux / micro-organismes

2.5.1. Séchage des échantillons par contournement du point critique du CO₂

Nous avons testé différentes techniques de préparation d'échantillon adaptées à l'observation de matériel biologique hydraté, afin de mettre en évidence de manière fiable une association spatiale entre les silicates de magnésium hydratés et peu cristallisés, et de la matière organique. En effet, les échantillons de biofilms ont été préparés par séchage du contournement du point critique qui permet de conserver la structure 3D. Nous avons prélevé des biofilms situés au fond des aquarium 1 (mésocosme du Nord du lac d'Alchichica) et 4 (mésocosme du lac de La Preciosa), et de la bouteille Atx-Alch. Les biofilms ont été rincés dans un bain d'eau milliQ pendant 5 min. Dans un deuxième temps, ils ont été déshydratés dans des bains successifs d'alcool à 70%, 90% et absolue pendant 5 min. Enfin, le séchage par contournement du point critique du CO₂ a été réalisé par un appareil point critique automatisé Leica EM CPD300. On a appliqué des cycles de montée et diminution de température et pression de CO₂, ainsi on passe par l'état supercritique du CO₂ où les tensions de surface sont moins grandes qu'avec une interface eau/air (Anderson, 1951).

2.5.2. Corrélatrice CLSM « confocal laser scanning microscopy »/MEB

La calcéine (2,4-bis-[N, N'-di(carbométhyl)-aminométhyl]-fluorescein) fixe les cations divalents Ca²⁺ et Mg²⁺ et émet une fluorescence en leur présence à pH élevé (Gérard et al., 2013). Ainsi sous un microscope confocal, les cations divalents colorés par la calcéine fluorescent

en vert et sont facilement repérables. Pace et al. (2016) ont utilisé les propriétés de la calcéine afin de marquer les silicates de magnésium dans un biofilm. Nous avons réalisé des tests préliminaires en marquant ou non un échantillon de référence de kérolite synthétisée à 90 °C et 500 bars. Pour la coloration à la calcéine, la référence de kérolite est placée dans un bain d'eau MilliQ auquel sont ajoutés 20 µl de calcéine (1 mg de calcéine/ml de diméthylsulfoxyde)/ml de solution. La solution est incubée dans l'obscurité à température ambiante pendant 90 minutes. La référence de kérolite est ensuite lavée dans de l'eau MilliQ sans colorants pour enlever l'excédent de calcéine. Lors des observations en CLSM de la kérolite non marquée à la calcéine, nous avons remarqué qu'elle auto-fluoresçait dans le vert (517 nm) lorsqu'elle est excitée à 488 nm de la même manière que si elle était marquée à la calcéine (**Fig. 5A et B**). Autrement dit, il semble qu'il n'y ait pas besoin de marquer la référence de kérolite à la calcéine pour la détecter avec une excitation à 488 nm à l'aide du CLSM.

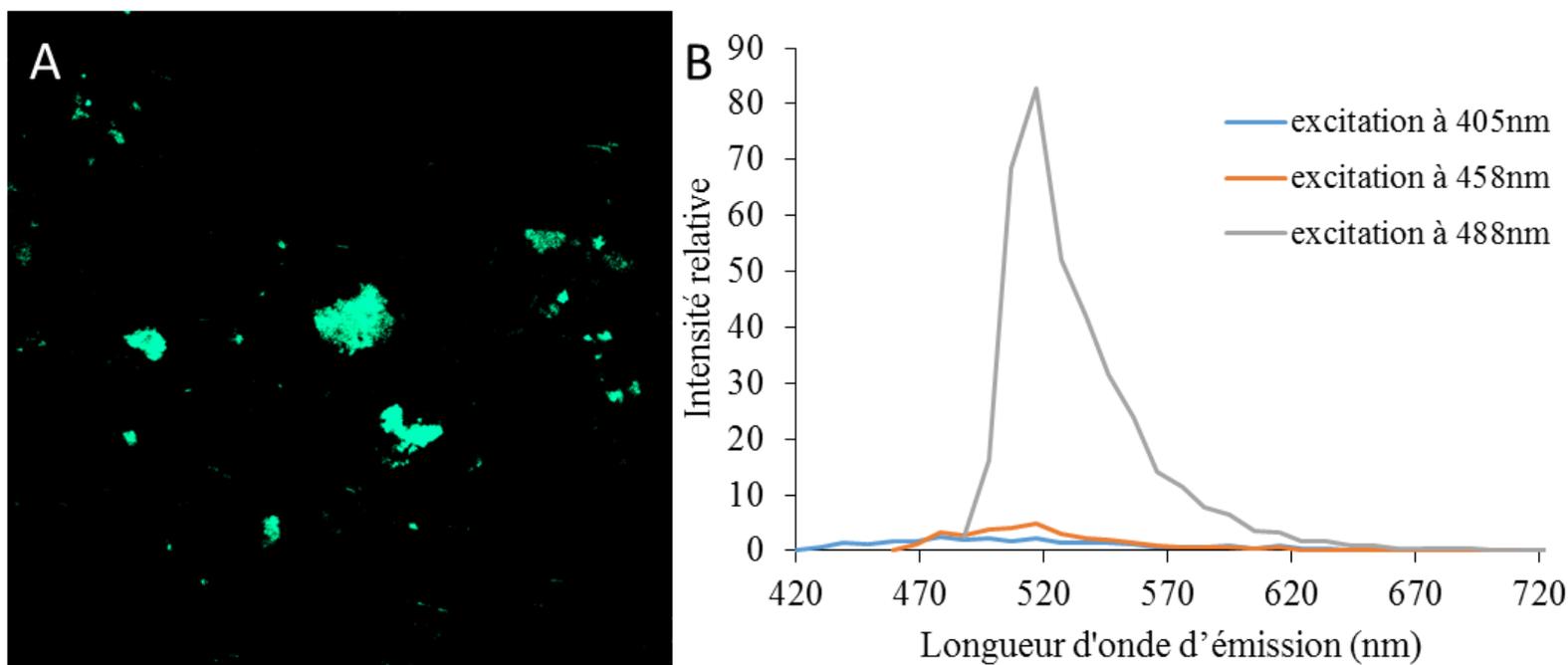


Figure 5. Image hyperspectrale d'une kérolite de référence synthétisée à 90 °C et 500 bars excitée à 488 nm (A) associée les spectres d'émission obtenue après excitation à 405 nm en bleu, à 458 nm en orange et 488 nm en gris (B).

Ainsi, nous avons étudié des échantillons de l'aquarium 4 en corrélative MEB/CLSM sans marquage à la calcéine pour détecter la présence de silicates de magnésium. Des échantillons du fond de l'aquarium ont été prélevés puis séchés par la technique du contournement du point critique sur une lamelle en plastique. Puis l'échantillon a été placé sur un support en aluminium compatible

avec le CLSM et le MEB. Dans un premier temps, nous avons effectué des observations à l'aide du CLSM Zeiss LSM 710 monté sur AxioImager Z2 en excitant l'échantillon à 488 nm et récupéré les données hyperspectrales. Puis, l'échantillon a été métallisé et observé au MEB. Grâce au logiciel Zen Blue, il est possible de retrouver les positions des objets observés précédemment au CLSM avec le MEB. Ainsi, nous pouvons corréliser la fluorescence et les analyses MEB-EDXS.

2.5.3. FIB

Comme présenté dans le chapitre 2. Ici nous n'avons pas réalisé de lame ultrafine de moins de 100 nm d'épaisseur, mais nous avons utilisé le faisceau ionique focalisé (FIB) à l'aide d'un instrument FIB Zeiss Neon40EsB en mode MEB pour avoir accès à l'intérieur des biofilms ou des cellules (mode « slice and view »). Pour cela nous avons utilisé un faisceau d'ions de 500 pA à 1 nA pour ouvrir les biofilms et cellules. Puis nous sommes descendus à 100 pA afin d'obtenir une surface plus lisse pour une meilleure visualisation.

2.5.4. Microscopie électronique à balayage couplée à la spectrométrie des rayons X en dispersion d'énergie

Comme présenté dans le chapitre 1.

2.5.5. Microscopie électronique en transmission couplée à la spectrométrie des rayons X en dispersion d'énergie

Comme présenté dans le chapitre 1.

3. Résultats

3.1. Test de biominéralisation des silicates de magnésium par des cultures axéniques de souches modèles de cyanobactéries

3.1.1. Suivi des paramètres chimiques et microbiologiques

Nous allons détailler les variations de croissance, de pH et de concentrations en Mg^{2+} et H_4SiO_4 dans les deux milieux de culture pour chaque souche de cyanobactéries.

Concernant, la souche de *T. elongatus* BP-1, on note que l'apport de silice dans le milieu n'affecte pas sa croissance et le pH est relativement le même dans les deux milieux de culture au cours du temps (7,7 à 0 heures et environ 8,8 au bout de 815 heures d'incubation) (**Fig. 6A et B**).

Lorsque l'on analyse la concentration de Mg^{2+} dans le milieu BG-11Si au cours du temps, celle-ci est initialement à 290 μM et varie très peu au cours du temps pour finir à 274 μM au bout de 815 h de croissance (**Fig. 6C**). On note que la concentration en H_4SiO_4 est stable à environ 484 μM jusqu'à 331 h, puis elle diminue et reste stable à 465 μM (**Fig. 6C**). A noter que dans le BG-11 on retrouve une concentration d'environ 13 μM de H_4SiO_4 provenant probablement de la pré-culture qui pousse dans un erlenmeyer en verre (**Fig. 6D**). La concentration de Mg^{2+} dans le milieu BG-11 reste stable entre 288 μM et 281 μM (**Fig. 6D**).

Pour la souche de *Synechocystis* sp. PCC 6803, on remarque également que sa croissance n'est pas affectée par l'ajout de silice dans le milieu (**Fig. 7A et B**). De plus, le pH est sensiblement le même dans les deux milieux de culture (7,7 à 0 heures et 10,7 à 815 heures d'incubation) (**Fig. 7A et B**). Cependant, on remarque que le pH atteint des valeurs très haut (pH = 10,5 à 10,7) très rapidement et est beaucoup plus important pour *Synechocystis* sp. PCC 6803 par rapport à *T. elongatus* BP-1 (pH \approx 8,8) (**Fig. 6A et B et 7A et B**). L'analyse de l'évolution des concentrations en Mg^{2+} montre une forte diminution au cours du temps de 294 μM initialement à 29 μM à 815 h (**Fig. 7C**). Dans une moindre mesure cette diminution est également observée dans le milieu BG-11 inoculé avec une valeur finale de 210 μM (**Fig. 7D**). Dans le milieu BG11-Si, parallèlement à la diminution de la concentration en Mg^{2+} , on observe également une diminution de la concentration en H_4SiO_4 (**Fig. 7C**). En effet, cette dernière initialement à 483 μM diminue à 324 μM , et se stabilise à 330 μM . Le rapport $\Delta[Mg^{2+}]/\Delta[H_4SiO_4]$ est de 1,84. La diminution des concentrations en Mg^{2+} et H_4SiO_4 nous suggère qu'il y a eu précipitation de Si-Mg. Cependant le rapport $\Delta[Mg^{2+}]/\Delta[H_4SiO_4]$ élevé souligne peut être la précipitation de d'autres phases telles que les carbonates ou hydroxydes de Mg.

On observe également la même concentration d' H_4SiO_4 dans le milieu BG-11 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 par rapport à celle de *T. elongatus* BP-1 entre 11 et 13 μM montrant une contamination de Si (**Fig. 6D et 7D**). Cette contamination peut venir des pré-cultures qui ont poussées préalablement dans des erlenmeyers en verre. Il est possible que les cellules aient adsorbés du Si à la surface cellulaire. Deuxièmement il est possible que cette contamination provienne directement des erlenmeyers.

Les 2 milieux BG-11Si non-inoculés à 30°C et 45°C montrent des valeurs de DO, de pH et de concentrations en Mg^{2+} et H_4SiO_4 qui varient très peu (**Fig. 8A-D**). Ces témoins montrent que

les diminutions des concentrations observées précédemment sont dues exclusivement à l'activité métabolique des souches de cyanobactéries.

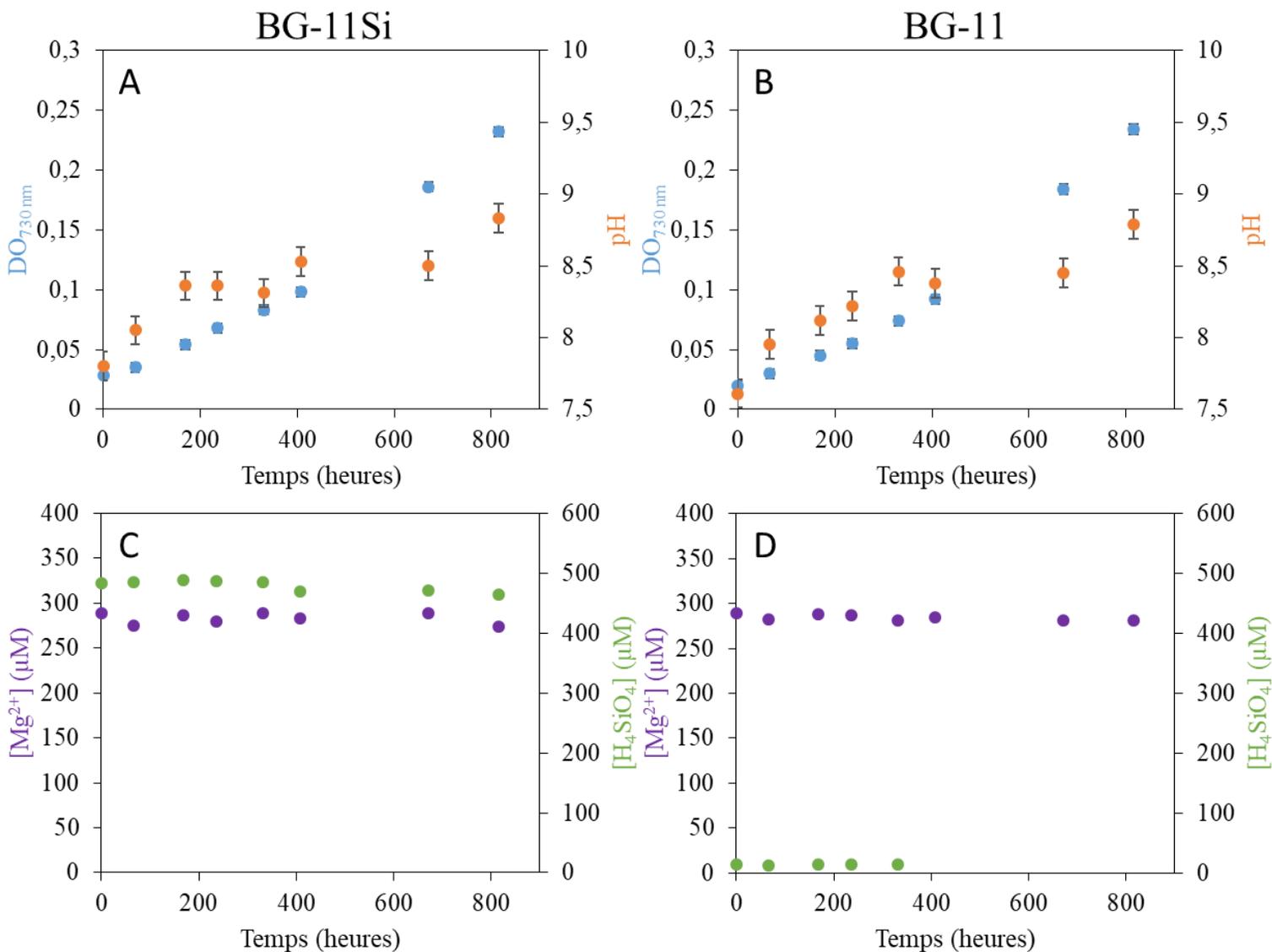


Figure 6. Graphiques du suivi de la croissance, du pH et des concentrations de Mg²⁺ et H₄SiO₄ en fonction du temps pour *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 dans le milieu BG-11Si et BG-11. La croissance représentée par la DO_{730nm} (●) et le pH (●) en fonction du temps dans le milieu BG-11Si (A) et dans le milieu BG-11 (B). Le suivi des concentrations Mg²⁺ (●) et H₄SiO₄ (●) en fonction du temps dans le milieu BG-11Si (C) et du BG-11 (D). Les barres d'erreurs représentent l'incertitude des mesures obtenues par ICP-AES et Axflow. Ici, l'incertitude des mesures se confondent avec les points. L'erreur sur la mesure de la DO et du pH sont constantes à 0,005 et 0,1 unités respectivement.

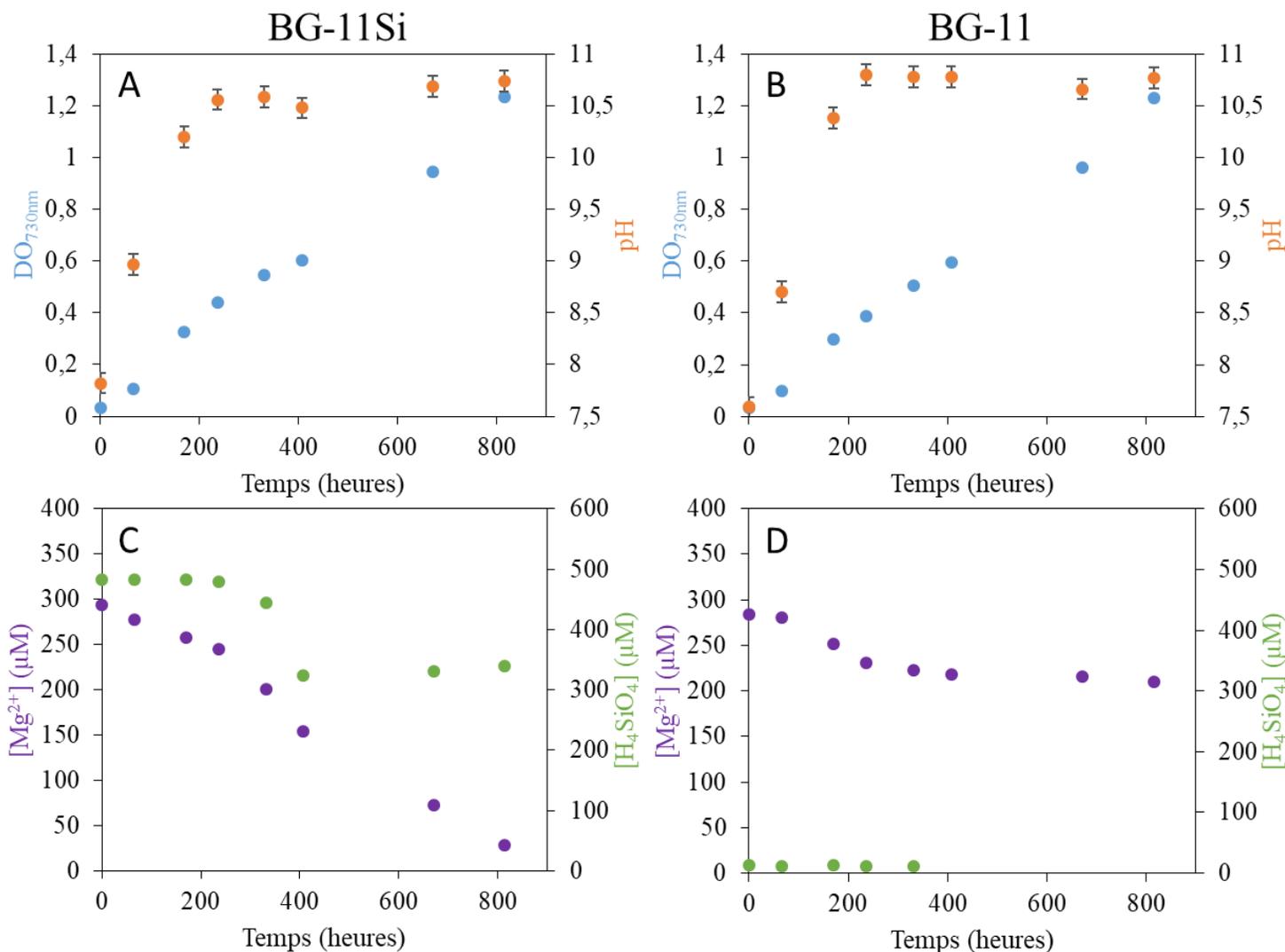


Figure 7. Graphiques du suivi de la croissance, du pH et des concentrations de Mg^{2+} et H_4SiO_4 en fonction du temps pour *Synechocystis* sp. PCC 6803 dans le milieu BG-11Si et BG-11. La croissance représentée par la DO_{730nm} (●) et le pH (●) en fonction du temps dans le milieu BG-11Si (A) et dans le milieu BG-11 (B). Le suivi des concentrations Mg^{2+} (●) et H_4SiO_4 (●) en fonction du temps dans le milieu BG-11Si (C) et du BG-11 (D). Les barres d'erreurs représentent l'incertitude des mesures obtenues par ICP-AES et Axflow. Ici, l'incertitude des mesures se confondent avec les points. L'erreur sur la mesure de la DO et du pH sont constantes à 0,005 et 0,1 unités respectivement.

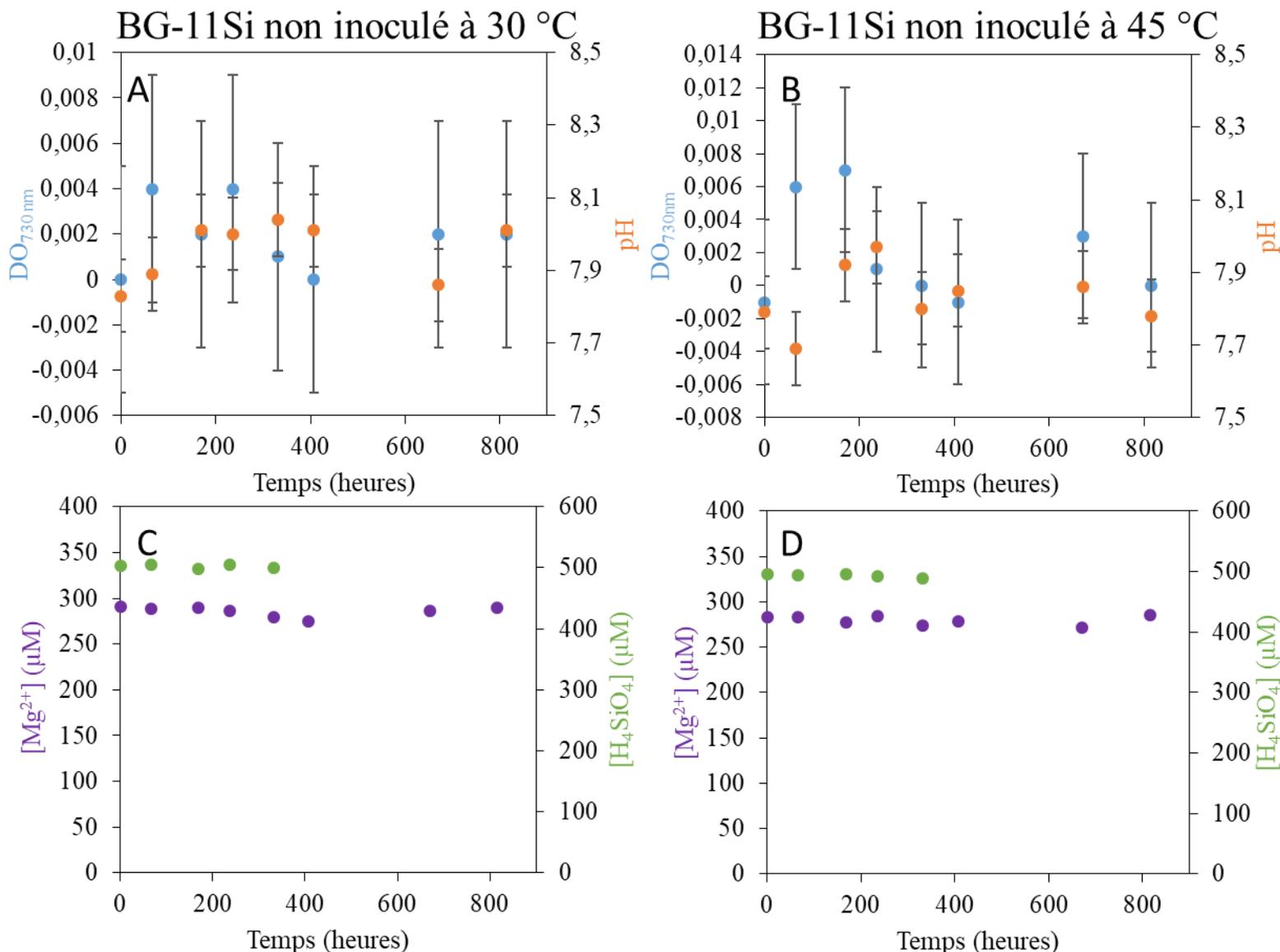


Figure 8. Graphiques du suivi de la DO à 730 nm, du pH et des concentrations de Mg^{2+} et H_4SiO_4 en fonction du temps pour les milieux BG-11Si non inoculé à 30 °C et 45 °C. La DO_{730nm} (●) et le pH (●) en fonction du temps dans le milieu BG-11Si non-inoculé à 45°C sans agitation (A) et le milieu BG-11Si non-inoculé à 30 °C avec agitation continue (B). Le suivi des concentrations Mg^{2+} (●) et H_4SiO_4 (●) en fonction du temps dans le milieu BG-11Si non-inoculé à 45°C sans agitation (C) et le milieu BG-11Si non-inoculé à 30 °C avec agitation continue. Les barres d'erreurs représentent l'incertitude des mesures obtenues par ICP-AES et Axflow. Ici, l'incertitude des mesures se confondent avec les points. L'erreur sur la mesure de la DO et du pH sont constantes à 0,005 et 0,1 unités respectivement.

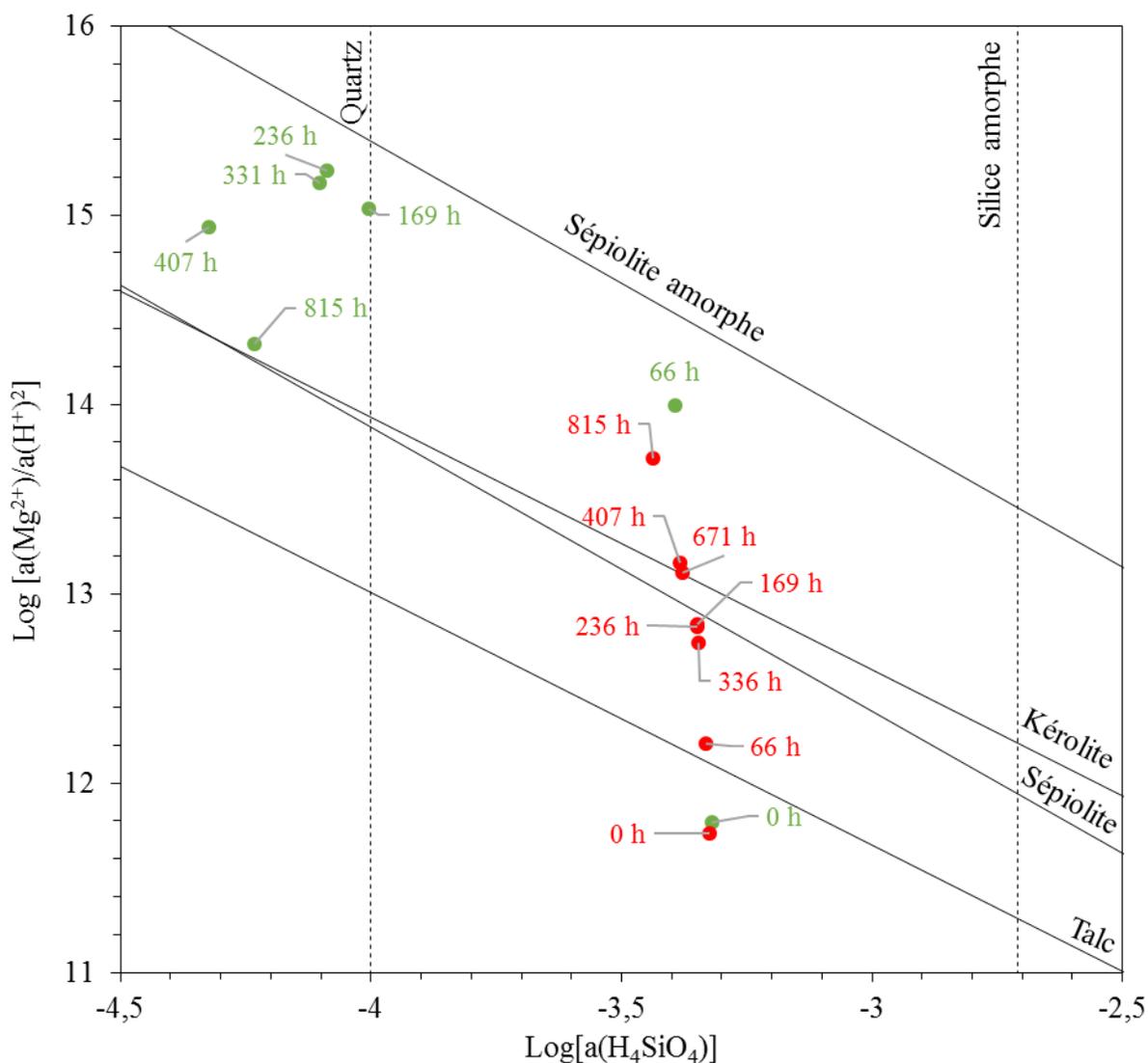


Figure 9. Diagramme de solubilité montrant les solubilités apparentes de différentes phases de silicates de magnésium pour *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (●) et *Synechocystis* sp. PCC 6803 (●) au cours du temps. Les traits pleins représentent les lignes de solubilité du talc cristallisé (Jones, 1986), kérolite et sépiolite (Stoessel, 1988), sépiolite amorphe (Wollast et al., 1968).

A l'aide des données de la chimie des milieux de culture, nous avons pu déterminer et tracer l'état de saturation des milieux de culture BG-11Si par rapport aux silicates de magnésium pour chaque souche de cyanobactérie. Ainsi, nous voyons bien que les milieux de culture des 2 souches de cyanobactéries sont sous-saturés par rapport aux silicates de magnésium à $T = 0$ h (**Fig. 9**). Si l'on regarde l'évolution de l'état de saturation par rapport aux silicates-Mg dans la solution de *T. elongatus* BP-1 (en rouge sur la figure 9), nous observons qu'elle est sursaturée par rapport au talc à 66h, puis à la kérolite et sépiolite à partir de 407 h mais ne dépasse pas la ligne de saturation par

rapport à la « sépiolite amorphe » (**Fig. 9**). Contrairement à la solution de *T. elongatus* BP-1, celle de *Synechocystis* sp. PCC 6803 est sursaturée par rapport à la kérolite dès 66 h. Il est possible qu'après 66h (entre 66 et 169 h), la saturation de la solution ait atteint/dépassé la ligne de solubilité de la « sépiolite amorphe » mais qu'on ne voit pas à cause du pas temporel. Dans un second temps, tout en se déplaçant vers le haut du diagramme, on note un décalage vers la gauche traduisant i) une augmentation du $a(\text{Mg}^{2+})/a(\text{H}^+)^2$ et notamment du pH et ii) une diminution de l' $a(\text{H}_4\text{SiO}_4)$ jusqu'à 236 h (**Fig. 9**). Ensuite, on voit encore une diminution de l' $a(\text{H}_4\text{SiO}_4)$, mais également une diminution $a(\text{Mg}^{2+})/a(\text{H}^+)^2$ jusqu'à 815 h. Ainsi, cela semble en accord avec les résultats du suivi des concentrations et nous suggère qu'il y a eu précipitation de silicate-Mg (**Fig. 9**). S'il y a eu précipitation parce qu'on a atteint par exemple la solubilité de la « sépiolite amorphe », celle-ci ne tamponne pas la solution en Mg et Si et il y a donc d'autres phases qui ont précipitées. Il est possible que le précipité se transforme ou bien qu'il y a d'autres minéraux qui tirent ensuite sur l'état de saturation de la solution comme le suggère le rapport $\Delta[\text{Mg}^{2+}]/\Delta[\text{H}_4\text{SiO}_4]$ de 1,84 plus élevé que la « sépiolite amorphe » (0,67).

3.1.2. Analyses en microscopie électronique des bio-minéraux formés

Nous avons ensuite observé les cultures de BG-11Si de chaque souche en microscopie électronique à balayage et à transmission. Ici, nous présenterons les résultats du MET après 815 h d'incubation car aucun précipité n'a été détecté en MEB avant ce temps d'incubation. On peut remarquer qu'après 815 h, on ne retrouve pas de précipité de silicate-Mg dans la culture de *T. elongatus* BP-1 (**Fig. 10A-D**).

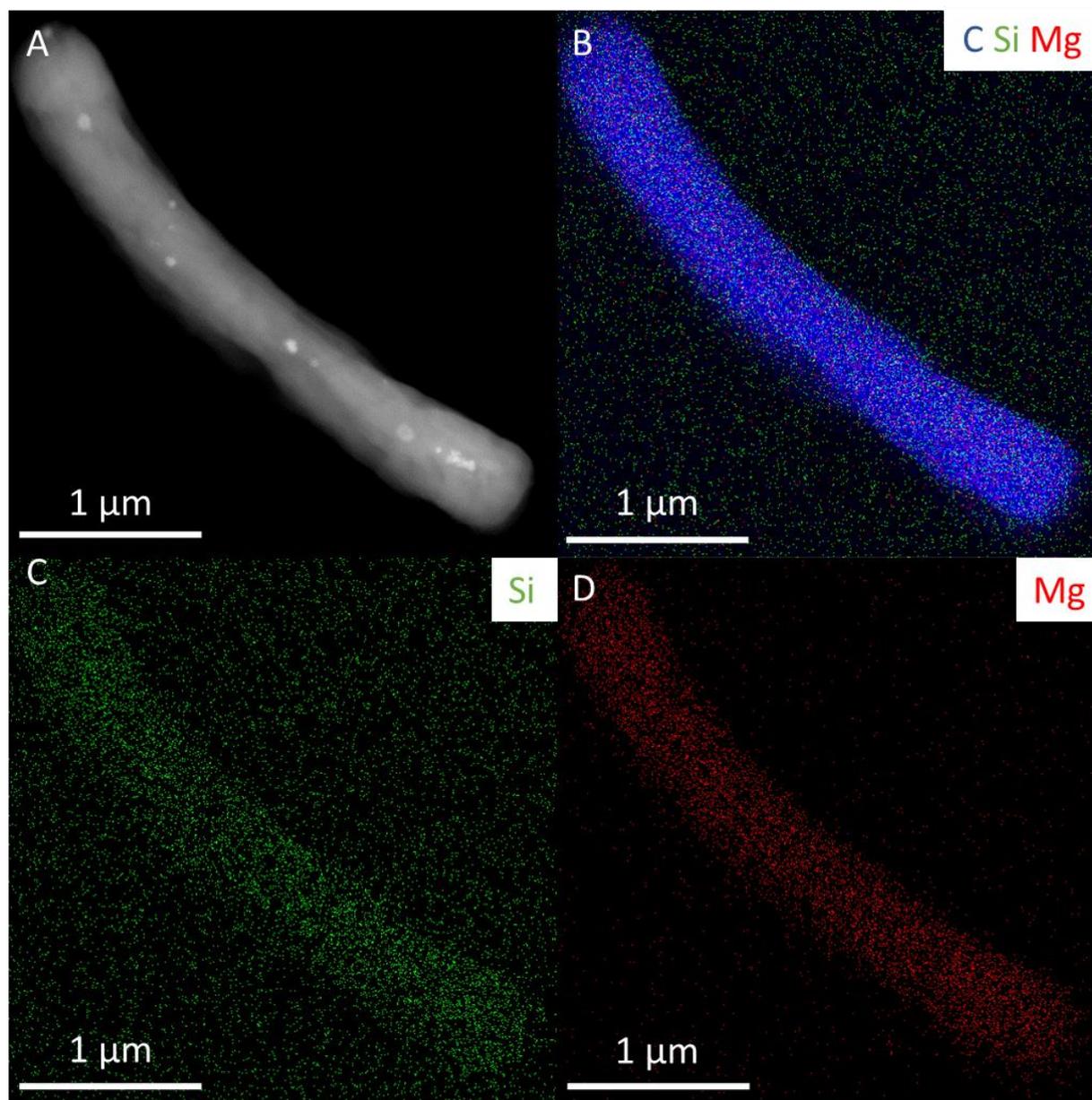


Figure 10. Image d'une cellule de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 après 815 heures d'incubation dans du BG11Si obtenue en STEM-HAADF (A) associée à la carte STEM-EDXS de l'overlay (B), en bleu le carbone, en vert le silicium (C) et en rouge le magnésium (D).

Contrairement à *T. elongatus* BP-1, on a retrouvé dans la culture de *Synechocystis* sp. PCC 6803 un précipité de silicate-Mg (**Fig. 11A-E**). En effet, le précipité sur l'image MET est étroitement lié aux cellules (**Fig. 11A-D**). De plus, on note que le précipité est principalement composé de Si et de Mg mais également de K et dans une moindre mesure de P, S et Cl (**Fig. 11E**). Le rapport Mg /Si d'après l'analyse EDXS du silicate de magnésium est de 0,5 compatible avec la présence de montmorillonite. Ce rapport est très différent du rapport $\Delta[\text{Mg}^{2+}]/\Delta[\text{H}_4\text{SiO}_4]$ mesuré dans la culture de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Il y a donc soit eu précipitation de carbonates ou d'hydroxydes de Mg. Cependant ces phases nous pas été retrouvées en microscopie électronique à transmission. Dans l'ensemble la précipitation a été très discrète.

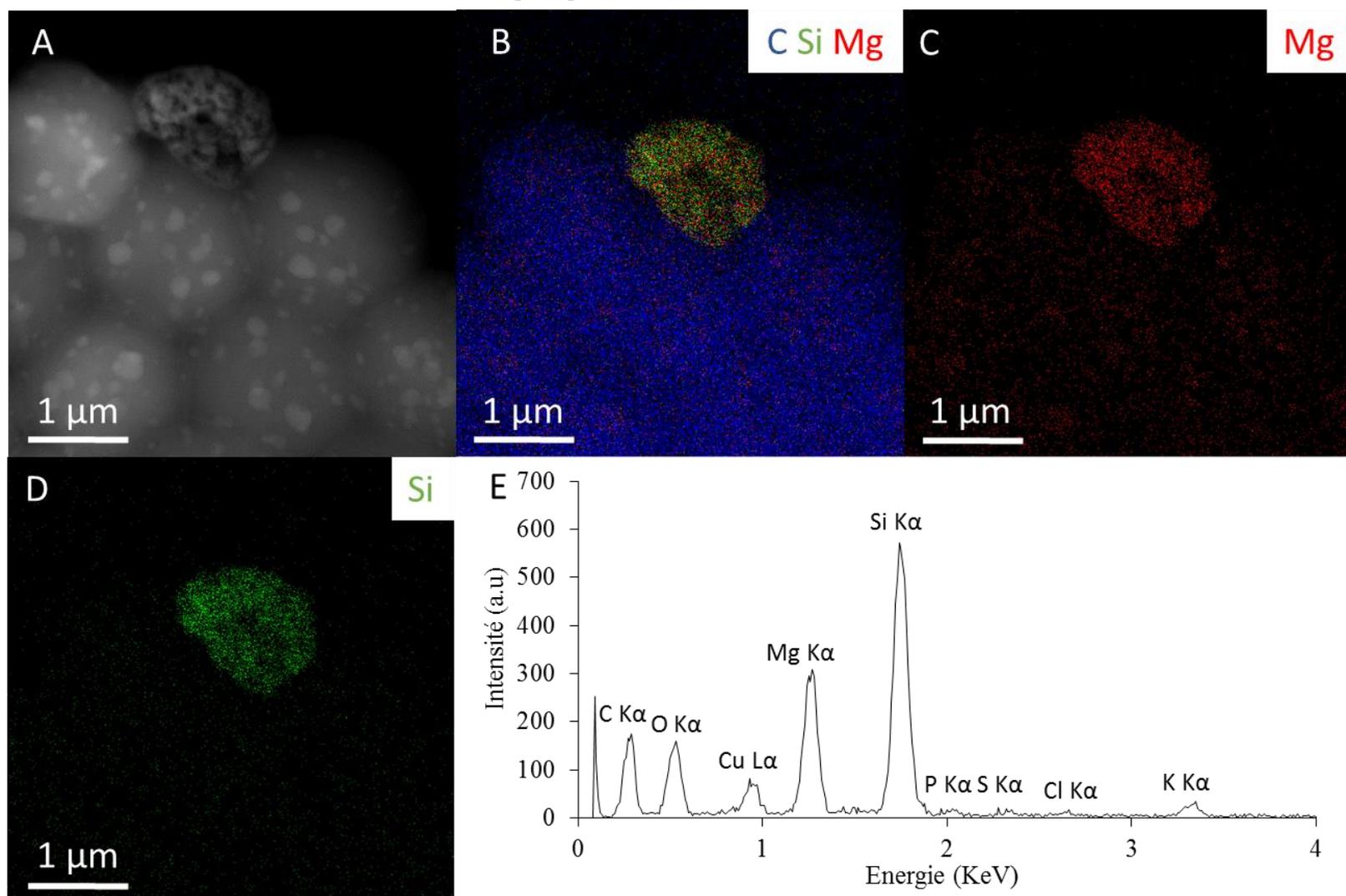


Figure 11. Image de cellules de *Synechocystis* sp. PCC 6803 et d'un précipité après 815 heures d'incubation dans du BG11Si obtenue en STEM-HAADF (A) associée à la carte STEM-EDXS de l'overlay (B), en bleu le carbone, en rouge le magnésium (C) et en vert le silicium (D) et le spectre EDXS de l'ensemble du précipité (E).

3.2. Etudes de la géochimie des eaux de mésocosmes.

À la suite de l'expérience de biominéralisation dans un milieu contrôlé avec des souches axéniques de cyanobactéries, nous avons voulu comprendre plus en détail les mécanismes géochimiques et microbiologiques en œuvre dans la précipitation de silicate-Mg dans des mésocosmes des lacs alcalins mexicains. En effet, ces mésocosmes présentent une diversité microbienne produisant des biofilms provenant de ces lacs permettant d'étudier la potentielle précipitation des silicates-Mg ou non en lien avec les micro-organismes. De plus, les solutions associées à ces différents mésocosmes ont des compositions chimiques différentes qui varient entre elles, offrant différents états de saturation vis-à-vis des silicates de magnésium que l'on pourra également étudier.

Dans un premier temps, les compositions chimiques des solutions des différents mésocosmes et de la bouteille Atx-Alch ont été analysées. L'ensemble des résultats est présenté dans le **tableau 1** ci-dessous :

Tableau 1. Composition chimique des échantillons d'eau des aquariums et de la bouteille Atx-Alch. L'alcalinité a été obtenue par titration (Gran, 1952) et la $[H_4SiO_4]$ par colorimétrie en flux continue. Les concentrations des cations majeurs par ICP-AES.

| Localisation | Echantillons | Dates | pH | Alcalinité (mM) | Ca ²⁺ (mM) | Mg ²⁺ (mM) | Na ⁺ (mM) | H ₄ SiO ₄ (mM) |
|--|--------------|-------|------|-----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------------------|
| <u>Aquarium 1</u> : mésocosme d'alchichica Nord | Aq1_2015 | 2015 | 8,9 | 16,75 | 0,05 | 6,78 | 12,75 | 0,04 |
| | Aq1_2017 | 2017 | 9,21 | 15,47 | 0,04 | 5,93 | 14,25 | 0,06 |
| | Aq1_2018 | 2018 | 9,27 | - | 0,04 | 5,71 | 12,3 | 0,05 |
| <u>Aquarium 2</u> : mésocosme d'alchichica Ouest | Aq2_2015 | 2015 | 8,82 | 13,38 | 0,07 | 8,52 | 1,86 | 0,02 |
| | Aq2_2017 | 2017 | 9,05 | 12,74 | 0,09 | 8,55 | 2,48 | 0,02 |
| | Aq2_2018 | 2018 | 9,22 | - | 0,07 | 7,79 | 2,07 | 0,09 |
| <u>Aquarium 3</u> : mésocosme d'alchichica Ouest | Aq3_2015 | 2015 | 8,82 | 13,75 | 0,07 | 7,46 | 2,19 | 0,01 |
| | Aq3_2017 | 2017 | 9,05 | 12,29 | 0,08 | 8,00 | 3,03 | 0,03 |
| | Aq3_2018 | 2018 | 9,23 | - | 0,06 | 7,08 | 2,18 | 0,03 |
| <u>Aquarium 4</u> : mésocosme de La Preciosa | Aq4_2017 | 2017 | 8,62 | 4,53 | 0,28 | 2,17 | 1,46 | 0,38 |
| | Aq4_2018 | 2018 | 8,8 | - | 0,25 | 1,97 | 1,29 | 0,37 |
| <u>Bouteille Atx-Alch</u> : expérience mimant les conditions physico-chimiques d'Atexcac avec les biofilms d'Alchichica Nord | Bt_Atch-Alch | 2018 | 7,83 | - | 0,26 | 87,19 | 95,03 | 0,82 |

A l'aide des données chimiques des solutions, nous pouvons visualiser à l'aide du diagramme de solubilité l'état de saturation de ces systèmes à différents temps par rapport à différents silicates de magnésium (**Fig. 12**). Premièrement, on remarque qu'ils sont tous sursaturés par rapport au talc. Pour l'aquarium 3 (ronds bleus), on est passé d'une solution sous-saturée à sursaturée par rapport à la sépiolite et la kérolite de 2015 à 2017. Cette augmentation est probablement dû à des mesures réalisées avant compensation de l'évaporation ou alors le système n'était pas encore à l'équilibre phase liquide/solide. De plus, la production primaire a également pu augmenter le pH vu que les aquariums ont été colonisé dans le temps et il y a donc plus de matière organique maintenant par rapport au début du lancement de ces mésocosme. De même, les aquariums 1 (rouge), 2 (vert) et 4 (jaune), qui étaient sous-saturés par rapport à la sépiolite amorphe, sont devenus saturés voire sursaturés par rapport à cette phase à partir de 2017 pour Aq1 et 2018 pour les deux derniers. Enfin la bouteille Atx-Alch est sursaturée par rapport à la sépiolite amorphe. Deux groupes se distinguent avec l'Aq4 et la Bt_Atch-Alch qui sont aussi tous les deux sursaturés par rapport au quartz alors que les aquariums 1, 2 et 3 sont sous saturés par rapport au quartz (**Fig. 12**).

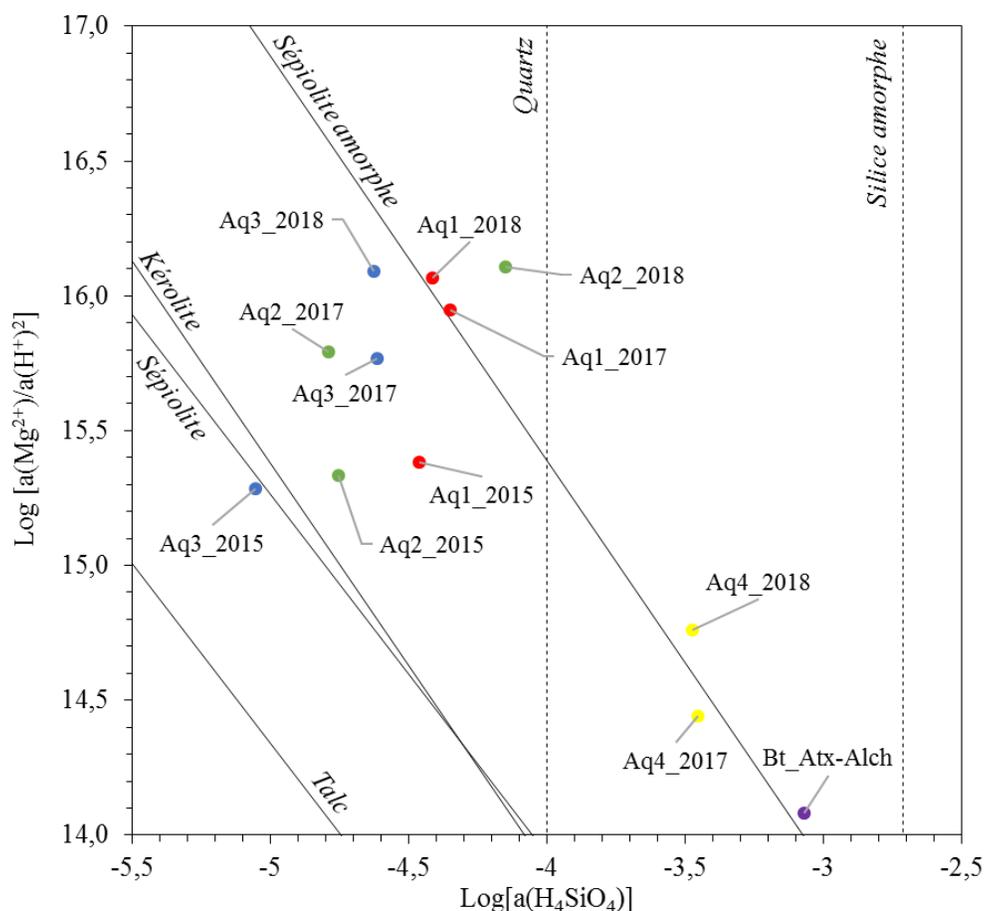


Figure 12. Diagramme de solubilité montrant les solubilités apparentes de différentes phases de silicates de magnésium pour les solutions de l'aquarium 1 (●), de l'aquarium 2 (●), de l'aquarium 3 (●), de l'aquarium 4 (●) et de la bouteille Atx-Alch (●) à différent temps. Les traits pleins représentent les lignes de solubilité du talc cristallisé (Jones, 1986), kérolite, sépiolite (Stoessel, 1988) et sépiolite amorphe (Wollast et al., 1968).

3.3. Caractérisation minéralogique globale par DRX et spectroscopie infrarouge des biofilms

À la suite des analyses chimiques des différentes solutions, nous avons investigué à l'aide de la DRX et de la FTIR les phases minérales se trouvant dans les biofilms. Dans un premier temps, nous allons décrire les résultats obtenus en DRX des biofilms provenant des mésocosmes du lac d'Alchichica :

Pour les biofilms issues d'Aq1, on remarque qu'ils contiennent principalement de l'hydromagnésite que l'on voit avec les pics [110] et [011] à 6,4 et 5,8 Å respectivement (**Fig 13**). De plus on note que ces biofilms présentent de très faibles pics associés à l'aragonite (**Fig 13**). On détecte également des feldspaths de type anorthite dont le signal est très important (**Fig 13**).

Pour les biofilms issues d'Aq2, on détecte de l'hydromagnésite et de l'aragonite (**Fig. 13**). De la même manière que pour Aq1, on retrouve un fort signal pour un feldspath de type anorthite dans le diffractogramme du biofilm d'Aq2.

Pour les biofilms issues d'Aq3, on ne détecte pas d'hydromagnésite mais un fort signal pour l'aragonite (**Fig. 13**). Un pic large est observé à environ 25° (2 θ cobalt) qui potentiellement pourrait être indexé comme de la silice amorphe (**Fig. 13**).

Le quartz est présent dans les 3 biofilms des mésocosmes d'Alchichica provenant probablement des microbialites ou du support en silicium utilisé pour la diffraction (**Fig 13**). Nous l'allons identifier par l'intermédiaire des pics à 31,1 ° ([011]) et 24,3 ° ([100]) (2 θ Co).

Les résultats obtenus en DRX des biofilms provenant mésocosme de La Preciosa Aq4 et de l'expérience Bt_Atch-Alch sont différents :

Les biofilms du mésocosmes Aq4 montrent de larges pics à 4,5, 2,6 et 1,52 Å associés à la présence d'une phase de type talc hydratée ou smectite (**Fig. 14**). On retrouve également de larges pics pour les biofilms Bt_Atch-Alch à 23° et 40° qui comme pour les biofilms d'Aq3 pourraient être indexés comme de la silice amorphe bien que le pic à 40° soit plutôt indicateur d'un silicate trioctaédrique mal cristallisé (**Fig. 14**). L'aragonite est le carbonate principal des biofilms issus d'Aq4 comme on peut le voir avec les pics [111] et [021] à respectivement 3,98 Å et 3,27 Å

(Fig. 14). A noter que l'on retrouve les signaux de feldspaths de type anorthite et quartz dans le biofilm d'Aq4 (Fig 14).

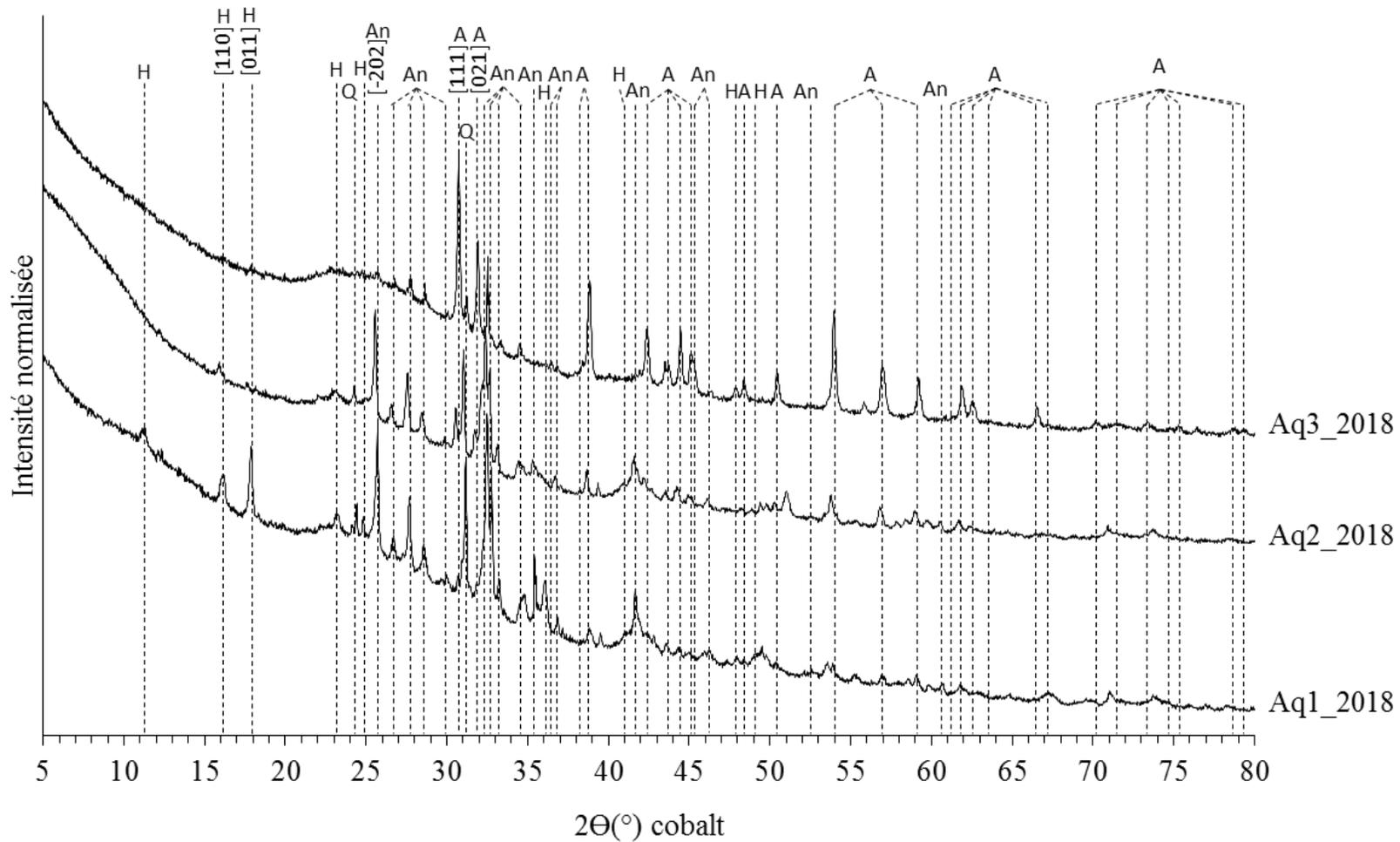


Figure 13. Diffractogrammes des biofilms séchés en 2018 des mésocosmes du Nord (Aq1_2018) et de l'ouest (Aq2_2018 et Aq3_2018) du lac d'Alchichica. A : aragonite ; An : Anorthite ; H : hydromagnésite ; Q : Quartz.

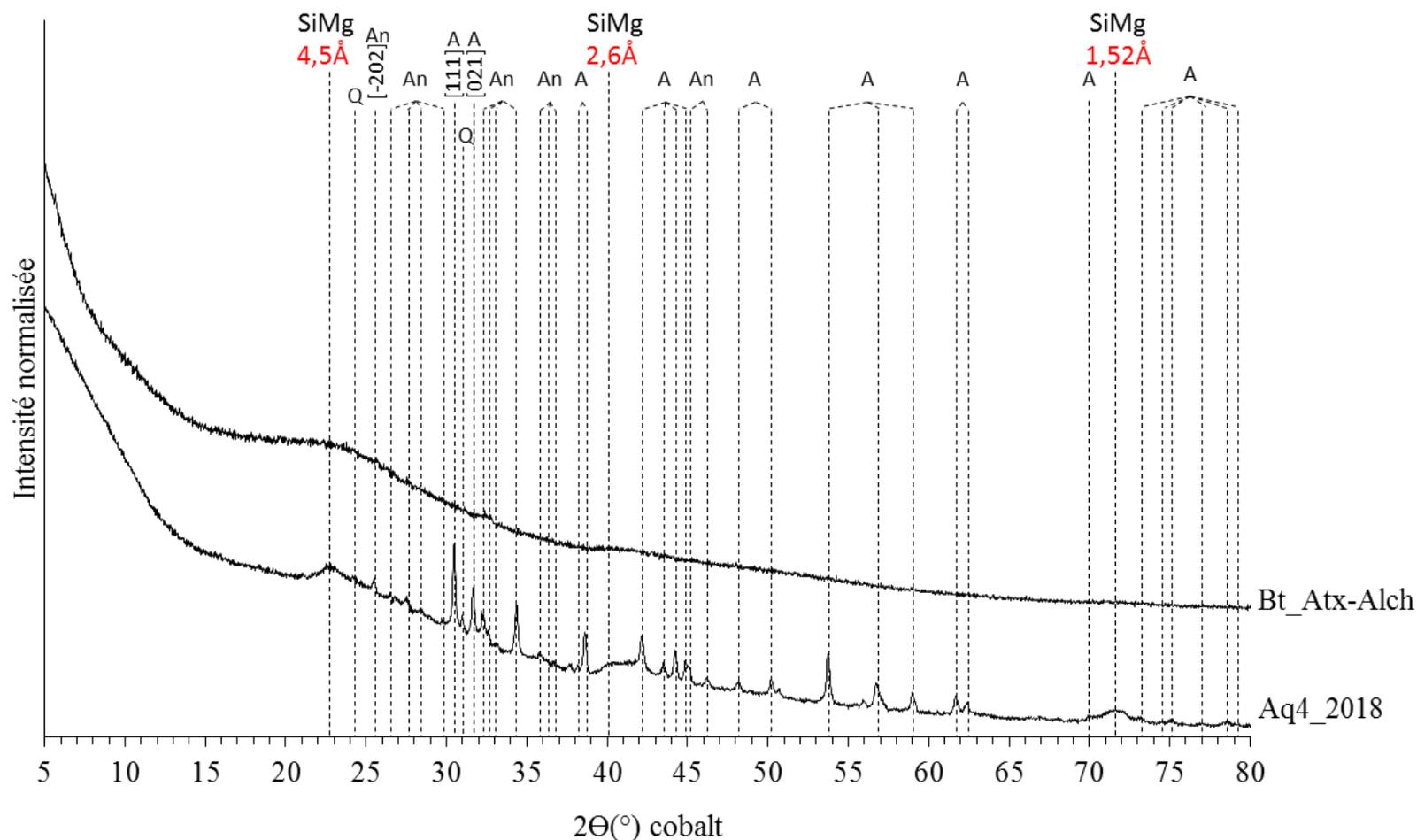


Figure 14. Diffractogrammes des biofilms séchés en 2018 des mésocosmes du lac La Preciosa (Aq4_2018) et de l'expérience mimant l'eau du lac d'Atexcac avec les biofilms du lac d'Alchichica (Bt_Atx-Alch). A : aragonite ; An : Anorthite ; Q : Quartz ; SiMg : smectite ou kérolyte.

Les résultats de FTIR sont cohérents avec la DRX. On retrouve la signature spectrale d'un silicate de magnésium hydraté trioctaédrique (kérolyte et/ou saponite) dans l'aquarium 4 et la bouteille Atx-Alch. En effet, la bande d'absorption de l'étirement $\text{Mg}_3\text{-OH}$ à 3680 cm^{-1} est caractéristique d'une phase de type talc, telle que la kérolyte, mais également de la saponite (Wilkins et Ito, 1967 ; Tosca et al., 2011 ; Tosca et Materson ; 2014) (**Fig. 15**). D'autres bandes d'absorption ont été indexées pour ces silicates de magnésium hydratés, notamment la vibration de translation OH à 452 et 465 cm^{-1} (Wilkins et Ito, 1967) (**Fig. 15**). La bande à 532 cm^{-1} concerne la vibration Mg-O octaédrique (Wilkins et Ito, 1967) (**Fig. 15**). La bande à 822 cm^{-1} que l'on retrouve dans le spectre de Bt_Atx-Alch est associée aux vibrations de la liaison apicale Al-O d'un tétraèdre AlO_4 que l'on retrouve dans la saponite (Farmer et Russel, 1964) (**Fig. 15**). Les bandes à 902 et

1023 cm^{-1} sont associées aux vibrations Si-O de la kéroélite (Farmer, 1974 ; Tosca et Materson, 2014 ; Zeyen et al., 2015) (**Fig. 15**). La vibration de libration des OH à 664 cm^{-1} , que l'on retrouve dans les deux spectres, est associée à la kéroélite. Cette vibration se déplace à 655 cm^{-1} dans le cas de la saponite mais on ne distingue pas un tel déplacement dans les spectres de l'aquarium 4 et de la bouteille Bt-Atx-Alch (**Fig. 15**).

Dans tous les spectres, de la silice amorphe issue des frustules de diatomées a été détectée. On peut détecter sa présence à l'aide des bandes d'absorption entre 450 et 470 cm^{-1} , à 800 cm^{-1} et 1098 cm^{-1} caractéristiques de la silice (Swann et Patwardhan, 2011 ; Musić et al., 2011) (**Fig. 15**). Dans le détail, la bande symétrique à 800 cm^{-1} est caractéristique des vibrations des liaisons siloxane entre atomes de Si et est notée $\nu_{\text{as-Si-O-Si}}$ (Swann et Patwardhan, 2011) (**Fig. 15**). La large bande observée à 1098 cm^{-1} correspond au mouvement antisymétrique des liaisons Si-O-Si (nommée $\nu_{\text{as-Si-O-Si}}$) (**Fig. 15**). Ce large pic comprend trois composantes : (i) un large épaulement centré sur 1115–1130 cm^{-1} , affecté au mode optique longitudinal (LO $\nu_{\text{as-Si-O-Si}}$) ; (ii) un pic fort centré à 1035-1045 cm^{-1} (mode optique transverse TO $\nu_{\text{as-Si-O-Si}}$) ; et (iii) une faible absorption à 950 cm^{-1} due aux vibrations d'étirement du silanol (Si-OH) que l'on n'observe pas sur les spectres des différents biofilms (Swann et Patwardhan, 2011) (**Fig. 15**). On peut voir deux autres bandes dans tous les spectres qui sont associées à l'eau dans les structures des silicates de magnésium et de la silice : correspondant à l'étirement des OH du groupement Si-OH et de l'eau à 3395 cm^{-1} et la vibration de flexion de l'eau vers 1650 cm^{-1} (Takamura et al., 1964) (**Fig. 15**).

Concernant les carbonates, on retrouve très clairement la signature spectrale de l'hydromagnésite dans les biofilms de l'aquarium 1 issue du Nord du lac d'Alchichica (**Fig. 15**). En effet, l'hydromagnésite a été caractérisée à l'aide de la bande d'absorption située à 595 cm^{-1} correspondant à la vibration Mg-O (à ne pas confondre avec celles des Mg-O octaédriques des silicates de magnésium à 530-540 cm^{-1}), une bande à 795 cm^{-1} et deux bandes situées à 856 et 886 cm^{-1} correspondant au mode de flexion hors-plan du groupe carbonate ($\nu_2\text{CO}_3$) (Farmer, 1974) (**Fig. 15**). On retrouve la vibration $\nu_3\text{CO}_3$ caractéristique de l'hydromagnésite à 1422, 1484 et 1522 cm^{-1} (**Fig. 15**). De plus, les bandes d'absorption observées à 3448, 3515, 3658 cm^{-1} ont été interprétées comme les vibrations des OH dans de l'hydromagnésite d'après (**Fig. 15**).

De l'aragonite a été détectée dans les aquariums 1, 2, 3 et 4 sur la base de pics situés à 700 et 713 cm^{-1} (flexion dans le plan, $\nu_4\text{CO}_3$) et à 843 et 855 cm^{-1} (flexion hors plan, $\nu_2\text{CO}_3$) (Carteret et al., 2013) (**Fig. 15**). Des étirements symétriques et asymétriques des carbonates dans

l'aragonite ont été observés à 1084 ($\nu_1\text{CO}_3$) et 1484 cm^{-1} ($\nu_3\text{CO}_3$) respectivement (Carteret et al., 2013) (**Fig. 15**).

Enfin, comme il s'agit de biofilms de très nombreuses bandes d'absorption ont été associées à la présence de matière organique dans tous les spectres IR (**Fig. 15**). En effet, dans l'ordre on peut trouver dans la région de 900 à 1200 cm^{-1} des bandes d'absorption associées aux vibrations C-O-C des polysaccharides qui sont généralement cachées par la présence des silicates (Wong et al., 1991 ; Zeroual et al., 1994 ; Giordano et al., 2001) (**Fig. 15**). Ensuite, de 1200 à 1270 cm^{-1} on trouve les étirements asymétriques P=O des groupes phosphodiester des acides nucléiques (ADN et ARN) et des phospholipides (Wong et al., 1991) (**Fig. 15**). Cette région peut également être dû à la présence de protéines phosphorylées et de polyphosphates (Kansiz et al., 1999) (**Fig. 15**). De plus, on peut retrouver les signaux des déformations symétriques CH_3 et CH_2 des protéines et des étirements symétriques C-O des groupes COO^- à environ 1384 cm^{-1} (Zeroual et al., 1994 ; Giordano et al., 2001) (**Fig. 15**). De la même manière à environ 1455 cm^{-1} , on retrouve cette fois-ci les déformations asymétriques CH_3 et CH_2 des protéines (Zeroual et al., 1994 ; Giordano et al., 2001) (**Fig. 15**). Les positions de ces déformations CH_3 et CH_2 et étirements C-O varient dans la littérature (Kansiz et al., 1999) (**Fig. 15**). Toujours concernant les protéines, on peut distinguer une bande d'absorption à environ 1540 cm^{-1} indexée comme des vibrations de déformation N-H des amides, généralement appelé la bande amide II, que l'on distingue très bien sur le spectre de Bt_Atx-Alch car il n'y a peu voire pas de carbonates (Nelson, 1991 ; Williams et Fleming, 1996 ; Coates, 2000). Cette bande peut également contenir des contributions des segments C=N (Kansiz et al., 1999) (**Fig. 15**). Puis, dans la même région de la vibration de flexion de l'eau à 1650 cm^{-1} , on retrouve également l'étirement C=O des amides I des protéines (Giordano et al., 2001) et les étirements C=C des composés oléfiniques et aromatiques qui peuvent contribuer à cette bande (Kansiz et al., 1999) (**Fig. 15**). D'autre part, à 1739 cm^{-1} on trouve les étirements C=O des fonctions ester provenant principalement des lipides et des acides gras (Giordano et al., 2001) (**Fig. 15**). Enfin, à 2852, 2929 et 2959 cm^{-1} nous détectons les étirements symétriques C-H des groupements méthylènes, les étirements asymétriques C-H des groupements méthylène et méthyle (Coates, 2000) (**Fig. 15**).

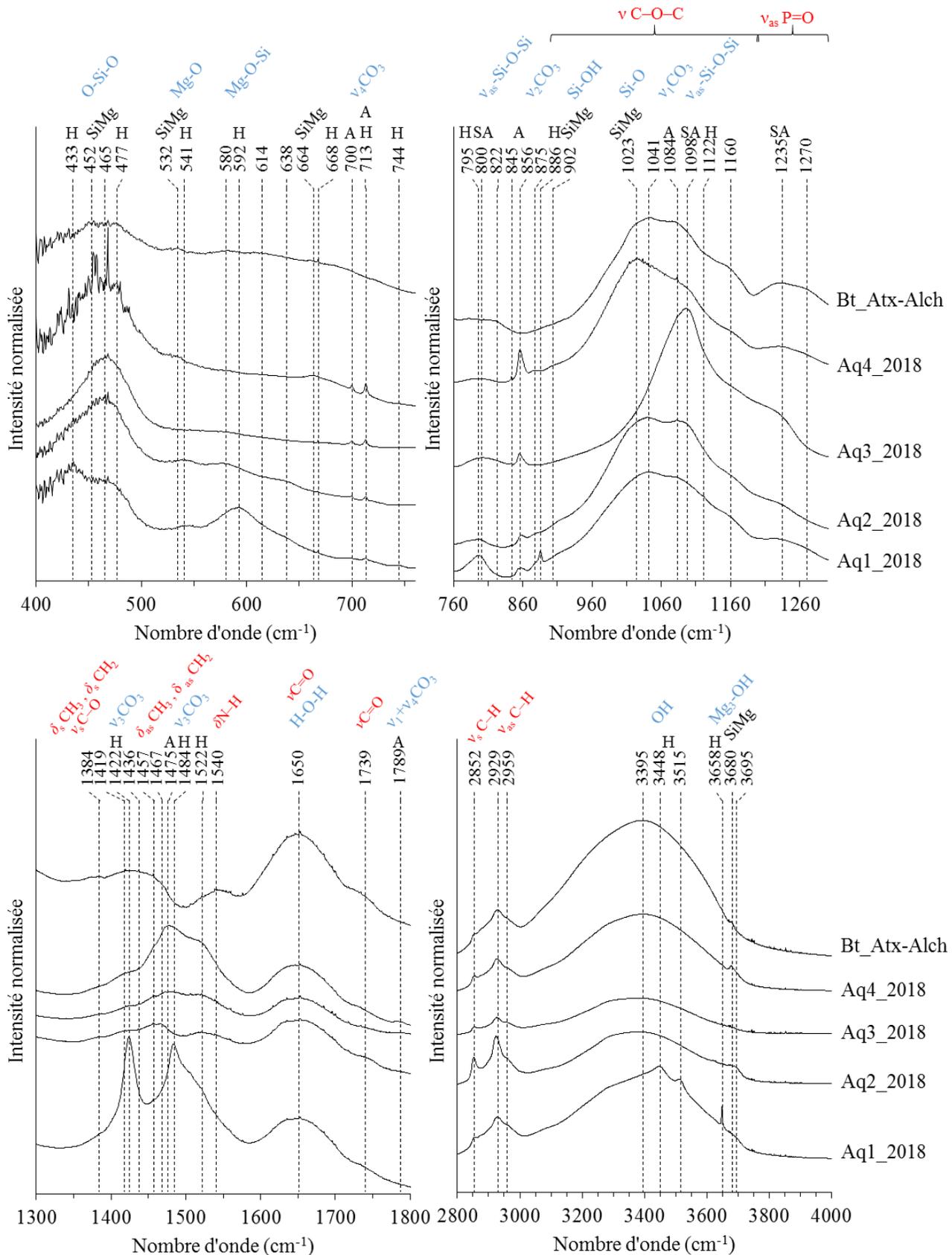


Figure 15. Spectres d'absorbance obtenues en FTIR des biofilms issues des différents mésocosmes

et expériences séchées en 2018. En bleu sont indiqués les mouvements moléculaires spécifiques aux minéraux retrouvés dans les biofilms. En rouge sont indiqués les mouvements moléculaires spécifiques à la partie biologique des biofilms. A : aragonite ; H : hydromagnésite ; SiMg : smectite et kérolite ; SA : silice amorphe.

3.4. Caractérisation par microscopie confocale à balayage laser, MEB-EDXS et MEB-FIB des assemblages minéraux/microorganismes.

À la suite des analyses chimiques et minéralogiques, nous avons étudié les biofilms de l'aquarium 4 et les biofilms de l'expérience Bt_Atx-Alch qui d'après les analyses minéralogiques en DRX et FTIR présentent des silicates de magnésium. Nous avons également étudié les biofilms de l'aquarium 1 dans lequel nous n'avons pas détecté de silicates de magnésium par DRX et FTIR. Dans un premier temps les biofilms de l'aquarium 4 ont été étudiés en corrélative CLSM/MEB. Les résultats de l'analyse corrélative nous ont permis de mettre en évidence des pelotes fécales, provenant d'un petit crustacé apparenté au sous-ordre des gammaridae. Ces granules mesurent de 100 à 300 μm de long sur 20 à 50 μm de large et sont retrouvés en abondance dans l'échantillon étudié (**Fig. 16A-C**). Ces pelotes fécales présentent en CLSM des spots fluoresçant dans le vert (à 517 nm). On peut retrouver des spots auto-fluoresçant dans le rouge (à 683 nm) que l'on interprète comme de la fluorescence provenant de pigments de type chlorophylliens. Ainsi la fluorescence dans le rouge peut être reliée aux différents micro-organismes photosynthétiques. Nous avons aussi repéré des spots jaunes (à 576 nm) provenant probablement de la fluorescence du pigment phycoérythrine et qui correspondrait donc à la présence de micro-organismes photosynthétiques contenant ce pigment. Nous avons pu systématiquement corréler les spots verts avec à la présence d'un précipité composé principalement de Si-Mg avec un peu d'Al, de Ca, P et S (réaliser sur 4 particules ; je présente un exemple dans la **figure 16**). Cependant, tous les précipités de Si-Mg ne fluoresçaient pas dans le vert.

Il a été testé différentes techniques de préparation d'échantillon adaptées à l'observation de matériel biologique hydraté, mais également pour mettre en évidence de manière fiable une association spatiale entre les silicates de magnésium hydratés et peu cristallisés et la matière organique. Par ailleurs, il n'y a pas que des pelotes fécales mais aussi des biofilms qui ne sont pas passés par le tube digestif des petits crustacés apparentés au sous-ordre des gammaridae où nous avons pu identifier des silicates de magnésium. Ainsi, des échantillons de biofilms ont été séchés

par contournement du point critique du CO₂ qui permet de conserver la structure 3D (Fig. 17 et 18).

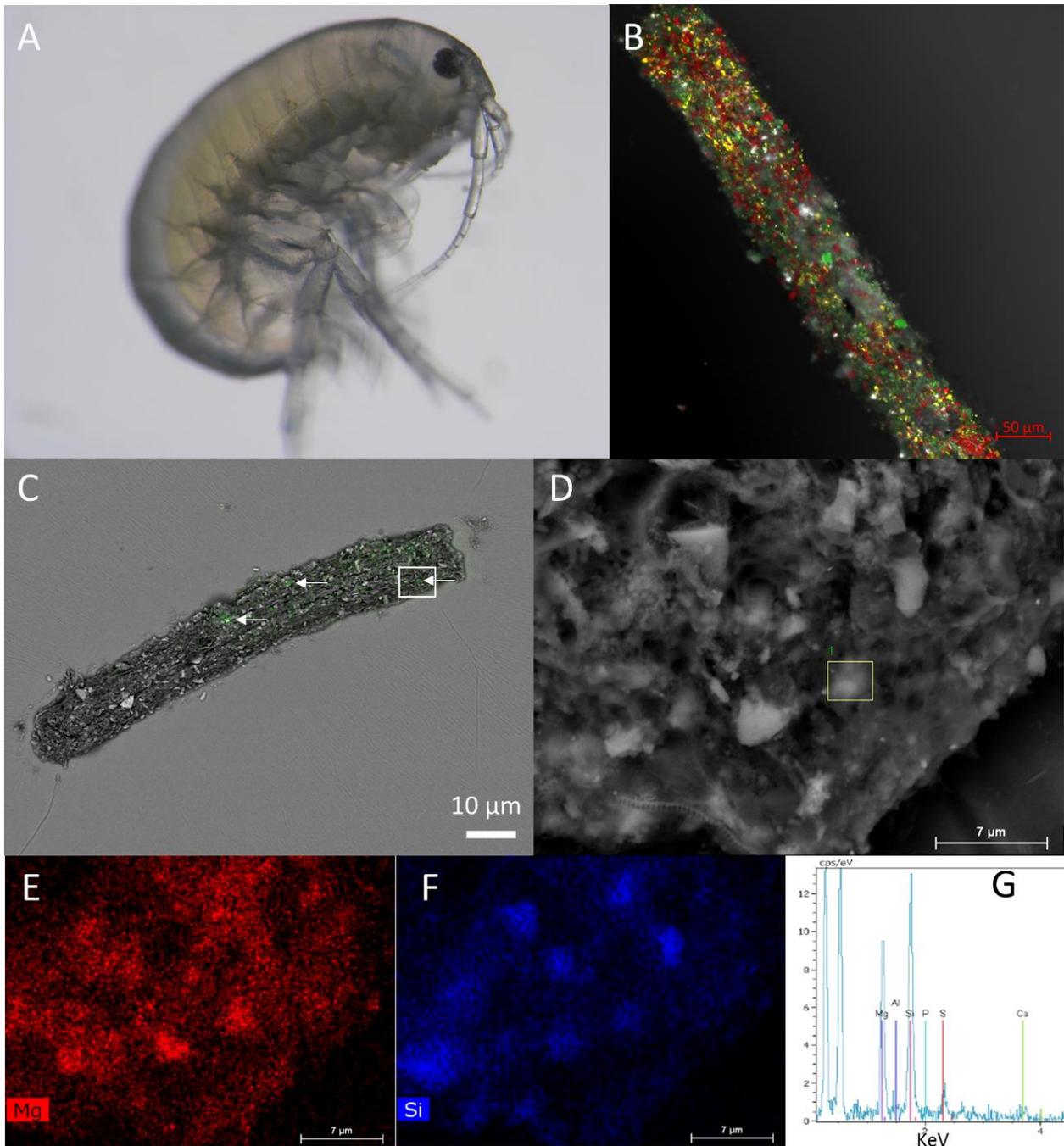


Figure 16. Analyse en corrélative confocal /MEB-EDXS de pelotes fécales provenant de « puce de sable » dans l'aquarium 4. Photographie d'une « puce de sable » du sous-ordre des gammaridae (A). Image hyperspectrale d'une pelote fécale obtenue avec une excitation à 488 nm avec en vert l'émission à 517 nm, en jaune l'émission à 576 nm et en rouge l'émission à 683 nm (B). Image corrélative confocal/MEB de l'émission à 517 nm d'une pelote fécale (C). Image MEB de la région

de la pelote fécale encadrée par le rectangle blanc associée à la carte de la chimie élémentaire du Mg (E) et Si (F) et du spectre EDXS de la particule encadrée par le rectangle jaune (G). Les flèches indiquent les particules auto-fluoresçant dans le vert à 517 nm.

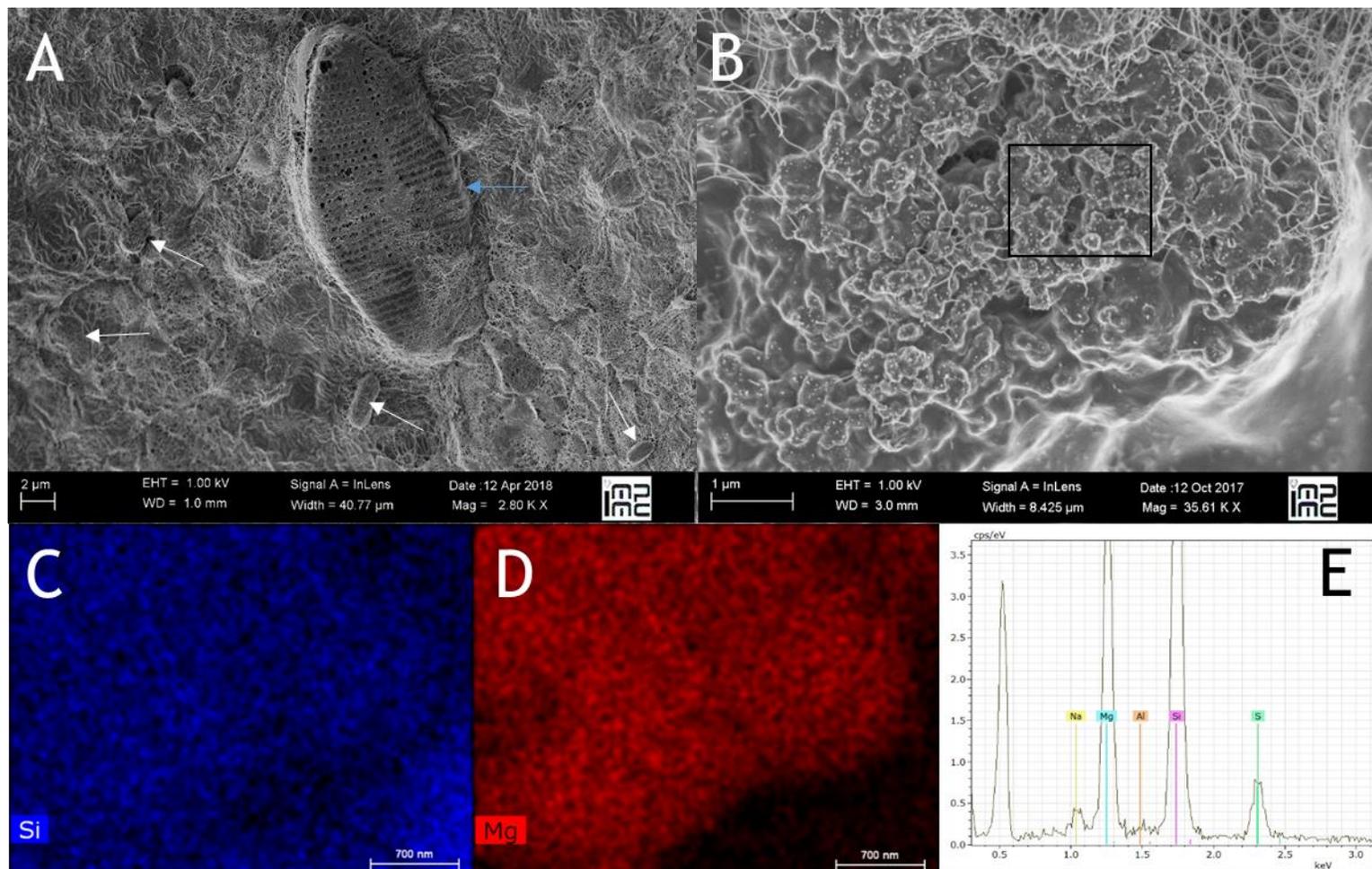


Figure 17. Observations en microscopie électronique à balayage du biofilm de Bt_Atx-Alch séchée par contournement du point critique. On peut voir une frustule de diatomée (flèche bleu) et une diversité de microorganismes (flèches blanches) dans un réseau d'EPS (A), mais également des précipités de silicates de magnésium (B). La cartographie de la chimie élémentaire du Si (C) et du Mg (D) et le spectre EDX de la zone délimitée par le carré noir (E).

Les observations en microscopie électronique nous ont permis de mettre en évidence une grande diversité de microorganismes avec différentes cellules et diatomées dans les biofilms de l'aquarium 4 et de l'expérience Bt_Atx-Alch (**Fig. 17A et 18A**). Dans les biofilms de Bt_Atx-Alch, les analyses montrent la présence de silicates de magnésium avec du Na, S et Al (**Fig. 17B-E**). On observe également un réseau composé de nombreuse « fils » entrecroisés d'une dizaine de nanomètres que l'on interprète comme des EPS. On peut voir que ces silicates de magnésium sont

en association très étroites avec différents acteurs biologiques et notamment ces EPS (**Fig. 17B-E**). Dans l'aquarium 4, on observe une cellule allongée en lien avec des granules de silicates de magnésium avec du Na, Al, S, Ca et un peu de K (**Fig. 17B-E**). Dans les deux systèmes, ces silicates de magnésium ont une morphologie assez particulière. En effet, il s'agirait de sous-unités d'environ 200 à 600 nm de forme ronde, agglutinées ensemble pour former un agglomérat granuleux (**Fig. 17B et 18B**).

A contrario, aucune phase de silicate de magnésium n'a été retrouvée dans l'échantillon de biofilm de l'aquarium 1.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé au FIB des lamelles de verre colonisées par des biofilms de l'aquarium 4 (**Fig. 18F et G**). A l'aide du FIB nous avons pu avoir accès à l'intérieur du biofilm afin de déterminer les potentiels acteurs biologiques en association avec les silicates de magnésium. Les observations montrent que le biofilm est poreux. En outre, les porosités sont arrondies de l'ordre de 1 μm que l'on a interprété comme étant des cellules. On peut voir à la périphérie de ces cellules des mailles qui visuellement donnent des porosités plus fines. L'ensemble de ces mailles est interprété comme étant des EPS permettant d'avoir une cohésion cellulaire. Les analyses montrent que ces cellules d'environ 1 μm produisant une matrice organique sous forme d'EPS où l'on retrouve la présence de silicates de magnésium (**Fig. 18F et G**). Ces observations montrent encore une fois que les EPS sont un point de nucléation pour la formation de silicates de magnésium.

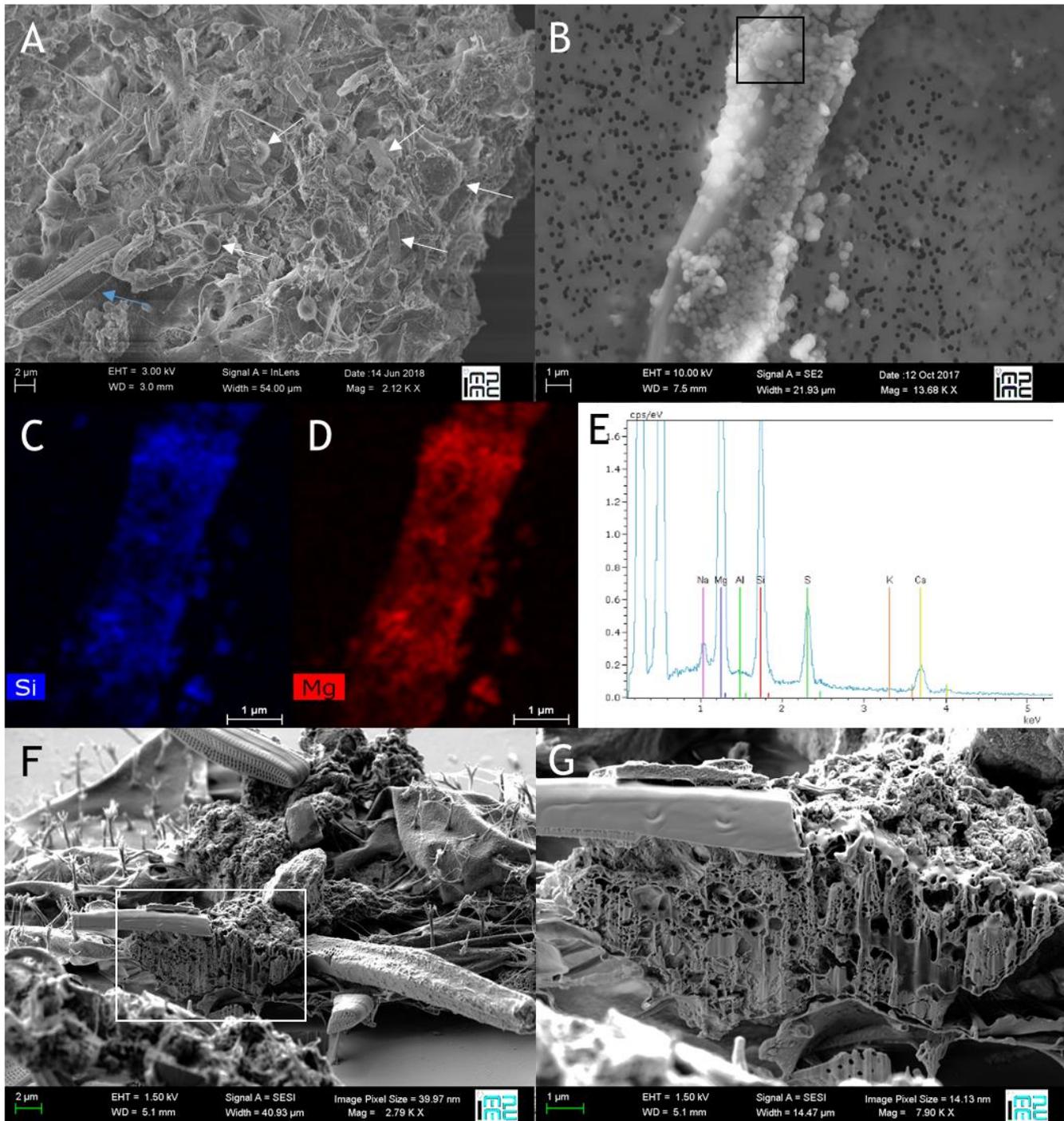


Figure 18. Observations en microscopie électronique à balayage d'un échantillon de biofilm séché par contournement du point critique et des particules en suspension de l'aquarium 4. On peut voir une grande diversité de microorganismes (flèche blanche), avec notamment des diatomées (flèche bleu) (A) et une cellule complètement recouverte de silicates de magnésium de forme ronde mesurant de 200 à 600 nm (B). La cartographie de la chimie élémentaire du Si (C) et du Mg (D) et le spectre EDX de la zone délimitée par le carré noir (E). Image d'un biofilm obtenu en FIB, le rectangle indique l'objet qui a été pulvérisé par le faisceau d'ions Ga (F). On peut voir que l'objet est poreux et présente des trous d'environ 1 μ m qui pourrait être des cellules (G).

Autre fait intéressant, nous avons également mis en évidence des cellules mesurant de l'ordre de 30 μm de long avec des silicates de magnésium intracellulaires (**Fig. 19A-E**). Le silicate présente une certaine porosité à différent endroit et une surface granuleuse. Par ailleurs nous ne savons pas si cette cellule est *post mortem* ou *in vivo*.

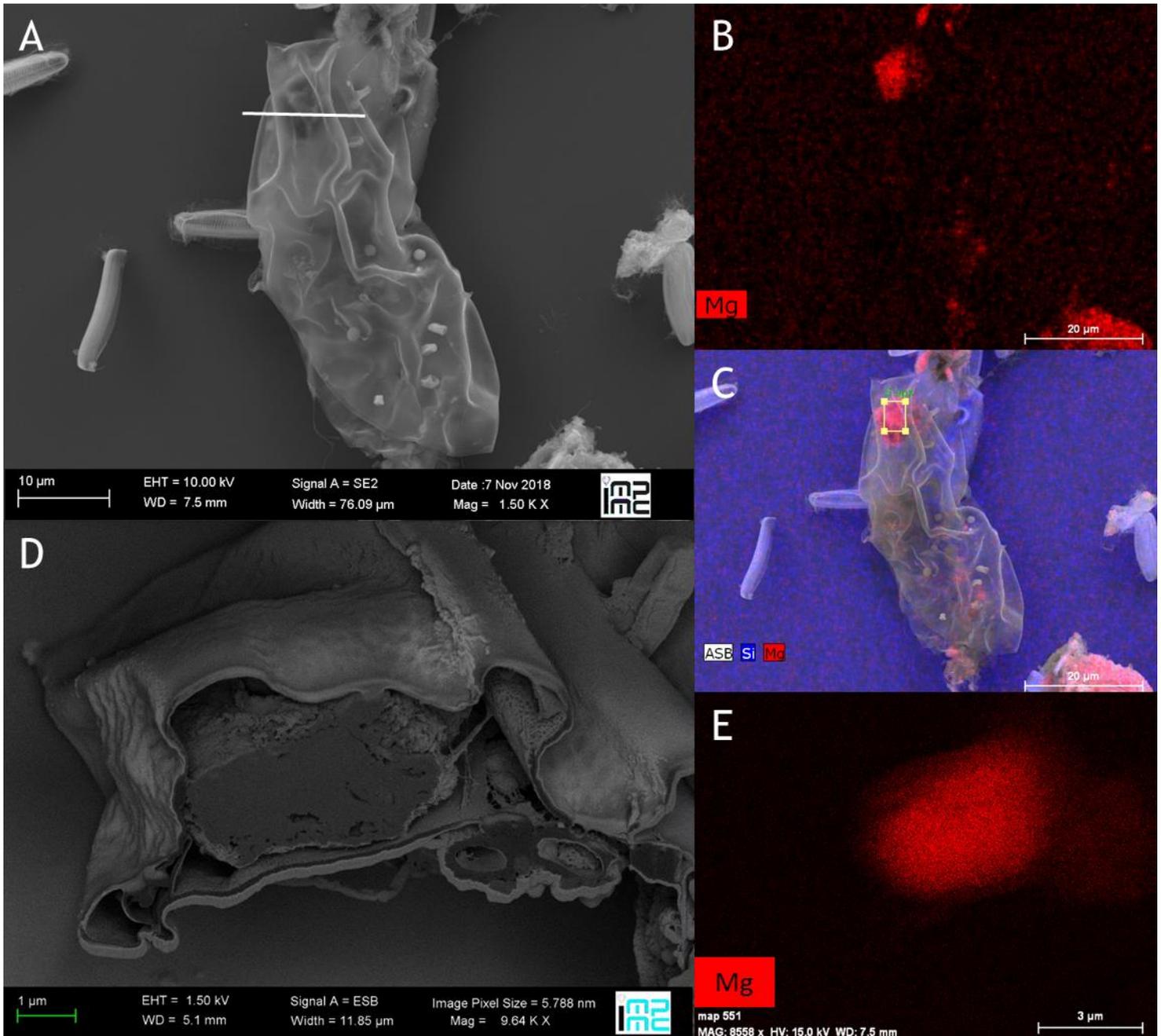


Figure 19. Observation en microscopie électronique à balayage d'une cellule sur une lamelle en verre avec un silicate de magnésium intracellulaire. Image obtenue en MEB de la cellule d'environ 30 μm , la ligne indique la position de la coupe en FIB (A) associé la cartographie du magnésium (B) et de l'overlay du Si, Mg et de l'image en ASB avec un rectangle jaune indiquant le silicate de

magnésium (C). Image obtenue en FIB après la découpe où l'on voit le silicate de magnésium intracellulaire (D), associé la cartographie du magnésium (E).

4. Discussion

4.1. Paramètres géochimiques de formation des silicates de magnésium dans les mésocosmes/expériences des lacs alcalins mexicains

Des études précédentes ont mis en évidence la présence en grande quantité d'une phase mal cristallisée et hydratée de kérolite dans les microbialites vivantes des lacs alcalins modernes de La Preciosa, Atexcac, Tecuitlapa, Joya de Yuriria, Alberca, los Espinos, La Alberca et de certaines du Nord du lac d'Alchichica (Saghai et al., 2015 ; Zeyen et al., 2015 ; 2017) ou de stévensite dans les thrombolites modernes du lac Clifton en Australie (Burne et al., 2014). La kérolite a également été rapportée dans les tapis microbiens poussant dans les eaux douces peu alcalines ($\text{pH} \approx 8$) des grottes de la mer basaltique sur l'île de Kauai (Leveillé et al., 2000a ; 2002). D'autres études sur des tapis microbiens provenant des marges du Grand Lac Salé, Utah au Etats-Unis qui est un environnement hypersalin ont mis en évidence la production de silicate de magnésium hydraté et peu cristallisé qui serait un précurseur de type stévensite/sépiolite (Pace et al., 2016 ; 2018). Ici nous avons mis en évidence une phase de silicate de magnésium très hydratée et peu cristallisée qui s'apparenterait à un type de kérolite et/ou de saponite, dans les biofilms du mésocosme de La Preciosa et dans l'expérience mimant les conditions physico-chimique d'Atexcac. Ces silicates-Mg ont une morphologie de forme ronde de 200 à 600 nm qui ont également été décrites dans les tapis microbiens du Grand Lac Salé (Pace et al., 2016).

Il semble qu'en présence d'un milieu proche de celui du lac d'Atexcac des silicates de magnésium puissent se développer dans les biofilms issus du mésocosmes du nord du lac d'Alchichica où l'on ne détecte pas de Si-Mg. D'après les données chimiques de l'aquarium 4 et de l'expérience Bt_Atx-Alch, ces deux systèmes forment un groupe détaché des autres aquariums dû à leur forte concentration en Si. Ainsi la concentration en Si serait un des paramètres clé de la formation des silicates de magnésium. Il convient de discuter de la source de Si de nos mésocosmes. On sait que les microbialites du lac de La Preciosa et d'Atexcac sont composées de kérolite, un talc hydraté alors qu'il n'y en a pas ou très peu dans les microbialites du Nord et de l'Ouest du lac d'Alchichica (Zeyen et al., 2015 ; Saghai et al. 2015). Zeyen et al. (2017) à la suite de l'étude géochimique des eaux de différents lacs alcalins mexicains ont montré que les microbialites des

lacs Quechulac et Patzcuaro contiennent des quantités mineures de phases de silicatées de magnésienne, avec des concentrations d'acide ortho-silicique dans les lacs de 0,23 et 0,37 mM respectivement. Ils en concluent que les lacs dont les concentrations d'acide ortho-silicique sont inférieures à 0,16 mM ne montrent pas de phases authigéniques de silicate de magnésium associées à des microbialites (Alchichica, Aljojuca). De plus, il a été proposé que la concentration en silice pourrait être un meilleur indicateur dans ces systèmes que la sursaturation en kérolite, car il existe une compétition pour le Mg, entre d'un côté les silicates de Mg et de l'autre les carbonates de Mg (Zeyen et al., 2017). Cela peut également expliquer pourquoi on ne détecte pas de Si-Mg dans les mésocosmes d'Alchichica du Nord et de l'Ouest alors que l'on détecte de l'hydromagnésite. Par conséquent, il est fortement probable que la partie minérale qui a été dissoute dans les aquariums soit à l'origine des teneurs en Si dans les mésocosmes qui a permis ou non d'avoir un milieu sursaturé par rapport au quartz. Cette sursaturation par rapport au quartz que l'on n'observe pas dans les mésocosme d'Alchichica a permis la formation de silicates de magnésium. Ces résultats montrent l'importance de la géochimie de l'environnement et notamment de sa teneur en Si par rapport à la composition des communautés microbiennes qui est relativement moins importante pour la formation des silicates de magnésium. Par conséquent dans nos systèmes

Le pH de la bouteille Atx-Alch a été mesuré à 7,83 ce qui est en dessous du pH de 8,6 permettant la déprotonation de l'acide orthosilicique étant la forme majoritaire à ce pH et donc la complexation en Si-Mg (Tosca et al., 2011). De plus, des silicates de magnésium peu cristallisés et hydratés ont été retrouvés dans des lacs dont le pH était inférieur à celui de 8,6 (Burne et al., 2014 ; Pace et al., 2016). D'après ces auteurs le pH de l'environnement contenant les microbialites ne semble pas être un indicateur essentiel quant à la précipitation de silicate magnésien (Burne et al., 2014 ; Pace et al., 2016). Il a été proposé que dans les biofilms, certaines activités microbiennes permettaient d'augmenter le pH localement, dépassant ainsi le seuil de 8,6 pour favoriser la précipitation des silicates (Leveillé et al., 2000b ; 2002 ; Pace et al., 2016). Ainsi, concernant le pH, la formation authigénique de Si-Mg peut se produire dans un environnement où les pH sont inférieurs à 8,6 tant que l'activité microbienne offre des micro-environnements permettant la déprotonation de l'acide orthosilicique. C'est pourquoi, nous observons des silicates de magnésium dans le système Bt_Atch-Alch car il doit y avoir un pH au-dessus de 8,6 dans le micro-environnement du biofilm.

4.2. Rôle du vivant dans la formation des phases silicatées magnésiennes

4.2.1. Capacité des microorganismes photosynthétiques à induire la formation de silicates de magnésium

Nous avons étudié la formation de silicate de magnésium dans des systèmes biogéniques. Ainsi, nous allons ici discuter de potentiels acteurs de cette bioprécipitation de phase Si-Mg hydratée et peu cristallisée qui pourrait influencer les paramètres chimiques de précipitation de silicate magnésien.

Nous avons vu que la partie minérale pouvait être à l'origine de la teneur en Si du milieu. Cependant dans ces systèmes biogéniques l'apport en Si pourrait également venir des diatomées. Les analyses des lamelles de verre colonisées par les micro-organismes de l'aquarium 4 présentent de nombreuses diatomées qui semblent en outre être les premiers colonisateurs. Cependant, on ne voit pas précisément d'association étroite entre des diatomées ou les EPS qu'elles produisent et les silicates de magnésium, bien qu'elles soient retrouvées dans les biofilms. *A contrario*, l'analyse des biofilms de l'aquarium 1 montre très peu de présence de diatomées par rapport à l'aquarium 4. En parallèle, on détecte beaucoup de silicates de magnésium dans l'aquarium 4 alors que ce n'est pas le cas dans l'aquarium 1. Lorsque l'on ajoute une concentration supérieure à 0,16 mM d' H_4SiO_4 , étant la concentration au-dessus de laquelle la formation de silicate de magnésium a été observée dans les microbialites des lacs alcalins mexicain (Zeyen et al., 2017), à l'environnement du biofilm de l'aquarium 1, mimée par l'expérience Bt_Atx-Alch, on voit très bien que le biofilm produit des silicates de magnésium. Les premiers acteurs seraient donc indirectement les frustules de diatomées qui apporterait localement l'activité en H_4SiO_4 nécessaire à la précipitation de silicates de magnésium en se dissolvant lorsque le milieu est sous saturé par rapport à la silice amorphe (Burne et al., 2014 ; Pace et al., 2016 ; 2018). Le métagénome des biofilms du Nord (AL-N) et de l'Ouest (AL-W) du lac d'Alchichica montre que la diversité des eucaryotes couvre une grande variété de taxa, mais est dominée numériquement par les taxa photosynthétiques qui représentaient entre 75 et 95% des séquences eucaryotes microbiennes (Saghai et al., 2015). Cependant, alors que les métagénomés des eucaryotes d'AL-W sont dominés par les séquences de diatomées (près de 90% des séquences eucaryotes microbiennes), ceux d'AL-N sont tous dominés par les séquences d'algues vertes (Saghai et al., 2015). Les auteurs proposent que cette différence radicale entre les deux sites ne semble pas être liée à la composition minérale du substrat mais peut-

être à l'hydrochimie locale, qui semble localement influencée par l'activité de ruissellement et peut-être aussi par des décharges printanières occasionnelles dans la partie la plus escarpée du cratère à l'ouest du lac. En effet, l'analyse chimique des eaux de ruissellement a révélé beaucoup moins de soluté dissous (668 mg/L) par rapport à l'eau du lac (environ 8 800 mg/L). Cependant dans ces eaux de ruissellement il y a une concentration en Si plus importante. La concentration en H_4SiO_4 de l'eau de ruissellement était en moyenne 40 fois plus concentrée (694 $\mu\text{M/L}$) que le reste du lac (Kazmierczak et al., 2011). Cette entrée locale de Si est probablement déterminante pour la dominance des diatomées dans l'Ouest du lac. Cependant dans notre étude, nous n'avons pas d'apport extérieur en Si, mais les frustules de diatomées peuvent apporter le Si. Ainsi comme le montrent Saghai et al., (2015), il y a peu de diatomées dans la diversité des eucaryotes des biofilms du Nord du lac d'Alchichica dont la communauté microbienne est représentée par l'aquarium 1, limitant donc la formation de silicate de magnésium dans notre mésocosme.

De plus, les tests de biominéralisation nous ont montré que certaines cyanobactéries sont capables d'induire la précipitation. Une cellule allongée a également été observée et présentée à sa surface des silicates de magnésium de forme ronde dans les échantillons de l'aquarium 4. Ainsi, les micro-organismes et notamment les cyanobactéries seraient capables d'induire la formation de silicates de magnésium grâce à leur métabolisme. D'après les analyses métagénomiques des biofilms du lac d'Alchichica, les eucaryotes composaient une fraction relativement mineure (Saghai et al., 2015). De plus, les auteurs ont montré que les cyanobactéries, les eucaryotes photosynthétiques, les photosynthétiseurs anoxygéniques et les sulfato-réductrices, possédant tous un métabolisme faisant augmenter le pH, étaient également très abondants (Saghai et al., 2015). Enfin, des analyses statistiques multivariées ont permis de montrer une forte corrélation positive entre les cyanobactéries du genre *Pleurocapsales* et *Chroococcales*, et la formation d'aragonite (Gérard et al., 2013 ; Saghai et al., 2015). Ainsi, ces genres de cyanobactéries pourraient être également à l'origine de la bioprécipitation de silicates de magnésium. Bien que la composition microbienne du lac de La Preciosa ne soit pas connue il est possible que ce même genre de communauté soit retrouvée en abondance au niveau des biofilms.

Enfin, il a été mis en évidence, par des observations en microscopie électronique à balayage d'échantillons d'eau filtrée sur des membranes GTTP du lac alcalin de La Preciosa, des cyanobactéries qui forment des anneaux micrométriques composés de particules de silicates de Mg, Fe et Mn de quelques centaines de nanomètres au niveau de leur septum de division (non publié).

Ces anneaux sont retrouvés dans les sédiments de ce lac (chapitre II). Il s'agit d'un patron de biominéralisation inconnu à ce jour. Cette découverte montre que des micro-organismes sont capables de biominéraliser des silicates. Les observations en microscopie des biofilms de l'aquariums n'ont pas montré la présence de ces anneaux ou de ces cellules. Des cellules de cyanobactéries similaires ont été décrites précédemment dans des lacs de Bratislava (Slovaquie) et identifiées comme étant des *Cyanocatena planctonica* (Hindák, 1983 ; Hindák et Hindáková, 2003), mais également dans des étangs à l'extrémité nord et dans le sud de Harz (Allemagne) (Heynig, 1979 ; Heynig et Krienitz, 1987). Il n'y a pas eu d'analyses chimiques des anneaux réalisées par ces auteurs mais ils décrivent des anneaux bruns et associent cette couleur à la présence de fer (Hindák, 1983 ; Heynig, 1979 ; Heynig et Krienitz, 1987). De plus, la chimie de l'eau des lacs et étangs où ils ont retrouvé ces cyanobactéries n'est que très peu décrite. Concernant les lacs de Bratislava, il s'agit de fosses remplies d'eau souterraine qui ont été créées par l'extraction de gravier et de sable du gisement alluvial des rivières. Ces lacs sont peu profonds avec des eaux plutôt neutres à légèrement alcalin, et initialement oligotrophes mais qui sont maintenant dans des conditions eutrophes (Hindák et Hindáková, 2003). Heynig (1987) indique que l'étang au sud de Harz a un pH de 8,3 et $[KMnO_4^-]$ de 27 mg/L. Ainsi, ces cyanobactéries formant des anneaux de Si, Mg, Fe et Mn semblent être retrouvées dans des environnements d'eau douce de pH neutre à alcalin. D'autre part, nous avons potentiellement montré un autre micro-organisme produisant des silicates de magnésium mais cette fois-ci intracellulairement. La composition chimique précise de ce silicate de magnésium n'est pas encore connue. De plus, je n'ai retrouvé que très peu de ces cellules lors de l'observation de la lamelle de verre colonisée (3 exactement) et je n'ai pas pu déterminer avec précision s'il s'agissait d'un microorganisme *post mortem* ou *in vivo*. Cependant, on voit bien qu'il y a des micro-organismes biominéralisant des silicates de magnésium et que la diversité microbienne produisant des silicates de magnésium est encore à découvrir.

4.2.2. La minéralisation biologiquement influencée des silicates de magnésium dans les biofilms des mésocosmes des lacs alcalins mexicains

Le dernier acteur que nous avons mis en évidence sont les EPS structurant les biofilms, mais aussi la paroi de certains microorganismes. Dans certains environnements naturels modernes, les argiles authigènes sont étroitement associées aux cellules microbiennes et aux biofilms (par exemple, Souza-Egipsy et al., 2005 ; Leveille et al., 2007 ; Pace et al., 2016, 2018). Ces argiles

pourraient être le résultat d'un processus de minéralisation biologiquement influencé. En effet, les microorganismes fournissent des surfaces abaissant l'énergie d'activation de la nucléation (effet template, Giuffre et al., 2013) et donc abaissant la solubilité apparente de telles phases. Ces surfaces de nucléations pourraient être la surface de cellules et/ou les substances polymériques extracellulaires (EPS) formées en abondance dans les biofilms (Léveillé et al., 2002 ; Souza-Egipsy et al., 2005 ; Bontognali et al., 2010).

De plus, Bontognali et al. (2014) ont réalisé des expériences de précipitation en laboratoire avec des molécules organiques généralement produites par les microbes et susceptibles de favoriser la nucléation des minéraux dans les biofilms. Ils ont montré la formation d'une smectite de type stévensite en présence d'acide succinique. Dans notre cas, le silicate de magnésium serait de type kérolite et/ou saponite. L'acide succinique est généralement produit par des micro-organismes aérobies en tant que produit intermédiaire du cycle de l'acide tricarboxylique. Ce processus de dégradation biologique pourrait favoriser la formation de smectites authigéniques dans une grande variété d'environnements naturels. Dans notre cas, le métabolisme des cellules en lien étroit avec les silicates de magnésium n'a pas été déterminé. Cependant, il est possible que les molécules organiques produites par les micro-organismes dirigent la composition et la nature de la phase de silicate de magnésium.

De plus, nous avons remarqué que les silicates de magnésium que l'on retrouve dans les biofilms de l'aquarium 4 et l'expérience Bt_Atx-Alch étaient relativement ronds et agglutinés ensemble formant une structure granuleuse. Les smectites de type stévensite précipitées dans l'expérience de Bontognali et al. (2014) et qui ont été observés en MEB et MET étaient également de forme ronde et agglutiné pour former une structure granuleuse. Cette structure a également été retrouvée dans les biofilms composant les microbialites du grand lac salé (Utah, Usa) (Pace et al., 2016). On retrouve également des sous unités ronds formant les anneaux micrométriques des cyanobactéries retrouvées dans le lac de La Preciosa. Il semble qu'en présence de micro-organismes et donc de site de nucléation biogénique la structure des phases de silicates de magnésium soit biologiquement influencée.

4.2.3. Synthèse

A l'aide des expériences que nous avons réalisées dans cette partie et des connaissances de la littérature nous pouvons présenter les processus de biominéralisation biologiquement influencée dans le cas des environnements alcalins (**Fig. 20**). Cela permet de visualiser le rôle de certains micro-organismes constituant les biofilms dans la formation de silicate de magnésium, mais également de mettre en relation les différents paramètres chimiques intervenant dans cette précipitation.

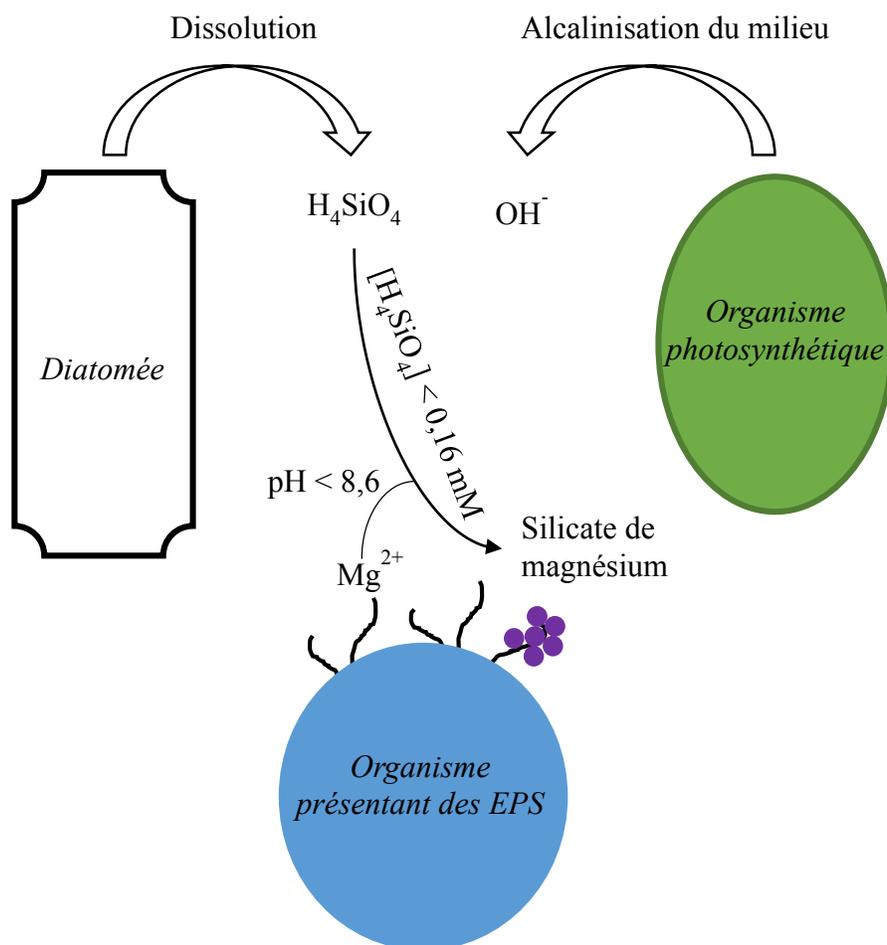


Figure 20. Représentation schématique des processus de biominéralisation biologiquement influencée de silicate de magnésium opérant dans un biofilm d'environnement alcalin. Une fois que la diatomée est morte, sa frustule de silice biogénique se dissout dans le microenvironnement du biofilm. Les organismes photosynthétiques alcalinisent le milieu par leur activité métabolique. Le pH atteint un pH supérieur à 8,6, permettant la déprotonation de H_4SiO_4 . Certains des ions Mg^{2+} sont adsorbés au niveau des EPS des organismes produisant des EPS. Lorsque la concentration de H_4SiO_4 est suffisante ($< 0,16 \text{ mM}$) alors il y a précipitation de silicate de magnésium au niveau des EPS. Les ronds violets représentent les silicates de magnésium.

Dans un premier temps, une fois que les diatomées meurent, leurs frustules de silice se dissolvent dans le microenvironnement du biofilm. Ceci est bien entendu possible dans une solution qui est préalablement sous-saturée par rapport à la silice biogénique. La conséquence de cette dissolution est l'augmentation de la concentration locale en H_4SiO_4 . Les micro-organismes photosynthétiques augmentent le pH par leur activité métabolique en relargage des ions OH^- dans le biofilm. Les molécules organiques composant les EPS adsorbent les Mg^{2+} . Dans un deuxième temps, la concentration en H_4SiO_4 atteint une concentration dans le microenvironnement supérieure à 0,16 mM. Parallèlement, le pH augmente à 8,6 permettant la déprotonation de H_4SiO_4 . Concernant les ions Mg^{2+} , ils sont relargués dans le microenvironnement par dégradation de la matière organique y compris les EPS par les micro-organismes hétérotrophes. Dans un troisième temps, une fois que toutes les conditions sont réunies, pH, $[\text{H}_4\text{SiO}_4]$, $[\text{Mg}^{2+}]$ alors la précipitation peut thermodynamiquement avoir lieu au niveau des EPS composant le biofilm.

4.3. Autofluorescence de la référence de kérolite

Concernant les analyse corrélative CLSM/MEB nous avons également observé une autofluorescence maximale à 517 nm lorsqu'on excite la référence de kérolite à 488 nm et certains silicates de magnésium dans les biofilms de l'aquarium 4. On trouve peu de littérature à ce sujet. Cependant des auteurs ont synthétisé des nanofils et des nanoanneaux de silice interconnectée sur un papier graphite par une méthode de dépôt chimique en phase vapeur catalytique typique, utilisant des poudres de silicium et de noir de carbone comme matières premières (Min et al., 2017). En utilisant la spectroscopie photoélectronique à rayons X à température ambiante, ils ont montré que les nanostructures de silice émettaient une forte lumière bleue à 460 nm. Ils ont interprété cette émission à une combinaison de lacunes en oxygène ($\equiv\text{Si}-\text{Si}\equiv$) et des excitons auto-emballés (Min et al., 2017). La fluorescence dans le vert observé chez les silicates de magnésium pourrait-elle être due à des processus comparables ? Pour cela il serait intéressant d'étudier les propriétés photoluminescentes à l'aide de la spectroscopie photoélectronique à rayon X de la référence de référence kérolite, de d'autres références de silicates de magnésium et enfin de silicates de magnésium naturelles. Cela permettrait de déterminer si l'autofluorescence observée est un cas particulier de cette référence ou si ce phénomène est retrouvé de façon plus large chez les silicates de magnésium.

5. Conclusion et Perspectives

En conclusion, nous avons réalisé des expériences de biominéralisation en milieu contrôlé non tamponné par 2 souches de cyanobactéries poussant à 30 °C ou 45 °C. Nous avons montré que *Synechocystis* sp. PCC 6803 poussant à 30 °C était capable d'induire la précipitation de silicate de magnésium sur une période d'un mois. Cette précipitation est dû à la capacité de cette souche de cyanobactérie à augmenter fortement le pH du milieu. Ainsi, nous avons proposé que le métabolisme photosynthétique est capable comme pour les carbonates de calcium d'induire la formation de silicate de magnésium.

Plusieurs perspectives à ces travaux sont possibles. En effet, la précipitation de silicate de magnésium était relativement faible. La faible quantité de silicate de magnésium ne nous a pas permis de détecter ces phases en DRX et FTIR afin de caractériser la phase produite. A l'avenir il faudra augmenter les concentrations de H_4SiO_4 mais également de Mg^{2+} dans le milieu de biominéralisation afin d'être sursaturé par rapport aux silicates de magnésium ou avoir un apport régulier de ces deux éléments chimiques. L'augmentation des concentrations ou l'apport régulier permettrait de bioprécipiter une plus grande quantité de silicate de magnésium. Une fois l'échantillon séché, il sera potentiellement possible de détecter ces phases. De plus, il serait intéressant de déterminer si la formation de silicate de magnésium a un impact sur la viabilité cellulaire mais également si la phase évolue dans le temps. Ainsi une autre expérience qui pourrait être réalisée serait, une fois les conditions optimales de précipitation trouvées, de laisser la culture vieillir. A l'aide du marquage live/dead permettant de déterminer la viabilité cellulaire et du confocal à balayage laser d'évaluer la viabilité des cellules au cours du temps. En outre, le produit de précipitation pourra être analysé et il sera possible de déterminer si la phase évolue dans le temps afin de comprendre le devenir des phases de silicate de magnésium formées dans l'environnement et notamment dans les biofilms. Enfin, la capacité de nucléation des souches de cyanobactéries utilisées dans cette étude n'est pas très claire. En effet, il est possible que la forte augmentation de Ph couplée à des sites de nucléation favorables à la précipitation de silicate de magnésium ai permis à *Synechocystis* sp. PCC 6803 de former cette phase contrairement à *T. elongatus* BP-1. Ces deux souches de cyanobactéries sont très bien connues et des mutant EPS- existent (Jittawuttipoka et al., 2013). Il serait possible d'incuber ces souches de cyanobactéries dans des milieux de biominéralisation tamponnés afin de déterminer à quel point elles sont capables d'apporter des sites de nucléation favorables à la précipitation de silicate de magnésium.

Dans ce chapitre nous avons également pu travailler sur des mésocosmes et expériences reproduisant des conditions chimiques proches de celles des lacs alcalins mexicains. Ces travaux nous ont permis d'étudier la formation de silicates de magnésium dans des communautés complexes formant des biofilms mais également dans des conditions physico-chimiques différentes notamment pour le Si et le pH. Il a été mis en évidence la formation de phases trioctaédrique de type kérolite et/ou saponite hydratée dans les biofilms du mésocosmes de La Preciosa et dans l'expérience Bt_Atx-Alch. De plus, nous avons mis en évidence la formation des phases silicatées magnésienne au niveau des EPS produits par des micro-organismes. J'ai également présenté un micro-organisme allongé qui a au niveau de sa paroi cellulaire des phases de silicate de magnésium. Premièrement, il semblerait que la source de Si permettant de former la phase de type kérolite et/ou saponite provienne de deux sources différentes 1) les microbialites composées kérolite et 2) des frustules de diatomées lorsque celles-ci meurent dans le biofilm. De la même manière que l'expérience de biominéralisation de silicate de magnésium par des souches de cyanobactéries axénique, une expérience en milieu contrôlé pourrait être réalisée. En effet, il pourrait être intéressant de mélanger des cyanobactéries, comme par exemple *Synechocystis* sp. PCC 6803 et des frustules de diatomées dans un milieu sans H_4SiO_4 ou une kérolite. Cela permettrait de déterminer si on observe des différences dans la nature du produit formé et confirmer l'importance ou non des diatomées dans la formation de phase de type kérolite et/ou saponite dans l'environnement. Deuxièmement, nous avons réalisé des observations en corrélative CLSM/MEB de pelotes fécales mais ceci n'a pas été réalisé sur les différents biofilms des différents mésocosmes. Il pourrait être intéressant de réaliser ces observations sur les biofilms produisant des silicates de magnésium séchés par contournement du point critique afin de garder la structure 3D afin de déterminer quels acteurs biologiques permet de favoriser ou défavoriser la formation de silicates. L'analyse corrélative permettrait de repérer plus précisément les acteurs microbiens et potentiellement d'obtenir des descriptions, dans un premier temps, morphologiques mais également spectrales dans le cas où ces micro-organismes sont auto-fluorescents. Dans un deuxième temps à l'aide des données spectrales recueillies sur ces micro-organismes, ils pourraient directement être triés par cytométrie de flux. Ces organismes pourraient être étudiés pour leur capacité à biominéraliser les silicates de magnésium dans un milieu de biominéralisation. Troisièmement, il serait intéressant de faire l'inventaire métagénomique des aquariums afin de déterminer si la composition microbienne est différente du milieu naturel et de faire émerger

certaines différences dans la composition microbienne pour confirmer que ces mésocosmes sont relativement proche biologiquement de l'environnement initial.

De plus, dans le mésocosme de La Preciosa, une cellule produisant des silicates de magnésium intracellulaire a été observée. C'est la première fois que ce patron de biominéralisation a été observé. Ici, un nombre important d'études sont en perspective. Premièrement il faudrait déterminer si la formation est *post mortem* ou *in vivo*. Pour cela, il serait intéressant de réaliser encore une fois de la corrélatrice CLSM/MEB en se focalisant sur sa recherche. S'il est mis en évidence une fluorescence chez ce micro-organisme alors il sera possible de l'enrichir par la cytométrie en flux et de la cultiver pour étudier cette biominéralisation intracellulaire. A contrario si elle ne fluorescence pas alors il faudra utiliser la micromanipulation.

Enfin, une mission au Mexique en mars 2018 a été effectuée. Un des buts de cette mission était de rapporter en France des échantillons d'eau à différentes profondeurs du lac de La Preciosa afin de faire un enrichissement de la cyanobactérie produisant des anneaux de Si, Mg, Fe et Mn. Nous avons réussi à rapporter cette cyanobactérie dans nos échantillons. Nous avons tenté de séparer ces cyanobactéries des autres micro-organismes par micromanipulation au laboratoire afin d'analyser l'ARN 16S mais ceci n'a pas fonctionné. Cependant, cela a été réalisée par David Moreira au laboratoire d'écologie, systématique et Evolution. De plus, nous avons essayé de les enrichir par cytométrie de flux mais il s'avère qu'on ne triait pas les bonnes fractions et/ou qu'on ne les a pas bien regardées en microscopie après le tri. Une mission en mai 2019 a permis cette fois de l'enrichir à l'aide de la cytométrie de flux en se basant sur la phycoerythrine. Il reste cependant à trouver les conditions de culture de cyanobactérie. Une fois les conditions trouvées, cette cyanobactérie pourra potentiellement être un modèle biologique de biominéralisation de silicate de Mg, Fe et Mn.

Conclusions et perspectives générales

Dans ces travaux de thèse, nous avons étudié des environnements lacustres alcalins mexicains, mais également des milieux contrôlés au laboratoire qui nous ont permis de mieux comprendre les processus géochimiques et géomicrobiologiques permettant de favoriser ou au contraire de défavoriser la formation des carbonates et silicates de magnésium.

L'étude de 52 souches de cyanobactéries dont certaines produisaient des ACC intracellulaires et d'autres non, a permis de mettre en évidence la capacité omniprésente des cyanobactéries produisant des inclusions d'ACC à fortement incorporer le Ca. Par ailleurs, à l'aide de la microscopie électronique à transmission, nous avons montré que le Ca est stocké dans deux compartiments : les ACC intracellulaires et les PolyP. En outre, nous avons mis en évidence que les cyanobactéries formant des ACC intracellulaires ont relativement plus de Ca (par rapport au P) dans leurs polyP vis-à-vis des autres cyanobactéries. Nous avons recherché des systèmes de transport de phosphate inorganique (PitB dans *E. coli*) capables de transporter des complexes de cations neutres divalents- HPO_4 dans certaines conditions. Cependant, ces systèmes de transport n'ont été détectés que dans certaines cyanobactéries ACC+. Ainsi, la relation entre ACC intracellulaires et PolyP chez les cyanobactéries produisant des inclusions d'ACC n'est pas encore claire. Cependant, nous avons émis l'hypothèse que les ACC pouvaient servir de réservoir de Ca, ou de tampon intracellulaire. En parallèle, nous avons effectué des expériences de croissance dans des milieux carencés en Ca qui doit être un élément important pour la croissance des cyanobactéries produisant des ACC intracellulaires. Après avoir attendu la phase stationnaire de ces cyanobactéries ACC+, nous avons ajouté du Ca mais également du Sr et Ba afin de déterminer si l'on pouvait relancer la croissance de ces cyanobactéries. Nous avons mis évidence des réponses différentes selon les souches. Ainsi nous avons proposé que les ACC intracellulaires 1) peuvent servir de ballasts aux cellules pour une adaptation à une forme de vie benthique. Cependant, cela semble peu probable puisque *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *G. lithophora* C7 ont été cultivés dans cette étude en tant que cellules planctoniques. 2) Les carbonates de calcium intracellulaires peuvent tamponner le pH intracellulaire et équilibrer la formation d'hydroxyde par conversion de HCO_3 en CO_2 lors de la fixation du carbone. 3) Alternativement, ils peuvent servir de forme de stockage de carbone inorganique disponible pour les cellules sur des périodes limitées en C. Les expériences réalisées sur l'impact du Sr et Ba sur les cyanobactéries ACC+ nous ont permis de montrer des différences dans la capacité des souches de cyanobactéries ACC+ à utiliser le Sr et Ba comme des substituts au Ca. En effet, nous avons montré que *G. lithophora* peut pousser normalement avec du

Sr et du Ba. *A contrario*, *Synechococcus* sp. PCC 6312 est capable de croître avec du Sr et Ba mais moins efficacement qu'avec du Ca. Enfin *Cyanothece* sp. PCC 7425 pousse moins bien avec le Sr comme substitut au Ca et semble ne pas être capable de substituer le Ca avec le Ba. Ainsi il semble qu'il y ait des différences génétiques permettant ou non d'utiliser d'autres alcalino-terreux que le Ca pour divers mécanismes biologiques précisés précédemment. Lorsque ces cyanobactéries ACC+ produisent des ACC intracellulaires, du fait d'une forte séquestration de Ca depuis le milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire, ces bactéries auraient tendance à favoriser la dissolution de carbonates de Ca extracellulaires dans l'environnement. Cela ouvre de nouvelles voies vers la compréhension de formation des microbialites mais également des cyanobactéries qui sont normalement connues pour être un acteur majeur de la formation des fabriques organo-sédimentaires.

Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à un autre processus de biominéralisation, celui de silicates de Mg hydratés. Nous avons montré la présence de silicates de magnésium dans les sédiments du centre des lacs d'Alchichica, La Preciosa et d'Atexcac. L'étude de la carotte sédimentaire prélevée au centre d'Alchichica a montré la formation de deux smectites de type stévensite hydratées et peu cristallisées lors de la diagenèse précoce. La formation de la smectite de type stévensite avec peu d'Al est associée à la dissolution de frustules de diatomées et la dissolution totale d'hydromagnésite qui se réalise en environ 150 ans. Une autre smectite de type stévensite a été décrite mais celle-ci a montré de forte teneur en Al mais il pourrait également s'agir d'une smectite de type saponite. Quoi qu'il en soit il s'agit d'une phase argileuse détritique très amorphe. En effet, sa formation est directement liée à l'altération des silicates primaires donnant le Si et l'Al à ce silicate de Mg détritique. La carotte sédimentaire sur la rive nord de ce même lac n'a pas montré de présence de silicate de magnésium. Nous supposons au vu des analyses minéralogiques et chimiques que la non-présence de silicate de Mg dans ces sédiments est liée au fait qu'il n'y a pas de déstabilisation de l'hydromagnésite, probablement dû au fait qu'il est moins de matière organique et donc moins d'hydrolyse de celle-ci. Nous avons également mis en évidence la formation de smectite de type saponite dans les sédiments d'Atexcac qui vraisemblablement se forme dans la colonne d'eau ou par la dissolution d'hydromagnésite et de la silice biogénique en surface ou sur les premiers centimètres du sédiment. Enfin, dans les sédiments de La Preciosa, nous avons montré la présence d'anneaux micrométrique de smectite de type saponite ferrugineuse provenant directement et potentiellement exclusivement de la biominéralisation d'une

cyanobactérie dans la colonne d'eau. Ainsi nous proposons 4 possibilités expliquant la formation de ces phases dans les sédiments des lacs alcalins : 1) la dégradation de la matière organique, lorsqu'elle est importante, permettrait de diminuer le pH et de déstabiliser l'hydromagnésite qui va favoriser la formation de smectite pauvre en Al lorsque cela a lieu au niveau de frustules de diatomées. 2) La formation des smectites est héritée de la colonne d'eau. Enfin 3) La formation de smectites détritiques riche en Al est liée à l'altération des feldspaths environnants dans les sédiments. Enfin 4) à la biominéralisation ayant lieu dans la colonne d'eau au-dessus du sédiment. De plus, on voit que dans les lacs de La Preciosa et Atexcac on a la présence de stromatolites et de sédiments avec des silicates de Mg. Au contraire, dans le lac d'Alchichica les stromatolites et les sédiments, au moins au Nord, ne sont pas composés de silicate de Mg alors que dans les sédiments du centre de ce même lac on voit une forte présence de cette phase. Ainsi, il faut regarder les différents produits à un même moment dans un même lac afin de déterminer les potentiels causes environnementales ou biologiques de la formation de ces silicates de Mg. L'ensemble de ces résultats encourage ainsi à s'appuyer sur les sédiments de l'actuels pour interpréter les dépôts sédimentaires de l'ancien, et notamment par rapport à l'aluminium composant les silicates de Mg permettant de tracer leur origine. Cela permettrait de dégager des tendances paléo-environnementale prévalant lors de la formation des silicates de magnésium composant ces sédiments.

Nous avons réalisé des expériences de biominéralisation en milieu contrôlé non tamponné par 2 souches de cyanobactéries poussant à 30 °C ou 45 °C. Ces expériences de biominéralisation ont montré que *Synechocystis* sp. PCC 6803 poussant à 30 °C est capable d'induire la précipitation de silicate de magnésium sur une période d'un mois. *A contrario*, dans la culture de *T. elongatus* BP-1 nous n'avons pas détecté de précipitation de silicate de Mg. Il semble que l'augmentation rapidement du pH est permis à la solution d'être très rapidement sursaturé par rapport à la kérolite et peut être même par rapport à la « sépiolite amorphe » que l'on n'a pas vu à cause du pas temporel. De plus, malgré la sursaturation par rapport à la kérolite qui a été atteinte par *T. elongatus* BP-1 au bout d'un certain temps d'incubation, il est possible qu'elle ne possède pas de site de nucléation favorisant la bioprécipitation de silicate de Mg. Par conséquent on aurait pu détecter la précipitation mais dans un temps plus long. Cependant, nous avons montré que le métabolisme photosynthétique oxygénique est capable comme pour les carbonates de calcium d'induire la formation de silicates de Mg.

Nous avons également travaillé sur des mésocosmes et expériences reproduisant les conditions chimiques de lacs alcalins mexicains. Ces travaux, via des analyses chimiques, minéralogiques et microscopiques, nous ont permis d'étudier la formation de silicates de magnésium dans des communautés complexes formant des biofilms mais également dans des conditions physico-chimiques différentes notamment pour le Si et le pH. Il a été mis en évidence la formation de phase trioctaédrique de type kérolite et/ou saponite hydratée dans les biofilms du mésocosme de La Preciosa et dans l'expérience Bt_Atx-Alch. De plus, nous avons mis en évidence la formation des phases silicatées magnésienne au niveau des EPS produit par des micro-organismes mais également à la surface d'une cellule allongée. La morphologie des silicates de Mg qui ont précipités est sous forme de granules de 200 à 600 nm, formant des structures plus grande par agglutination. Ainsi, il semblerait que la source de Si permettant de former la phase de type kérolite et/ou saponite provienne de deux sources différentes 1) les microbialites contenant une source de Si sous forme de kérolite qui a pu se dissoudre lors de la période de mise à l'équilibre solution/solide (Zeyen et al., 2015) et 2) peut-être dans une moindre mesure les frustules de diatomées lorsque celles-ci meurent dans le biofilm. Par conséquent, les diatomées joueraient potentiellement un rôle de réservoir de Si dans les biofilms permettant la formation de silicate de Mg.

Concernant l'environnement géochimique de formation des phases silicatées magnésiennes, nous avons montré que toutes les eaux porales des sédiments du centre des lacs et dans les solutions aqueuses des mésocosmes et expérience analogue à ces lacs où ont été détectés des silicates de Mg étaient soit au-dessus voire très proche de la ligne de solubilité de la « sépiolite amorphe » décrite par Wollast et al. (1968). Ainsi, il semble que la ligne de solubilité de la « sépiolite amorphe » décrive bien la solubilité des phases de silicate de Mg des sédiments et mésocosmes des lacs et que cette « phase » soit un bon prédicteur de la formation de silicates magnésiens dans ces systèmes alcalins. Par ailleurs, on remarque également ceci dans d'autres études (Tosca et al., 2011 ; Tosca et Materson, 2014 ; Zeyen et al., 2015). Or, le terme « sépiolite amorphe » prête à confusion car par définition nommer des phases amorphes par un nom de minéral qui par essence est cristallin est ambiguë. Cependant, il est possible que finalement cette solubilité de la « sépiolite amorphe » est peut-être bien celle des phases ou des gels silicatés qui nous intéresse. Une perspective qui nous semble important est de mieux comprendre ce qu'est la « sépiolite amorphe » décrite par Wollast et al. (1968). Ainsi, les futures études se concentrant sur

les processus de formation des silicates de magnésium à basses températures devront se focaliser sur la caractérisation de cette phase et comprendre comment elle peut aussi bien expliquer la précipitation des silicates de Mg dans divers environnements.

Dans le mésocosme de La Preciosa, une cellule produisant des silicates de magnésium intracellulaires a été observée. C'est la première fois que ce patron de biominéralisation a été observé. De plus il existe aussi des cellules de cyanobactéries apparentées à *Cyanocatena planctonica* dont nous avons déterminé par l'étude des sédiments du lac de La Preciosa qu'elles étaient capables de biominéraliser des anneaux de smectite de type saponite ferrugineuse. Ces deux micro-organismes montrent que la formation de silicates de Mg peut être influencée et potentiellement contrôlée par le vivant. Par conséquent, les futures études devront mettre en lumière la potentielle diversité microbienne biominéralisant des silicates de Mg afin de mieux interpréter les argiles de l'actuel mais également de l'ancien.

Des perspectives spécifiques ont été développées à la fin de chaque chapitre des différents sujets présentés dans cette thèse. Premièrement, dans l'objectif de mieux comprendre le rôle des ACC chez les cyanobactéries les produisant mais également l'impact de ces cyanobactéries sur la formation des microbialites, une perspective plus générale pourrait viser à étudier la génomique de ces souches. En effet, depuis 2016 un gène orphelin, n'ayant pas de fonction biologique connue a été mis en évidence chez les cyanobactéries formant des ACC intracellulaires. Il semblerait que ce gène code pour une protéine composée d'un domaine de type HMA (« Heavy Metal-Association » domain) étant variable selon les souches de cyanobactéries et d'un domaine riche en glycine (« glycine zipper ») étant plus largement conservé. Toute la question autour de cette protéine est de savoir où elle peut être localisée. Est-elle plutôt localisée au niveau de la paroi cellulaire permettant la forte incorporation d'alcalino-terreux intracellulairement, au niveau du cytoplasme servant d'intermédiaire entre les polyP et/ou les ACC intracellulaire et le cytoplasme. Enfin est-elle plutôt au niveau des compartiments intracellulaires (ACC et/ou polyP) stockant les alcalino-terreux permettant de les concentrer sans impacter l'homéostasie intracellulaire. Il est également question de comprendre son rôle dans la formation des ACC intracellulaire chez les souches les produisant par des expériences de délétion de ce gène. Deuxièmement concernant la formation de silicate de Mg dans les environnements alcalins, les futures recherches pourraient viser à rechercher et identifier précisément des micro-organismes ou des acteurs biologiques (EPS) capables d'influencer ou encore de contrôler la précipitation de ces phases dans l'environnement. Nous

avons déjà proposé 2 types de micro-organismes comme premièrement les cyanobactéries formant des anneaux micrométriques de smectite de type saponite ferrugineuse au niveau du septum de division qui semblent produire ce type de minéraux pendant la division cellulaire. Ainsi, le lien entre la formation des anneaux de silicate de Mg et la division cellulaire semble donner des voies de recherches assez larges et intéressantes. Dans l'immédiat il faudrait réussir à l'enrichir à l'aide de la cytométrie en flux. Dans un second temps un fois enrichi il sera nécessaire de la cultiver en laboratoire par des milieux ressemblant à la composition de La Preciosa. Enfin, il sera possible de trouver des milieux permettant la formation de ces anneaux silicatés et donc d'étudier cette biominéralisation. L'autre type de micro-organisme serait une cellule d'environ 30 μm possiblement un eucaryote dans lequel la formation de silicate de Mg a été observée intracellulairement. Il faudra premièrement déterminer si cette minéralisation a lieu alors que la cellule est vivante par des observations en CLSM couplé au marquage Live/Dead si elle n'est pas pigmentée. Puis il sera possible par la suite de l'enrichir par cytométrie en flux si elle est pigmentée ou par micromanipulation si ce n'est pas le cas afin de la cultiver et d'étudier cette biominéralisation. On voit bien ici qu'il existerait donc des organismes capables de contrôler (si *in vivo*) ou influencer (si *post mortem*) intracellulairement la formation de silicate de Mg, mais également une diversité microbienne que ce soit procaryotique ou eucaryotique capable d'induire la formation de ces phases minérales. Ces champs de recherches pourront permettre de revoir l'interprétation de certaines phases silicatées magnésiennes dans l'environnement actuel et potentiellement d'associer la présence de certains silicates de Mg à la présence de micro-organismes dans des formations plus anciennes comme par exemple la photosynthèse oxygénique qui est potentiellement capable d'induire la formation de ces phases.

Bibliographie Générale

- Aline, T. (2008). Dissolution of Dead Corals by Euendolithic Microorganisms Across the Northern Great Barrier Reef (Australia). *Microbial Ecology*, 55(4), 569–580. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9302-6>
- Allen, M. A., Goh, F., Burns, B. P., & Neilan, B. A. (2009). Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity of smooth and pustular microbial mat communities in the hypersaline lagoon of Shark Bay. *Geobiology*, 7(1), 82–96. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2008.00187.x>
- Allwood, A. C., Walter, M. R., Kamber, B. S., Marshall, C. P., & Burch, I. W. (2006). Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia. *Nature*, 441(7094), 714. <https://doi.org/10.1038/nature04764>
- Altermann, W., Kazmierczak, J., Oren, A., & Wright, D. T. (2006). Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history. *Geobiology*, 4(3), 147–166. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2006.00076.x>
- Amarouche-Yala, S., Benouadah, A., El Ouahab Bentabet, A., & López-García, P. (2014). Morphological and phylogenetic diversity of thermophilic cyanobacteria in Algerian hot springs. *Extremophiles*, 18(6), 1035–1047. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0680-7>
- Anderson, T. F. (1951). Techniques for the Preservation of Three-Dimensional Structure in Preparing Specimens for the Electron Microscope*. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, 13(4 Series II), 130–134. <https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1951.tb01007.x>
- Armienta, M. A., Vilaclara, G., De la Cruz-reyna, S., Ramos, S., Cenicenos, N., Cruz, O., ... Arcega-Cabrera, F. (2008). Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 178(2), 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2008.06.019>
- Arp, G., Reimer, A., & Reitner, J. (2003). Microbialite Formation in Seawater of Increased Alkalinity, Satonda Crater Lake, Indonesia. *Journal of Sedimentary Research*, 73(1), 105–127. <https://doi.org/10.1306/071002730105>
- Awramik, S. M., & Riding, R. (1988). Role of algal eukaryotes in subtidal columnar stromatolite formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(5), 1327–1329. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.5.1327>
- Badaut, D., & Risacher, F. (1983). Authigenic smectite on diatom frustules in Bolivian saline lakes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 47(3), 363–375. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(83\)90259-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(83)90259-4)
- Badger, M., & Andrews, T. (1982). Photosynthesis and Inorganic Carbon Usage by the Marine Cyanobacterium, *Synechococcus* Sp. *Plant Physiology*, 70(2), 517–523. <https://doi.org/10.1104/pp.70.2.517>

- Barrán-Berdón, A. L., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., & Fernández-Piñas, F. (2011). Free Ca²⁺ as an early intracellular biomarker of exposure of cyanobacteria to environmental pollution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(4), 1015-1029. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4209-3>
- Belkin, S., & Boussiba, S. (1991). High internal pH conveys ammonia resistance in *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 38(2), 167–169. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90149-E](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90149-E)
- Benzerara, K., Meibom, A., Gautier, Q., Kaźmierczak, J., Stolarski, J., Menguy, N., & Brown, G. E. (2010). Nanotextures of aragonite in stromatolites from the quasi-marine Satonda crater lake, Indonesia. *Geological Society, London, Special Publications*, 336(1), 211–224. <https://doi.org/10.1144/SP336.10>
- Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Li, J., Ferard, C., Gugger, M., Laurent, T., ... Moreira, D. (2014). Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(30), 10933–10938. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403510111>
- Bernhard, J. M., Edgcomb, V. P., Visscher, P. T., McIntyre-Wressnig, A., Summons, R. E., Bouxsein, M. L., ... Jęgliński, M. (2013). Insights into foraminiferal influences on microfabrics of microbialites at Highborne Cay, Bahamas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), 9830–9834. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221721110>
- Bertani, R. T., & Carozzi, A. V. (1985a). Lagoa feia formation (lower cretaceous), campos basin, offshore brazil: Rift valley stagelacustrine carbonate reservoirs - i. *Journal of Petroleum Geology*, 8(1), 37–58. <https://doi.org/10.1111/j.1747-5457.1985.tb00190.x>
- Bertani, R. T., & Carozzi, A. V. (1985b). Lagoa feia formation (lower cretaceous) campos basin, offshore brazil: Rift valley type lacustrine carbonate reservoirs — ii. *Journal of Petroleum Geology*, 8(2), 199–220. <https://doi.org/10.1111/j.1747-5457.1985.tb01011.x>
- Bihler, I., Charles, P., & Sawh, P. C. (1986). Effects of strontium on calcium-dependent hexose transport in muscle. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 64(2), 176-179. <https://doi.org/10.1139/y86-026>
- Blondeau, M., Sachse, M., Boulogne, C., Gillet, C., Guigner, J.-M., Skouri-Panet, F., ... Benzerara, K. (2018a). Amorphous Calcium Carbonate Granules Form Within an Intracellular Compartment in Calcifying Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Blondeau, M., Benzerara, K., Ferard, C., Guigner, J.-M., Poinot, M., Coutaud, M., ... Skouri-Panet, F. (2018b). Impact of the cyanobacterium *Gloeomargarita lithophora* on the geochemical cycles of Sr and Ba. *Chemical Geology*, 483, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.02.029>
- Bontognali, T. R. R., Vasconcelos, C., Warthmann, R. J., Bernasconi, S. M., Dupraz, C., Strohmenger, C. J., & McKenzie, J. A. (2010). Dolomite formation within microbial mats in the coastal sabkha of Abu Dhabi (United Arab Emirates). *Sedimentology*, 57(3), 824–844. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3091.2009.01121.x>

- Bontognali, T. R. R., Martinez-Ruiz, F., McKenzie, J. A., Bahniuk, A., Anjos, S., & Vasconcelos, C. (2014). Smectite synthesis at low temperature and neutral pH in the presence of succinic acid. *Applied Clay Science*, 101, 553–557. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2014.09.018>
- Bosak, T., Greene, S. E., & Newman, D. K. (2007). A likely role for anoxygenic photosynthetic microbes in the formation of ancient stromatolites. *Geobiology*, 5(2), 119–126. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2007.00104.x>
- Boussac, A., Rappaport, F., Carrier, P., Verbavatz, J.-M., Gobin, R., Kirilovsky, D., ... Sugiura, M. (2004). Biosynthetic Ca²⁺/Sr²⁺ Exchange in the Photosystem II Oxygen-evolving Enzyme of *Thermosynechococcus elongatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), 22809–22819. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401677200>
- Bradley, W. H., & Eugster, H. P. (1969). Geochemistry and paleolimnology of the trona deposits and associated authigenic minerals of the Green River Formation of Wyoming. *U.S. Geological Survey Professional Paper*, 496B, 71p. <http://pubs.er.usgs.gov/publication/pp496B>
- Bradley, W. H., & Fahey, J. J. (1962). Occurrence of stevensite in the green river formation of wyoming. *American Mineralogist*, 47(7–8), 996–998.
- Bradley, J. A., Daille, L. K., Trivedi, C. B., Bojanowski, C. L., Stamps, B. W., Stevenson, B. S., ... Spear, J. R. (2017). Carbonate-rich dendrolitic cones: Insights into a modern analog for incipient microbialite formation, Little Hot Creek, Long Valley Caldera, California. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0041-2>
- Bristow, T. F., Kennedy, M. J., Derkowski, A., Droser, M. L., Jiang, G., & Creaser, R. A. (2009). Mineralogical constraints on the paleoenvironments of the Ediacaran Doushantuo Formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(32), 13190–13195. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901080106>
- Bristow, T. F., & Milliken, R. E. (2011). Terrestrial perspective on authigenic clay mineral production in ancient martian. *Clays and Clay Minerals*, 59(4), 339–358. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2011.0590401>
- Bristow, T. F., Kennedy, M. J., Morrison, K. D., & Mrofka, D. D. (2012). The influence of authigenic clay formation on the mineralogy and stable isotopic record of lacustrine carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 90, 64–82. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.05.006>
- Bundeleva, I. A., Shirokova, L. S., Pokrovsky, O. S., Bénézeth, P., Ménez, B., Gérard, E., & Balor, S. (2014). Experimental modeling of calcium carbonate precipitation by cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Chemical Geology*, 374–375, 44–60. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2014.03.007>
- Burne, R. V., & Moore, L. S. (1987). Microbialites: Organosedimentary Deposits of Benthic Microbial Communities. *PALAIOS*, 2(3), 241–254. <https://doi.org/10.2307/3514674>

- Burne, R. V., Moore, L. S., Christy, A. G., Troitzsch, U., King, P. L., Carnerup, A. M., & Hamilton, P. J. (2014). Stevensite in the modern thrombolites of Lake Clifton, Western Australia: A missing link in microbialite mineralization? *Geology*, 42(7), 575–578. <https://doi.org/10.1130/G35484.1>
- Burns, B. P., Goh, F., Allen, M., & Neilan, B. A. (2004). Microbial diversity of extant stromatolites in the hypersaline marine environment of Shark Bay, Australia. *Environmental Microbiology*, 6(10), 1096–1101. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00651.x>
- Caballero, M. M. J., Vilaclara, G., Rodriguez, A. F., & Juarez, D. M. (2003). Short-term climatic change in lake sediments from lake Alchichica, Oriental, Mexico. *Geofísica Internacional*, 42(3), 529–537.
- Cam, N., Georgelin, T., Jaber, M., Lambert, J.-F., & Benzerara, K. (2015). In vitro synthesis of amorphous Mg-, Ca-, Sr- and Ba-carbonates: What do we learn about intracellular calcification by cyanobacteria? *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 161, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.04.003>
- Cam, N. (2016). Biominéralisation intracellulaire par des cyanobactéries : Du modèle aux cellules. <http://www.theses.fr/2015PA066495>
- Cam, N., Benzerara, K., Georgelin, T., Jaber, M., Lambert, J.-F., Poinot, M., ... Cordier, L. (2016). Selective uptake of alkaline earth metals by cyanobacteria forming intracellular carbonates. *Environmental Science & Technology*, 50(21), 11654–11662. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02872>
- Cam, N., Benzerara, K., Georgelin, T., Jaber, M., Lambert, J.-F., Poinot, M., ... Jézéquel, D. (2018). Cyanobacterial formation of intracellular Ca-carbonates in undersaturated solutions. *Geobiology*, 16(1), 49–61. <https://doi.org/10.1111/gbi.12261>
- Carrasco-Nunez, H., Ort, M. H., & Romero, C. (2007). Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico). *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 159(1–3), 179–197. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2006.07.001>
- Carteret, C., De La Pierre, M., Dossot, M., Pascale, F., Erba, A., & Dovesi, R. (2013). The vibrational spectrum of CaCO₃ aragonite: A combined experimental and quantum-mechanical investigation. *The Journal of Chemical Physics*, 138(1), 014201. <https://doi.org/10.1063/1.4772960>
- Cerling, T. E. (1994). Chemistry of closed basin lake waters: a comparaison between African Rift Valley and some central North American rivers and lakes. *Global Geological Record of Lake Basins*, Cambridge University Press, 1, 29-30.
- Chahi, A., Durringer, P., Ais, M., Bouabdelli, M., Gauthier-Lafaye, F., & Fritz, B. (1999). Diagenetic transformation of dolomite into stevensite in lacustrine sediments from Jbel Rhassoul, Morocco. *Journal of Sedimentary Research*, 69(5), 1123-1135. <https://doi.org/10.2110/jsr.69.1123>

- Chevrier, V., Poulet, F., & Bibring, J.-P. (2007). Early geochemical environment of Mars as determined from thermodynamics of phyllosilicates. *Nature*, 448(7149), 60–63. <https://doi.org/10.1038/nature05961>
- Christ, C. L., Hostetler, P. B., & Siebert, R. M. (1973). Studies in the system MgO-SiO₂-CO₂-H₂O (III); the activity-product constant of sepiolite. *American Journal of Science*, 273(1), 65-83. <https://doi.org/10.2475/ajs.273.1.65>
- Clapman, D. E. (2007). Calcium Signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Coates, J. (2000) Interpretation of Infrared Spectra: A Practical Approach. In: Meyers, R.A., Ed., *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 10881-10882.
- Corkeron, W. G. E., Moulds, J., & Grey, K. (2012). Discriminating stromatolite formation modes using rare earth element geochemistry: Trapping and binding versus in situ precipitation of stromatolites from the Neoproterozoic Bitter Springs Formation, Northern Territory, Australia. *Precambrian Research*, 212–213, 194–206. <https://doi.org/10.1016/j.precamres.2012.04.019>
- Cosmidis, J., Benzerara, K., Nassif, N., Tyliczszak, T., & Bourdelle, F. (2015). Characterization of Calcium phosphate biological materials by scanning transmission X-ray microscopy (STXM) at the Ca L-2,L-3-, P L-2,L-3- and C K-edges. *Acta Biomaterialia*, 12, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.10.003>
- Couradeau, E., Benzerara, K., Moreira, D., Gérard, E., Kaźmierczak, J., Tavera, R., & López-García, P. (2011). Prokaryotic and Eukaryotic Community Structure in Field and Cultured Microbialites from the Alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLOS ONE*, 6(12), e28767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028767>
- Couradeau, E., Benzerara, K., Gerard, E., Moreira, D., Bernard, S., Brown, G. E., & Lopez-Garcia, P. (2012). An Early-Branching Microbialite Cyanobacterium Forms Intracellular Carbonates. *Science*, 336(6080), 459–462. <https://doi.org/10.1126/science.1216171>
- Davies, C.W. (1962). Ion Association. *Butterworths, London*, 37-53.
- Debus, R. J. (1992). The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1102(3), 269–352. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(92\)90133-M](https://doi.org/10.1016/0005-2728(92)90133-M)
- Decho, A.W. (1990). Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography Marine Biology Annual Review*, 28, 73–154.
- Decho, A. W. (2010). Overview of biopolymer-induced mineralization: What goes on in biofilms? *Ecological Engineering*, 36(2), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.01.003>

- Deocampo, D. M. (2004). Authigenic clays in East Africa: Regional trends and paleolimnology at the Plio–Pleistocene boundary, Olduvai Gorge, Tanzania. *Journal of Paleolimnology*, 31(1), 1–9. <https://doi.org/10.1023/B:JOPL.0000013353.86120.9b>
- Deocampo, D. M. (2005). Evaporative evolution of surface waters and the role of aqueous CO₂ in magnesium silicate precipitation: Lake Eyasi and Ngorongoro Crater, northern Tanzania. *South African Journal of Geology*, 108(4), 493–504. <https://doi.org/10.2113/108.4.493>
- Deocampo, D. M., Cuadros, J., Wing-dudek, T., Olives, J., & Amouric, M. (2009). Saline lake diagenesis as revealed by coupled mineralogy and geochemistry of multiple ultrafine clay phases: Pliocene Olduvai Gorge, Tanzania. *American Journal of Science*, 309(9), 834–868. <https://doi.org/10.2475/09.2009.03>
- Desprairies, A., & Bonnot-Courtois, C. (1980). Relation entre la composition des smectites d’alteration sous-marine et leur cortège de terres rares. *Earth and Planetary Science Letters*, 48(1), 124–130. [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(80\)90175-2](https://doi.org/10.1016/0012-821X(80)90175-2)
- Dominguez, D. C. (2004). Calcium signalling in bacteria. *Molecular Microbiology*, 54(2), 291–297. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04276.x>
- Domínguez, D. C., Guragain, M., & Patrauchan, M. (2015). Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. *Cell Calcium*, 57(3), 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.12.006>
- Dupraz, C., & Visscher, P. T. (2005). Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in Microbiology*, 13(9), 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.07.008>
- Dupraz, C., Reid, R. P., Braissant, O., Decho, A. W., Norman, R. S., & Visscher, P. T. (2009). Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews*, 96(3), 141–162. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2008.10.005>
- Dupraz, C., Reid, R. P., & Visscher, P. T. (2011). Microbialites, Modern. In *Encyclopedia of Geobiology* (pp. 617–635). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1_195
- Dyni, J. R. (1973). Trioctahedral smectite in the Green River Formation, Duchesne County, Utah. U.S. *Geological Survey*, 73–64. <http://pubs.er.usgs.gov/publication/ofr7364>
- Eugster, H. P., & Jones, B. F. (1979). Behavior of major solutes during closed-basin brine evolution. *American Journal of Science*, 279(6), 609–631. <https://doi.org/10.2475/ajs.279.6.609>
- Farías, M. E., Contreras, M., Rasuk, M. C., Kurth, D., Flores, M. R., Poiré, D. G., ... Visscher, P. T. (2014). Characterization of bacterial diversity associated with microbial mats, gypsum evaporites and carbonate microbialites in thalassic wetlands: Tebenquiche and La Brava, Salar de Atacama, Chile. *Extremophiles*, 18(2), 311–329. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0617-6>
- Farmer, V. C., & Russell, J. D. (1964). The infra-red spectra of layer silicates. *Spectrochimica Acta*, 20(7), 1149–1173. [https://doi.org/10.1016/0371-1951\(64\)80165-X](https://doi.org/10.1016/0371-1951(64)80165-X)

- Farmer, V. C., & Victor, C. (1974). Infrared spectra of minerals. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300534379>
- Ferrari, L., Orozco-Esquivel, T., Manea, V., & Manea, M. (2012). The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone. *Tectonophysics*, 522–523, 122–149. <https://doi.org/10.1016/j.tecto.2011.09.018>
- Foster, J. S., Green, S. J., Ahrendt, S. R., Golubic, S., Reid, R. P., Hetherington, K. L., & Bebout, L. (2009). Molecular and morphological characterization of cyanobacterial diversity in the stromatolites of Highborne Cay, Bahamas. *The ISME Journal*, 3(5), 573. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.129>
- Foster, J. S., & Green, S. J. (2011). Microbial Diversity in Modern Stromatolites. In Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. STROMATOLITES: Interaction of Microbes with Sediments (pp. 383–405). https://doi.org/10.1007/978-94-007-0397-1_17
- Frankel, R. B., & Bazylnski, D. A. (2003). Biologically Induced Mineralization by Bacteria. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1), 95–114. <https://doi.org/10.2113/0540095>
- Gac, J.-Y., & Tardy, Y. (1980). Géochimie d'un paysage tropical : Le bassin du lac Tchad. In Y. Tardy (Ed.), Géochimie des interactions entre les eaux, les minéraux et les roches (pp. 199–239). <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:02241>
- Gallagher, K. L., Kading, T. J., Braissant, O., Dupraz, C., & Visscher, P. T. (2012). Inside the alkalinity engine: The role of electron donors in the organomineralization potential of sulfate-reducing bacteria. *Geobiology*, 10(6), 518–530. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2012.00342.x>
- Gallagher, K. L., Dupraz, C., & Visscher, P. T. (2014). Two opposing effects of sulfate reduction on carbonate precipitation in normal marine, hypersaline, and alkaline environments: COMMENT. *Geology*, 42(1), e313–e314. <https://doi.org/10.1130/G34639C.1>
- Garcia-Pichel, F. (2006). Plausible mechanisms for the boring on carbonates by microbial phototrophs. *Sedimentary Geology*, 185(3), 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2005.12.013>
- Garcia-Pichel, F., Ramírez-Reinat, E., & Gao, Q. (2010). Microbial excavation of solid carbonates powered by P-type ATPase-mediated transcellular Ca²⁺ transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21749–21754. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011884108>
- Gérard, E., Ménez, B., Couradeau, E., Moreira, D., Benzerara, K., Tavera, R., & López-García, P. (2013). Specific carbonate–microbe interactions in the modern microbialites of Lake Alchichica (Mexico). *The ISME Journal*, 7(10), 1997–2009. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.81>
- Gilabert, J. A. (2012). Cytoplasmic Calcium Buffering. In Advances in Experimental Medicine and Biology. *Calcium Signaling* (pp. 483–498). https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_20
- Giordano, M., Kansiz, M., Heraud, P., Beardall, J., Wood, B., & McNaughton, D. (2001). Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular

- macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 37(2), 271–279. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037002271.x>
- Giuffrè, A. J., Hamm, L. M., Han, N., Yoreo, J. J. D., & Dove, P. M. (2013). Polysaccharide chemistry regulates kinetics of calcite nucleation through competition of interfacial energies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23), 9261–9266. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222162110>
- Gleeson, D. F., Williamson, C., Grasby, S. E., Pappalardo, R. T., Spear, J. R., & Templeton, A. S. (2011). Low temperature S0 biomineralization at a supraglacial spring system in the Canadian High Arctic. *Geobiology*, 9(4), 360–375. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2011.00283.x>
- Golubic, S., & Seong-Joo, L. (1999). Early cyanobacterial fossil record: Preservation, palaeoenvironments and identification. *European Journal of Phycology*, 34(4), 339–348.
- Golubic, S., Seong-Joo, L., & Browne, K. M. (2000). Cyanobacteria: Architects of Sedimentary Structures. In *Microbial Sediments* (pp. 57–67). https://doi.org/10.1007/978-3-662-04036-2_8
- Golubic, S., Pietrini, A. M., & Ricci, S. (2015). Euendolithic activity of the cyanobacterium *Chroococcus lithophilus* Erc. in biodeterioration of the Pyramid of Caius Cestius, Rome, Italy. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 100, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.01.019>
- Gómez-Tuena, A., LaGatta, A. B., Langmuir, C. H., Goldstein, S. L., Ortega-Gutiérrez, F., & Carrasco-Núñez, G. (2003). Temporal control of subduction magmatism in the eastern Trans-Mexican Volcanic Belt: Mantle sources, slab contributions, and crustal contamination. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, 4(8). <https://doi.org/10.1029/2003GC000524>
- Gran, G. (1952). Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *Analyst*, 77(920), 661–671. <https://doi.org/10.1039/AN9527700661>
- Gray, N. D. (2006). The Unique Role of Intracellular Calcification in the Genus *Achromatium*. In *Microbiology Monographs. Inclusions in Prokaryotes* (pp. 299–309). https://doi.org/10.1007/3-540-33774-1_11
- Grotzinger, J. P. (1990). Geochemical model for Proterozoic stromatolite decline. *American Journal of Science* 290- A, 80–243.
- Grotzinger, J. P., & Knoll, A. H. (1999). Stromatolites in Precambrian Carbonates: Evolutionary Mileposts or Environmental Dipsticks? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 27(1), 313–358. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.27.1.313>
- Guida, B. S., & Garcia-Pichel, F. (2016). Extreme cellular adaptations and cell differentiation required by a cyanobacterium for carbonate excavation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(20), 5712–5717. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524687113>
- Gustafsson, J. P. (2013). Visual MINTEQ | Visual MINTEQ – a free equilibrium speciation model.
- Hardie, L. A., & Eugster, H. P. (1970). The Evolution of Closed-Basin Brines. *Department of Earth and Planetary Sciences, The Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21218*.

- Heynig, H. (1979). Interessante Phytoplankter aus Gewässern des Bezirks Halle (DDR). II. *Archiv für Protistenkunde*, 122(3), 282-289. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(79\)80039-1](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(79)80039-1)
- Heynig, H., & Krienitz, L. (1987). Interessante coccale Grünalgen (Chlorellales) aus einem Altwasser der Elbe (DDR). *Archiv für Protistenkunde*, 134(1), 49-58. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(87\)80028-3](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(87)80028-3)
- Hindák, F. (1983). Morphological variability and taxonomy of some coccoid blue-green algae (Cyanophyta). *Schweizerische Zeitschrift Für Hydrologie*, 45(1), 311–320. <https://doi.org/10.1007/BF02538161>
- Hindák, F., & Hindáková, A. (2003). Diversity of cyanobacteria and algae of urban gravel pit lakes in Bratislava, Slovakia: A survey. *Hydrobiologia*, 506–509(1–3), 155–162. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000008631.82041.c7>
- Jansson, C., & Northen, T. (2010). Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.017>
- Javaux, E. J. (2007). The Early Eukaryotic Fossil Record. In *Advances in Experimental Medicine and Biology. Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton* (pp. 1–19). https://doi.org/10.1007/978-0-387-74021-8_1
- Jears, C. V. (1971). The neoformation of clay minerals in brackish and marine environments. *Clay Minerals*, 9(2), 209–217. <https://doi.org/10.1180/claymin.1971.009.2.06>
- Jiang, H.-B., Cheng, H.-M., Gao, K.-S., & Qiu, B.-S. (2013). Inactivation of Ca²⁺/H⁺ Exchanger in *Synechocystis* sp Strain PCC 6803 Promotes Cyanobacterial Calcification by Upregulating CO₂-Concentrating Mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(13), 4048–4055. <https://doi.org/10.1128/AEM.00681-13>
- Jittawuttipoka, T., Planchon, M., Spalla, O., Benzerara, K., Guyot, F., Cassier-Chauvat, C., & Chauvat, F. (2013). Multidisciplinary Evidences that *Synechocystis* PCC 6803 Exopolysaccharides Operate in Cell Sedimentation and Protection against Salt and Metal Stresses. *PLOS ONE*, 8(2), e55564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055564>
- Jones, B. F., & Weir, A. H. (1983). Clay Minerals of Lake Abert, an Alkaline, Saline Lake. *Clays and Clay Minerals*, 31(3), 161–172. <https://doi.org/10.1346/CCMN.1983.0310301>
- Jones, B. F. (1986). Clay Mineral Diagenesis in Lacustrine Sediments. *U.S. Department of the Interior, Geological Survey; Washington, D.C.*
- Jones, B. F., & Conko, K. M. (2011). Chapter 3 - Environmental Influences on the Occurrences of Sepiolite and Palygorskite: A Brief Review. In E. Galàn & A. Singer (Éd.), *Developments in Clay Science* (p. 69-83). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53607-5.00003-7>
- Kalkowsky, E. (1908). Oolith und Stromatolith im norddeutschen Buntsandstein. *Zeitschrift der Deutschen Geologischen Gesellschaft*, 68-125.

- Kamennaya, N. A., Ajo-Franklin, C. M., Northen, T., & Jansson, C. (2012). Cyanobacteria as Biocatalysts for Carbonate Mineralization. *Minerals*, 2(4), 338–364. <https://doi.org/10.3390/min2040338>
- Kansiz, M., Heraud, P., Wood, B., Burden, F., Beardall, J., & McNaughton. (1999). Fourier Transform Infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. *Phytochemistry*, 52(3), 407–417. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00212-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00212-5)
- Kastner, M., Keene, J. B., & Gieskes, J. M. (1977). Diagenesis of siliceous oozes—I. Chemical controls on the rate of opal-A to opal-CT transformation—an experimental study. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 41(8), 1041–1059. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(77\)90099-0](https://doi.org/10.1016/0016-7037(77)90099-0)
- Kaźmierczak, J., Kempe, S., Kremer, B., López-García, P., Moreira, D., & Tavera, R. (2011). Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico. *Facies*, 57(4), 543–570. <https://doi.org/10.1007/s10347-010-0255-8>
- Khodadad, C. L. M., & Foster, J. S. (2012). Metagenomic and Metabolic Profiling of Nonlithifying and Lithifying Stromatolitic Mats of Highborne Cay, The Bahamas. *PLOS ONE*, 7(5), e38229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038229>
- Knoll, A. H. (2003). Biomineralization and Evolutionary History. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1), 329–356. <https://doi.org/10.2113/0540329>
- Knudson, H. W., Juday, C., & Meloche, V. W. (1940). Silicomolybdate method for silica. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 12(5), 270–273. <https://doi.org/10.1021/ac50145a008>
- Konhauser, K. O., Fisher, Q. J., Fyfe, W. S., Longstaffe, F. J., & Powell, M. A. (1998). Authigenic mineralization and detrital clay binding by freshwater biofilms: The Brahmani river, India. *Geomicrobiology Journal*, 15(3), 209–222. <https://doi.org/10.1080/01490459809378077>
- Kooistra, W. H. C. F., & Medlin, L. K. (1996). Evolution of the Diatoms (Bacillariophyta): IV. A Reconstruction of Their Age from Small Subunit rRNA Coding Regions and the Fossil Record. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6(3), 391–407. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0088>
- Lancelot, V. A., & Allegre, C. J. (1976). Uranium and lead isotopic dating with grain-by-grain zircon analysis: A study of complex geological history with a single rock. *Earth and Planetary Science Letters*, 29(2), 357–366. [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(76\)90140-0](https://doi.org/10.1016/0012-821X(76)90140-0)
- Lee, B. D., Apel, W. A., & Walton, M. R. (2004). Screening of cyanobacterial species for calcification. *Biotechnology Progress*, 20(5), 1345–1351. <https://doi.org/10.1021/bp0343561>
- Lepot, K., Benzerara, K., Rividi, N., Cotte, M., Brown, G. E., & Philippot, P. (2009). Organic matter heterogeneities in 2.72 Ga stromatolites: Alteration versus preservation by sulfur incorporation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(21), 6579–6599. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2009.08.014>
- Léveillé, R. J., Fyfe, W. S., & Longstaffe, F. J. (2000a). Unusual Secondary Ca- Mg- Carbonate-Kerolite Deposits in Basaltic Caves, Kauai, Hawaii. *The Journal of Geology*, 108(5), 613–621. <https://doi.org/10.1086/314417>

- Léveillé, R. J., Longstaffe, F. J., & Fyfe, W. S. (2000b). Geomicrobiology of carbonate–silicate microbialites from Hawaiian basaltic sea caves. *Chemical Geology*, 169(3–4), 339–355. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(00\)00213-8](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(00)00213-8)
- Léveillé, R. J., Longstaffe, F. J., & Fyfe, W. S. (2002). Kerolite in carbonate-rich speleothems and microbial deposits from basaltic caves, Kauai, Hawaii. *Clays and clay minerals*, 50, 514–524 <https://doi.org/info:doi/10.1346/000986002320514235>
- Léveillé, R. J., Longstaffe, F. J., & Fyfe, W. S. (2007). An isotopic and geochemical study of carbonate-clay mineralization in basaltic caves: Abiotic versus microbial processes. *Geobiology*, 5(3), 235–249. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2007.00109.x>
- Linares, J., & Huertas, F. (1971). Kaolinite: Synthesis at room temperature. *Science (New York, N.Y.)*, 171(3974), 896–897. <https://doi.org/10.1126/science.171.3974.896>
- Logan, B. W. (1961). Cryptozoon and Associate Stromatolites from the Recent, Shark Bay, Western Australia. *The Journal of Geology*, 69(5), 517–533. <https://doi.org/10.1086/626769>
- McConnaughey, T. (1989). ^{13}C and ^{18}O isotopic disequilibrium in biological carbonates: I. Patterns. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 53(1), 151–162. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(89\)90282-2](https://doi.org/10.1016/0016-7037(89)90282-2)
- Medlin, L. K., Kooistra, W. H. C. F., Potter, D., Saunders, G. W., & Andersen, R. A. (1997). Phylogenetic relationships of the ‘golden algae’ (haptophytes, heterokont chromophytes) and their plastids. In D. Bhattacharya (Éd.), *Origins of Algae and their Plastids* (p. 187–219). https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6542-3_11
- Merz, M. U. E. (1992). The biology of carbonate precipitation by cyanobacteria. *Facies*, 26(1), 81–101. <https://doi.org/10.1007/BF02539795>
- Meunier, A., Petit, S., Cockell, C. S., Albani, A. E., & Beaufort, D. (2010). The Fe-Rich Clay Microsystems in Basalt-Komatiite Lavas: Importance of Fe-Smectites for Pre-Biotic Molecule Catalysis During the Hadean Eon. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 40(3), 253–272. <https://doi.org/10.1007/s11084-010-9205-2>
- Min, X., Fang, M., Liu, H., Liu, Y., Wu, X., & Huang, Z. (2017). Growth, structure, and luminescence properties of novel silica nanowires and interconnected nanorings. *Scientific Reports*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10933-7>
- Michalopoulos, P., & Aller, R. C. (1995). Rapid Clay Mineral Formation in Amazon Delta Sediments: Reverse Weathering and Oceanic Elemental Cycles. *Science*, 270(5236), 614–617. <https://doi.org/10.1126/science.270.5236.614>
- Milesi, V. P., Jézéquel, D., Debure, M., Cadeau, P., Guyot, F., Sarazin, G., ... Ader, M. (2018). Formation of magnesium-smectite during lacustrine carbonates early diagenesis: Study case of the volcanic crater lake Dziani Dzaha (Mayotte – Indian Ocean). *Sedimentology*, 66(3), 983–1001. <https://doi.org/10.1111/sed.12531>

- Millot, G. (1964) Géologie des argiles : altérations, sédimentologie, géochimie, Manson, Paris, 499.
- Millot, G. (1970). *Geology of Clays*. Springer.
- Miot, J., Benzerara, K., Morin, G., Kappler, A., Bernard, S., Obst, M., ... Guyot, F. (2009). Iron biomineralization by anaerobic neutrophilic iron-oxidizing bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(3), 696–711. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2008.10.033>
- Moorehead, W. R., & Biggs, H. G. (1974). 2-Amino-2-methyl-1-propanol as the alkalizing agent in an improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum. *Clinical Chemistry*, 20(11), 1458-1460.
- Moreira, D., Tavera, R., Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Couradeau, E., Gérard, E., ... López-García, P. (2017). Description of *Gloeomargarita lithophora* gen. Nov., sp. Nov., a thylakoid-bearing, basal-branching cyanobacterium with intracellular carbonates, and proposal for *Gloeomargaritales* ord. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(3), 653-658. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001679>
- Müller, M. N., Barcelos e Ramos, J., Schulz, K. G., Riebesell, U., Kazmierczak, J., Gallo, F., ... Hallegraeff, G. M. (2015). Phytoplankton calcification as an effective mechanism to prevent cellular calcium poisoning. *Biogeosciences*, 12, 6493–6501. <http://eprints.uni-kiel.de/id/eprint/30167>
- Musić, S., Filipović-Vinceković, N., & Sekovanić, L. (2011). Precipitation of amorphous SiO₂ particles and their properties. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 89–94. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322011000100011>
- Myshrall, K. L., Mobberley, J. M., Green, S. J., Visscher, P. T., Havemann, S. A., Reid, R. P., & Foster, J. S. (2010). Biogeochemical cycling and microbial diversity in the thrombolitic microbialites of Highborne Cay, Bahamas. *Geobiology*, 8(4), 337–354. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2010.00245.x>
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., ... Tabata, S. (2002). Complete Genome Structure of the Thermophilic Cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Research*, 9(4), 123-130. <https://doi.org/10.1093/dnares/9.4.123>
- Nelson, W. H. (1991). *Modern techniques for rapid microbiological analysis*. New York: VCH Publishers.
- Noack, Y., & Duplay, J. (1983). Talc and weathering-hydrothermal alteration boundary. *Sciences Géologiques, Bulletins et Mémoires*, 72(1), 121–130.
- Ostrom, M. E. (1961). Separation of clay minerals from carbonate rocks by using acid. *Journal of Sedimentary Research*, 31(1), 123-129. <https://doi.org/10.1306/74D70B1E-2B21-11D7-8648000102C1865D>
- Pace, A., Bourillot, R., Bouton, A., Vennin, E., Galaup, S., Bundeleva, I., ... Visscher, P. T. (2016). Microbial and diagenetic steps leading to the mineralisation of Great Salt Lake microbialites. *Scientific Reports*, 6, 31495. <https://doi.org/10.1038/srep31495>

- Pace, A., Bourillot, R., Bouton, A., Vennin, E., Braissant, O., Dupraz, C., ... Visscher, P. T. (2018). Formation of stromatolite lamina at the interface of oxygenic–anoxygenic photosynthesis. *Geobiology*, 16(4), 378–398. <https://doi.org/10.1111/gbi.12281>
- Papineau, D., Walker, J. J., Mojzsis, S. J., & Pace, N. R. (2005). Composition and Structure of Microbial Communities from Stromatolites of Hamelin Pool in Shark Bay, Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4822–4832. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4822-4832.2005>
- Parfrey, L. W., Lahr, D. J. G., Knoll, A. H., & Katz, L. A. (2011). Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), 13624–13629. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110633108>
- Pedro, G. (1960a). Altération expérimentale des roches par l'eau sans atmosphère de CO₂. *Comptes Rendus de l'académie des Sciences*, 250, 2035–2037.
- Pedro, G. (1960b). Genèse des minéraux argileux par évolution des matériaux amorphes provenant de l'altération de diverses roches. *Comptes Rendus de l'académie des Sciences, Paris*, 250, 1697–1699.
- Pedro, G. (1961). Genèse des minéraux argileux par lessivage des roches cristallines au laboratoire. Colloque du C.N.R.S. n° 105 "Genèse et synthèse des argiles", 99–107.
- Pedro, G. (1964). Contribution à l'étude expérimentale de l'altération géochimique des roches cristallines. Thèse Science, Paris, 344.
- Pedro, G., Carmouze, J. P., & Velde, B. (1978). Peloidal nontronite formation in Recent sediments of Lake Chad. *Chemical Geology*, 23(1), 139–149. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(78\)90071-2](https://doi.org/10.1016/0009-2541(78)90071-2)
- Pentecost, A. (2005). Travertine. *Springer Science & Business Media*.
- Peretyazhko, T. S., Sutter, B., Morris, R. V., Agresti, D. G., & Ming, D. W. (2016). Fe/Mg smectite formation under acidic conditions on early Mars. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 173, 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.10.012>
- Ponce-Toledo, R. I., Deschamps, P., López-García, P., Zivanovic, Y., Benzerara, K., & Moreira, D. (2017). An Early-Branching Freshwater Cyanobacterium at the Origin of Plastids. *Current Biology*, 27(3), 386–391. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.056>
- Price, G. D., Maeda, S., Omata, T., & Badger, M. R. (2002). Modes of active inorganic carbon uptake in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942. *Functional Plant Biology*, 29(3), 131–149. <https://doi.org/10.1071/pp01229>
- Rabus, R., Hansen, T. A., & Widdel, F. (2006). Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Éd.), *The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry* (p. 659–768). https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_22
- Ragon, M., Benzerara, K., Moreira, D., Tavera, R., & Lopez-Garcia, P. (2014). 16S rDNA-based analysis reveals cosmopolitan occurrence but limited diversity of two cyanobacterial lineages with

- contrasted patterns of intracellular carbonate mineralization. *Frontiers in Microbiology*, 5, 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00331>
- Ragueneau, O., Tréguer, P. J., Leynaert, A., Anderson, R. F., Brzezinski, M. A., DeMaster, D. J., ... Quéguiner, B. (2000). A review of the Si cycle in the modern ocean: Recent progress and missing gaps in the application of biogenic opal as a paleoproductivity proxy. *Global and Planetary Change*, 26(4), 317–365. [https://doi.org/10.1016/S0921-8181\(00\)00052-7](https://doi.org/10.1016/S0921-8181(00)00052-7)
- Reid, R. P., Visscher, P. T., Decho, A. W., Stolz, J. F., Bebout, B. M., Dupraz, C., ... DesMarais, D. J. (2000). The role of microbes in accretion, lamination and early lithification of modern marine stromatolites. *Nature*, 406(6799), 989-992. <https://doi.org/10.1038/35023158>
- Reid, P. R., James, N. P., Macintyre, I. G., Dupraz, C. P., & Burne, R. V. (2003). Shark Bay stromatolites: Microfabrics and reinterpretation of origins. *Facies*, 49, 299-324. <https://miami.pure.elsevier.com/en/publications/shark-bay-stromatolites-microfabrics-and-reinterpretation-of-orig>
- Riding, R. (1991). Classification of Microbial Carbonates. In Robert Riding (Éd.), *Calcareous Algae and Stromatolites* (p. 21-51). https://doi.org/10.1007/978-3-642-52335-9_2
- Riding, R. (2000). Microbial carbonates: The geological record of calcified bacterial–algal mats and biofilms. *Sedimentology*, 47(s1), 179–214. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3091.2000.00003.x>
- Riding, R. (2006). Cyanobacterial calcification, carbon dioxide concentrating mechanisms, and Proterozoic-Cambrian changes in atmospheric composition. *Geobiology*, 4(4), 299–316. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2006.00087.x>
- Rivas-Lamelo, S., Benzerara, K., Lefèvre, C., Monteil, C., Jézéquel, D., Menguy, N., ... Duprat, E. (2017). Magnetotactic bacteria as a new model for P sequestration in the ferruginous Lake Pavin. <https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-01741645>
- Rosen, M. R., Arehart, G. B., & Lico, M. S. (2004). Exceptionally fast growth rate of <100-yr-old tufa, Big Soda Lake, Nevada: Implications for using tufa as a paleoclimate proxy. *Geology*, 32(5), 409–412. <https://doi.org/10.1130/G20386.1>
- Saghaï, A., Zivanovic, Y., Zeyen, N., Moreira, D., Benzerara, K., Deschamps, P., ... López-García, P. (2015). Metagenome-based diversity analyses suggest a significant contribution of non-cyanobacterial lineages to carbonate precipitation in modern microbialites. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00797>
- Schieber, J., Krinsley, D., & Riciputi, L. (2000). Diagenetic origin of quartz silt in mudstones and implications for silica cycling. *Nature*, 406(6799), 981. <https://doi.org/10.1038/35023143>
- Shannon, R. D. (1976). Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallographica Section A: Crystal Physics, Diffraction, Theoretical and General Crystallography*, 32(5), 751-767. <https://doi.org/10.1107/S0567739476001551>

- Siebe, C. (2014). MAAR.
- Souza-Egipsy, V., Wierzchos, J., Ascaso, C., & Neelson, K. H. (2005). Mg–silica precipitation in fossilization mechanisms of sand tufa endolithic microbial community, Mono Lake (California). *Chemical Geology*, 217(1), 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2004.12.004>
- Stoessell, Ronald K., & Hay, R. L. (1978). The geochemical origin of sepiolite and kerolite at Amboseli, Kenya. *Contributions to Mineralogy and Petrology*, 65(3), 255–267. <https://doi.org/10.1007/BF00375511>
- Stoessell, R. K. (1988). 25°C and 1 atm dissolution experiments of sepiolite and kerolite. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 52(2), 365–374. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(88\)90092-0](https://doi.org/10.1016/0016-7037(88)90092-0)
- Stüeken, E. E., Buick, R., & Schauer, A. J. (2015). Nitrogen isotope evidence for alkaline lakes on late Archean continents. *Earth and Planetary Science Letters*, 411, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2014.11.037>
- Swann, G. E. A., & Patwardhan, S. V. (2011). Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for assessing biogenic silica sample purity in geochemical analyses and palaeoenvironmental research. *Climate of the Past*, 7, 65–74. <https://doi.org/10.5194/cp-7-65-2011>
- Takamura, T., Yoshida, H., & Inazuka, K. (1964). Infrared characteristic bands of highly dispersed silica. *Kolloid-Zeitschrift Und Zeitschrift Für Polymere*, 195(1), 12–16. <https://doi.org/10.1007/BF01500878>
- Tazaki. (2006). Chapter 9 Clays, Microorganisms, and Biomineralization. 1, 477–497. [https://doi.org/10.1016/S1572-4352\(05\)01014-7](https://doi.org/10.1016/S1572-4352(05)01014-7)
- Tettenhorst, R., & Moore, G. E. (1978). Stevensite oolites from the Green River Formation of central Utah. *Journal of Sedimentary Research*, 48(2), 587–594. <https://doi.org/10.1306/212F74DC-2B24-11D7-8648000102C1865D>
- Theng, B. K. G., Orchard, V.A. (1995). Interactions of clays with microorganisms and bacterial survival in soil: A physicochemical perspective. *Environmental Impact of Soil Component Interactions*, 3, 123–139.
- Thiry. (2000). Palaeoclimatic interpretation of clay minerals in marine deposits: An outlook from the continental origin. *Earth-Science Reviews*, 49(1–4), 201–221. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(99\)00054-9](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(99)00054-9)
- Tosca, N. J., Macdonald, F. A., Strauss, J. V., Johnston, D. T., & Knoll, A. H. (2011). Sedimentary talc in Neoproterozoic carbonate successions. *Earth and Planetary Science Letters*, 306(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2011.03.041>
- Tosca, N. J., & Masterson, A. L. (2014). Chemical controls on incipient Mg-silicate crystallization at 25°C: Implications for early and late diagenesis. *Clay Minerals*, 49(2), 165–194. <https://doi.org/10.1180/claymin.2014.049.2.03>

- Tosca, N. J., & Wright, V. P. (2015). Diagenetic pathways linked to labile Mg-clays in lacustrine carbonate reservoirs: A model for the origin of secondary porosity in the Cretaceous pre-salt Barra Velha Formation, offshore Brazil. *Geological Society, London, Special Publications*, 435, SP435.1. <https://doi.org/10.1144/SP435.1>
- Tréguer, P. J., & De La Rocha, C. L. (2013). The World Ocean Silica Cycle. *Annual Review of Marine Science*, 5(1), 477–501. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-121211-172346>
- Vaccari, A. (1999). Clays and catalysis: A promising future. *Applied Clay Science*, 14(4), 161–198. [https://doi.org/10.1016/S0169-1317\(98\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0169-1317(98)00058-1)
- van Gemerden, H. (1993). Microbial mats: A joint venture. *Marine Geology*, 113(1–2), 3–25. [https://doi.org/10.1016/0025-3227\(93\)90146-M](https://doi.org/10.1016/0025-3227(93)90146-M)
- van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Konings, W. N., & Zehnder, A. J. B. (1994). Translocation of Metal phosphate via the Phosphate Inorganic Transport System of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 33(7), 1766–1770. <https://doi.org/10.1021/bi00173a020>
- Visscher, P. T., Pamela Reid, R., Bedout, B. M., Hoef, S. E., Macintyre, I. G., & Thompson, J. A. (1998). Formation of lithified micritic laminae in modern marine stromatolites (Bahamas): The role of sulfur cycling. *American Mineralogist*. <https://doi.org/10.2138/am-1998-1109>
- Visscher, P. T., Reid, R. P., & Bebout, B. M. (2000). Microscale observations of sulfate reduction: Correlation of microbial activity with lithified micritic laminae in modern marine stromatolites. *Geology*, 28(10), 919–922. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(2000\)28<919:MOOSRC>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(2000)28<919:MOOSRC>2.0.CO;2)
- Visscher, P. T., & Stolz, J. F. (2005). Microbial mats as bioreactors: Populations, processes, and products. In N. Noffke (Éd.), *Geobiology: Objectives, Concepts, Perspectives* (p. 87–100). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52019-7.50009-7>
- Waditee, R., Hossain, G. S., Tanaka, Y., Nakamura, T., Shikata, M., Takano, J., ... Takabe, T. (2004). Isolation and Functional Characterization of Ca²⁺/H⁺ Antiporters from Cyanobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4330–4338. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310282200>
- Walter, M. R. (1976). *Stromatolites*. Elsevier.
- Warren, J. K. (2006). *Evaporites: Sediments, Resources and Hydrocarbons*. Springer Science & Business Media.
- Weaver, C. E., & Beck, K. C. (1977). Miocene of the S.E. United States: A model for chemical sedimentation in a peri-marine environment. *Sedimentary Geology*, 17(1–2), IX–234. [https://doi.org/10.1016/0037-0738\(77\)90062-8](https://doi.org/10.1016/0037-0738(77)90062-8)
- Webster, D. M., & Jones, B. F. (1994). Paleoenvironmental Implications of Lacustrine Clay Minerals from the Double Lakes Formation, Southern High Plains, Texas. http://archives.datapages.com/data/sepm_sp/SP50/Paleoenvironmental_Implications.htm

- Weiner, S., & Dove, P. M. (2003). An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1), 1–29. <https://doi.org/10.2113/0540001>
- Williams, D. H., & Fleming, I. (1996). Spectroscopic methods in organic chemistry (5th ed.). London: McGraw-Hill International Ltd.
- Wilkins, R. W. T., & Ito, J. (1967). Infrared Spectra of some Synthetic Talcs. *American Mineralogist*, 52(11–12), 1649–1661.
- Wilson, M. J. (1999). The origin and formation of clay minerals in soils: Past, present and future perspectives. *Clay Minerals*, 34(1), 7–25. <https://doi.org/10.1180/000985599545957>
- Wollast, R., Mackenzie, F. T., & Bricker, O. P. (1968). Experimental precipitation and genesis of sepiolite at earth-surface conditions. *American Mineralogist*, 53(9–10), 1645–1662.
- Wong, P. T., Wong, R. K., Caputo, T. A., Godwin, T. A., & Rigas, B. (1991). Infrared spectroscopy of exfoliated human cervical cells: Evidence of extensive structural changes during carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(24), 10988–10992. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.10988>
- Wright, V. P. (2012). Lacustrine carbonates in rift settings: The interaction of volcanic and microbial processes on carbonate deposition. *Geological Society, London, Special Publications*, 370(1), 39–47. <https://doi.org/10.1144/SP370.2>
- Yamaoka, T., Satoh, K., & Katoh, S. (1978). Photosynthetic activities of a thermophilic blue-green alga. *Plant and Cell Physiology*, 19(6), 943–954. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a075684>
- Yoreo, J. J. D., & Vekilov, P. G. (2003). Principles of Crystal Nucleation and Growth. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1), 57–93. <https://doi.org/10.2113/0540057>
- Zeroual, W., Choisy, C., Maria Doglia, S., Bobichon, H., Angiboust, J.-F., & Manfait, M. (1994). Monitoring of bacterial growth and structural analysis as probed by FT-IR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1222(2), 171–178. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)90166-X](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90166-X)
- Zeyen, N., Benzerara, K., Li, J., Groleau, A., Balan, E., Robert, J.-L., ... López-García, P. (2015). Formation of low-T hydrated silicates in modern microbialites from Mexico and implications for microbial fossilization. *Frontiers in Earth Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/feart.2015.00064>
- Zeyen, N. (2016). Etude de microbialites lacustres actuels du Mexique : Traçage de l'activité biologique et des conditions environnementales de formation. <http://www.theses.fr/2016PA066710>
- Zeyen, N., Daval, D., Lopez-Garcia, P., Moreira, D., Gaillardet, J., & Benzerara, K. (2017). Geochemical Conditions Allowing the Formation of Modern Lacustrine Microbialites. *Procedia Earth and Planetary Science*, 17, 380–383. <https://doi.org/10.1016/j.proeps.2016.12.096>

Annexes

Tableau A1 : Ici sont présentés les différents échantillons de sédiment correspondant aux 3 lacs mexicains étudiés ainsi que l'ensemble des % massiques des oxydes obtenus en ICP-OES. PF : perte au feu. L.D. signifie que la valeur mesurée est en-dessous du seuil de détection.

| Echantillons | SiO ₂ | Al ₂ O ₃ | Fe ₂ O ₃ | MnO | MgO | CaO | Na ₂ O | K ₂ O | TiO ₂ | P ₂ O ₅ | PF | Total |
|----------------|------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------------------|-------|--------|
| AL2016-C1_1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| AL2016-C1_2 | 40,15 ± 0,40 | 5,29 ± 0,53 | 1,88 ± 0,04 | 0,05 ± 0,005 | 7,21 ± 0,14 | 12,06 ± 0,24 | 2,75 ± 0,14 | 0,98 ± 0,05 | 0,20 ± 0,02 | 0,19 ± 0,02 | 29,80 | 100,54 |
| AL2016-C1_3 | 39,91 ± 0,40 | 4,91 ± 0,49 | 1,79 ± 0,04 | 0,05 ± 0,005 | 7,09 ± 0,14 | 12,71 ± 0,25 | 2,70 ± 0,13 | 0,94 ± 0,05 | 0,18 ± 0,02 | 0,18 ± 0,02 | 30,17 | 100,61 |
| AL2016-C1_4 | 40,31 ± 0,40 | 5,47 ± 0,55 | 1,92 ± 0,04 | 0,05 ± 0,005 | 7,36 ± 0,15 | 13,30 ± 0,27 | 2,54 ± 0,13 | 0,98 ± 0,05 | 0,20 ± 0,02 | 0,18 ± 0,02 | 28,55 | 100,85 |
| AL2016-C1_5 | 42,52 ± 0,43 | 6,02 ± 0,60 | 2,09 ± 0,04 | 0,05 ± 0,005 | 7,43 ± 0,15 | 12,66 ± 0,25 | 2,61 ± 0,13 | 1,05 ± 0,05 | 0,22 ± 0,02 | 0,18 ± 0,02 | 25,88 | 100,70 |
| AL2016-C1_6 | 42,50 ± 0,43 | 6,24 ± 0,62 | 2,11 ± 0,04 | 0,06 ± 0,006 | 8,80 ± 0,18 | 12,56 ± 0,25 | 3,73 ± 0,19 | 1,13 ± 0,06 | 0,22 ± 0,02 | 0,17 ± 0,02 | 23,65 | 101,16 |
| AL2016-C1_7 | 44,08 ± 0,44 | 6,37 ± 0,64 | 2,13 ± 0,04 | 0,06 ± 0,006 | 10,90 ± 0,22 | 10,14 ± 0,20 | 3,38 ± 0,17 | 1,11 ± 0,06 | 0,23 ± 0,02 | 0,18 ± 0,02 | 21,82 | 100,39 |
| AL2016-C1_8 | 41,12 ± 0,41 | 6,23 ± 0,62 | 2,10 ± 0,04 | 0,06 ± 0,006 | 9,73 ± 0,19 | 13,34 ± 0,27 | 3,33 ± 0,17 | 1,08 ± 0,05 | 0,23 ± 0,02 | 0,17 ± 0,02 | 23,50 | 100,89 |
| AL2016-C1_9 | 39,56 ± 0,40 | 6,25 ± 0,63 | 1,99 ± 0,04 | 0,06 ± 0,006 | 9,06 ± 0,18 | 15,82 ± 0,32 | 2,85 ± 0,14 | 1,05 ± 0,05 | 0,23 ± 0,02 | 0,17 ± 0,02 | 23,16 | 100,20 |
| AL2016-C1_10 | 39,71 ± 0,40 | 6,58 ± 0,66 | 2,04 ± 0,04 | 0,06 ± 0,006 | 9,51 ± 0,19 | 14,58 ± 0,29 | 2,87 ± 0,14 | 1,09 ± 0,05 | 0,24 ± 0,02 | 0,17 ± 0,02 | 22,91 | 99,75 |
| AL2016-C2_1 | 11,24 ± 0,11 | 2,64 ± 0,26 | 0,75 ± 0,04 | 0,02 ± 0,002 | 27,27 ± 0,55 | 7,77 ± 0,16 | 1,51 ± 0,08 | 0,47 ± 0,05 | 0,09 ± 0,01 | < L.D. | 48,28 | 100,03 |
| AL2016-C2_2 | 10,53 ± 0,11 | 2,55 ± 0,26 | 0,73 ± 0,04 | 0,02 ± 0,002 | 27,62 ± 0,55 | 8,69 ± 0,17 | 1,21 ± 0,06 | 0,42 ± 0,04 | 0,09 ± 0,01 | < L.D. | 48,02 | 99,89 |
| AL2016-C2_3 | 10,60 ± 0,11 | 2,58 ± 0,26 | 0,74 ± 0,04 | 0,02 ± 0,002 | 27,90 ± 0,56 | 8,83 ± 0,18 | 1,10 ± 0,06 | 0,42 ± 0,04 | 0,09 ± 0,01 | < L.D. | 47,79 | 100,07 |
| AL2016-C2_4 | 9,4 ± 0,47 | 2,32 ± 0,23 | 0,68 ± 0,03 | 0,02 ± 0,002 | 28,86 ± 0,58 | 8,66 ± 0,17 | 1,00 ± 0,05 | 0,38 ± 0,04 | 0,08 ± 0,01 | < L.D. | 48,61 | 100,08 |
| AL2016-C2_5 | 9,61 ± 0,48 | 2,35 ± 0,24 | 0,69 ± 0,03 | 0,02 ± 0,002 | 28,04 ± 0,56 | 9,43 ± 0,19 | 0,96 ± 0,05 | 0,38 ± 0,04 | 0,08 ± 0,01 | < L.D. | 48,50 | 100,07 |
| AL2016-C2_6 | 9,21 ± 0,46 | 2,36 ± 0,24 | 0,72 ± 0,04 | 0,02 ± 0,002 | 28,67 ± 0,57 | 9,73 ± 0,19 | 0,85 ± 0,04 | 0,37 ± 0,04 | 0,08 ± 0,01 | < L.D. | 47,88 | 99,88 |
| Prec2016-C3_7 | 26,46 ± 0,26 | 5,00 ± 0,50 | 1,79 ± 0,04 | 0,08 ± 0,008 | 1,81 ± 0,09 | 29,75 ± 0,60 | 1,22 ± 0,06 | 0,72 ± 0,04 | 0,17 ± 0,02 | 0,20 ± 0,02 | 31,89 | 99,07 |
| Prec2016-C3_8 | 25,88 ± 0,26 | 4,38 ± 0,44 | 1,65 ± 0,03 | 0,08 ± 0,008 | 1,85 ± 0,09 | 31,59 ± 0,63 | 1,02 ± 0,05 | 0,62 ± 0,03 | 0,15 ± 0,02 | 0,19 ± 0,02 | 33,12 | 100,52 |
| Prec2016-C3_9 | 29,64 ± 0,30 | 5,48 ± 0,55 | 1,95 ± 0,04 | 0,08 ± 0,008 | 1,83 ± 0,09 | 27,44 ± 0,55 | 1,19 ± 0,06 | 0,73 ± 0,04 | 0,19 ± 0,02 | 0,17 ± 0,02 | 29,83 | 98,51 |
| Prec2016-C3_10 | 31,42 ± 0,31 | 6,38 ± 0,64 | 2,03 ± 0,04 | 0,09 ± 0,009 | 1,80 ± 0,09 | 26,86 ± 0,54 | 1,39 ± 0,07 | 0,89 ± 0,04 | 0,22 ± 0,02 | 0,17 ± 0,02 | 28,41 | 99,67 |
| Atx2016-C4_1 | 19,42 ± 0,19 | 2,41 ± 0,24 | 1,29 ± 0,03 | 0,05 ± 0,005 | 4,21 ± 0,21 | 35,22 ± 0,70 | 1,26 ± 0,06 | 0,43 ± 0,04 | 0,08 ± 0,01 | < L.D. | 34,80 | 99,16 |
| Atx2016-C4_2 | 22,15 | 2,75 | 1,32 ± 0,03 | 0,06 ± 0,006 | 5,90 | 33,42 | 1,28 ± 0,06 | 0,45 ± 0,05 | 0,10 ± 0,01 | < L.D. | 32,94 | 100,36 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------|-------|--|
| | $\pm 0,22$ | $\pm 0,28$ | | | $\pm 0,12$ | $\pm 0,67$ | | | | | | | |
| Atx2016-C4_3 | 24,32 | 3,86 | 1,64 | 0,06 | 5,23 | 31,86 | 1,43 | 0,56 | 0,16 | 0,10 | 30,71 | 99,93 | |
| | $\pm 0,24$ | $\pm 0,37$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,006$ | $\pm 0,10$ | $\pm 0,64$ | $\pm 0,07$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,01$ | | | |
| Atx2016-C4_4 | 24,32 | 4,15 | 1,74 | 0,07 | 5,01 | 31,49 | 1,47 | 0,58 | 0,18 | 0,10 | 30,47 | 99,55 | |
| | $\pm 0,24$ | $\pm 0,42$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,007$ | $\pm 0,10$ | $\pm 0,63$ | $\pm 0,07$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,02$ | $\pm 0,01$ | | | |
| Atx2016-C4_5 | 19,12 | 2,90 | 1,32 | 0,06 | 4,36 | 36,06 | 1,26 | 0,41 | 0,12 | < L.D. | 34,06 | 99,67 | |
| | $\pm 0,19$ | $\pm 0,29$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,006$ | $\pm 0,22$ | $\pm 0,72$ | $\pm 0,06$ | $\pm 0,04$ | $\pm 0,01$ | | | | |

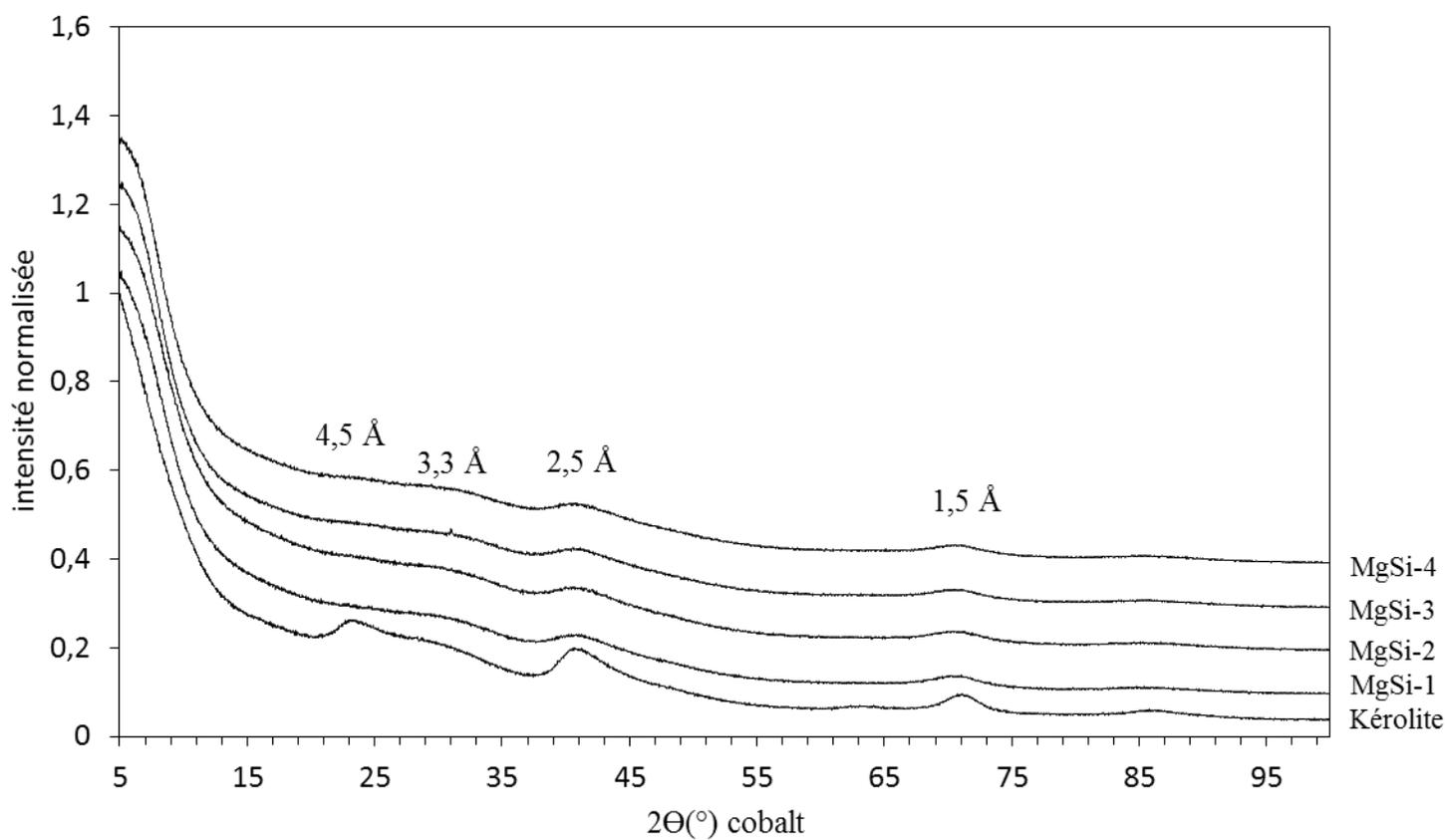


Figure A1. Diffractogrammes des synthèses de kérolite et de la référence synthétisée à 90 °C et 1 bar

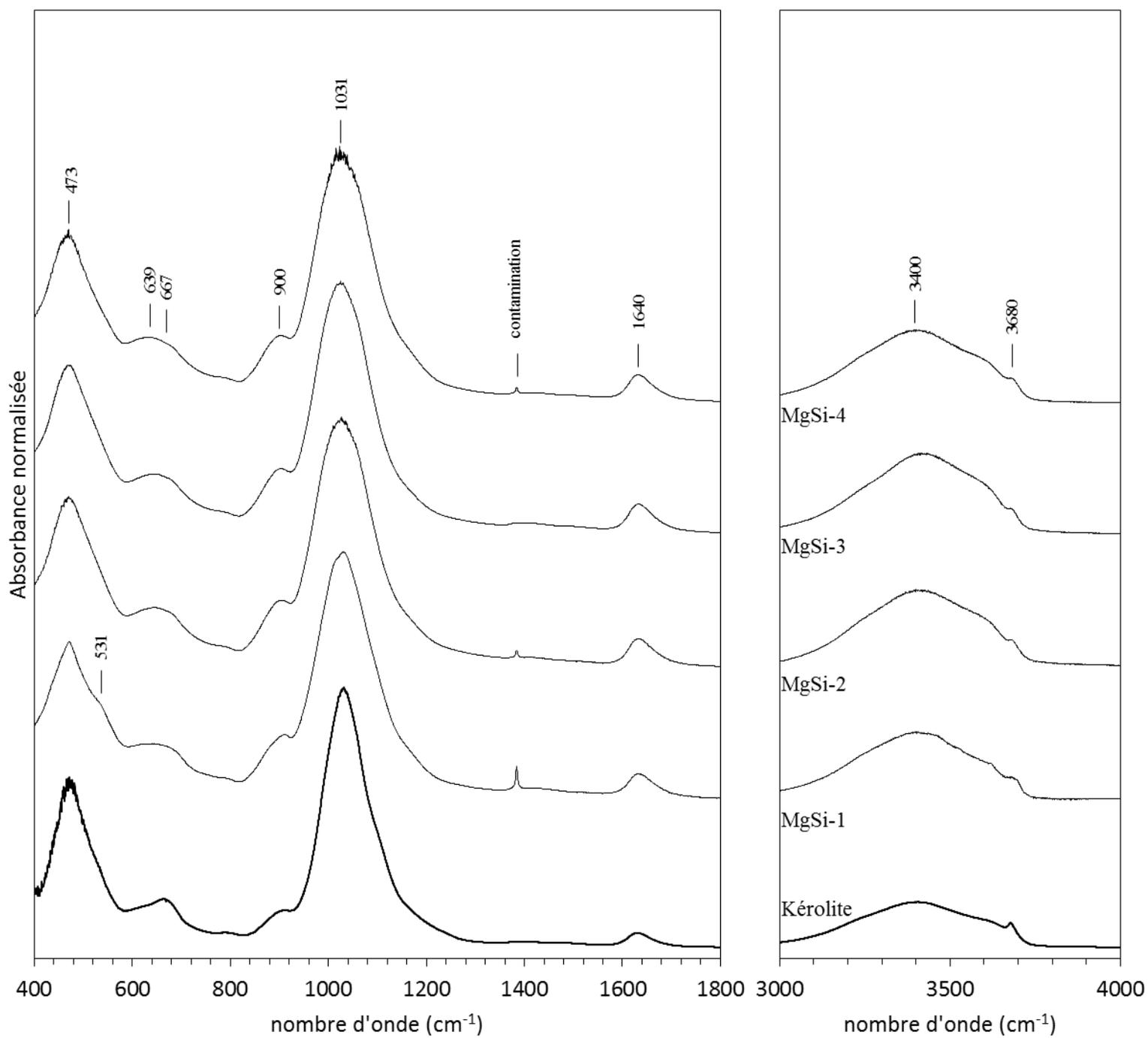


Figure A2. Spectres infrarouges des synthèses de kéroilite et de la kéroilite synthétisée à 90 °C et 1 bars.

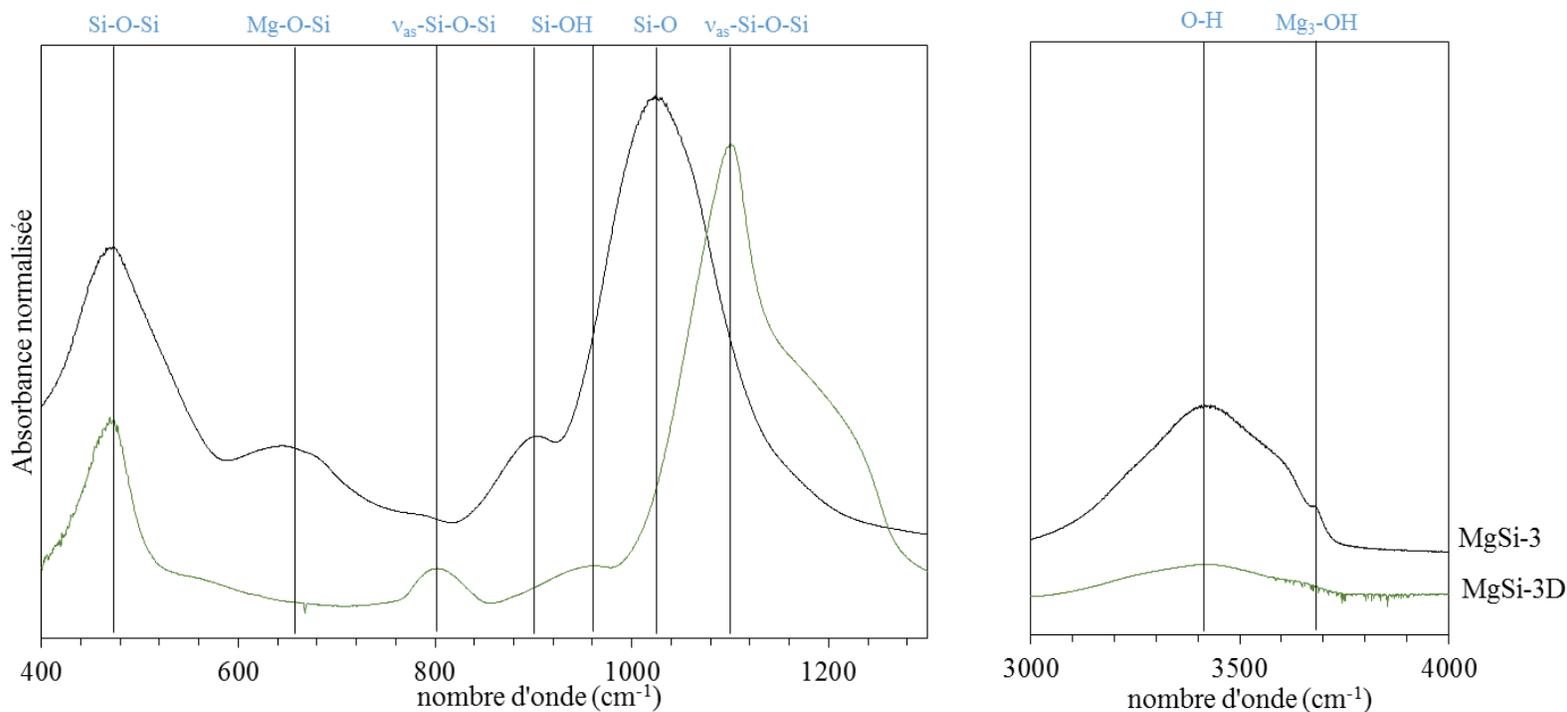


Figure A3. Spectres infrarouges de synthèse de kérolyte MgSi-3 (en noir) et de la même synthèse après décarbonatation (en vert).

On voit l'apparition de bande d'absorption associée à la silice amorphe et disparition de la bande des vibrations Mg_3-OH en FTIR après décarbonatation. De plus on va un décalage vers la droite de la bande des vibrations Si-O. Dans le détail, on trouve une bande symétrique à 800 cm^{-1} , caractéristique des vibrations des atomes de Si dans une liaison siloxane et est appelée $\nu_{as}\text{-Si-O-Si}$ (Swann et Patwardhan, 2011). Une large bande observée à 1100 cm^{-1} correspondant au mouvement antisymétrique d'atomes de Si dans des liaisons siloxanes ($\nu_{as}\text{-Si-O-Si}$). Ce large pic comprend trois composantes : (i) un large épaulement centré sur $1115\text{--}1130\text{ cm}^{-1}$, affecté au mode optique longitudinal (LO $\nu_{as}\text{-Si-O-Si}$) ; (ii) un pic fort centré à $1035\text{--}1045\text{ cm}^{-1}$ (mode optique transverse TO $\nu_{as}\text{-Si-O-Si}$) ; et (iii) une faible absorption à 950 cm^{-1} due aux vibrations d'étirement du silanol (Si-OH) (Swann et Patwardhan, 2011).

Plusieurs composés de référence ont été sélectionnés. Ces échantillons sont des produits synthétiques réalisés par Jean-Louis Robert (IMPMC) : une saponite ($\text{Na}_{0,4}\text{Mg}_3(\text{Al}_{0,4}\text{Si}_{3,6})\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) synthétisée à 400°C et 1kbar et une kérolite de formule chimique $\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, synthétisée à 90°C et 500 bars. De plus, l'échantillon d'hydromagnésite a été acheté dans le commerce (Sigma). Ici je présente les spectres obtenus en FTIR.

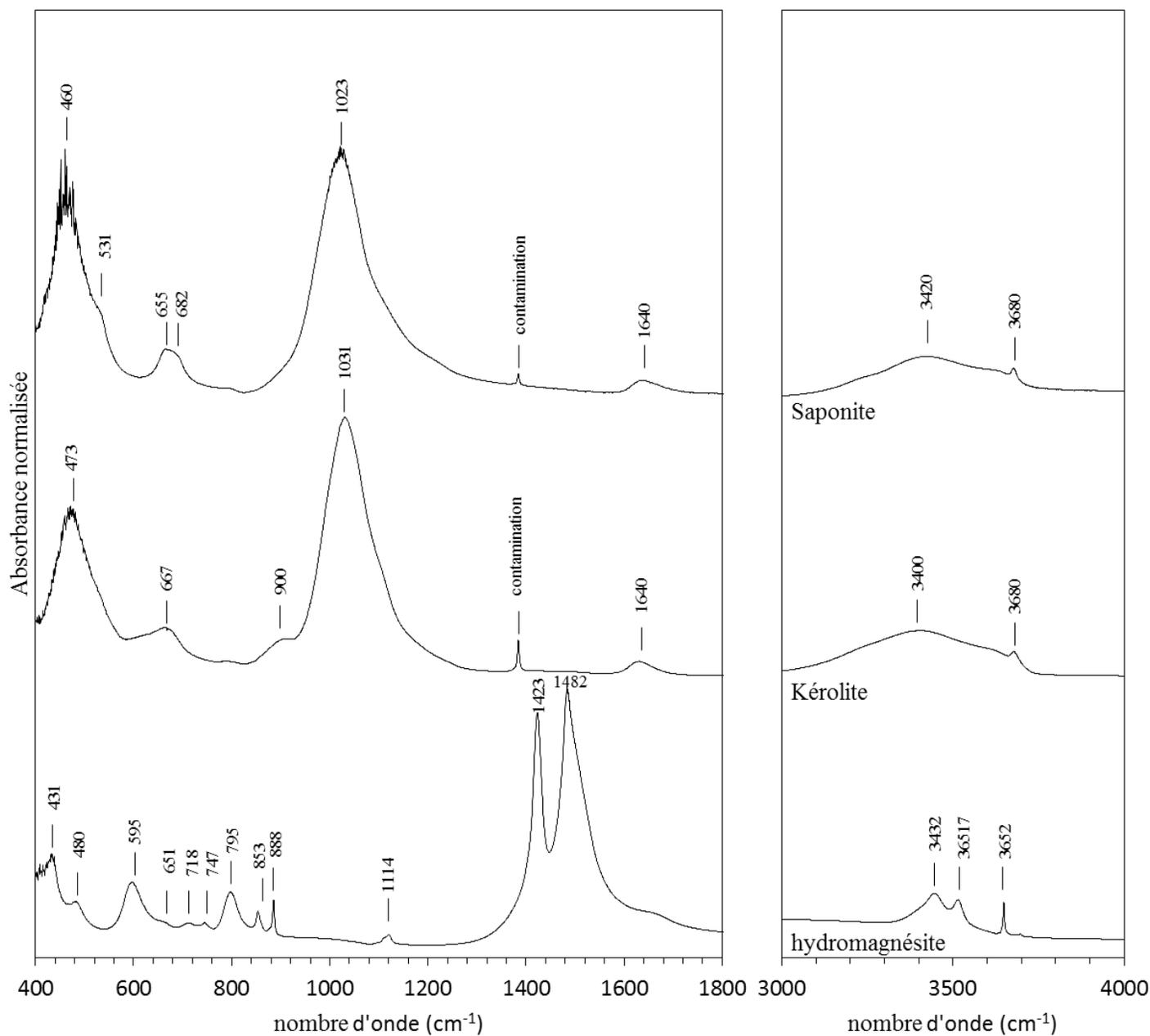


Figure A4. Spectres infrarouges de référence de l'hydromagnésite, de la kérolite et de la saponite

Résumé

Les stromatolites sont des roches organo-sédimentaires laminées composées de carbonates de Ca et/ou Mg mais également de silicates de Mg dans certains cas. Les processus impliqués dans leur formation restent encore mal compris. L'objectif central de cette thèse est de mieux comprendre les processus géochimiques et géomicrobiologiques permettant de favoriser ou au contraire de défavoriser la formation des carbonates et silicates de magnésium dans les environnements lacustres alcalins mexicains. Deux axes principaux ont été développés. Le premier axe s'est focalisé sur les analyses de souches formant des carbonates de calcium amorphes (ACC) intracellulaire (ACC+) ou non. Une grande diversité de souches de cyanobactéries a été analysée pour leur capacité à incorporer le Ca. De plus, l'impact des alcalino-terreux sur la croissance de certaines de ces souches a été déterminé. A partir de cette étude, nous avons mis en évidence que les souches de cyanobactérie ACC+ incorporent plus de Ca que les autres et qu'elles le stockent principalement dans les inclusions d'ACC et dans les polyphosphates (polyP). De plus, nous avons déterminé que les souches ACC+ ont relativement plus besoin de Ca pour leur croissance et certaines d'entre elles sont capables de substituer le Ca par du Sr et Ba. Nous proposons que les inclusions d'ACC 1) peuvent servir de ballasts, 2) peuvent tamponner le pH intracellulaire et équilibrer la formation d'hydroxyde par conversion de HCO_3 en CO_2 lors de la fixation du carbone et 3) alternativement, ils peuvent servir de forme de stockage de carbone inorganique disponible pour les cellules sur des périodes limitées en C. De plus, les polyP pourraient être impliqués dans le stockage de Ca. Plus largement, les cyanobactéries ACC+ pourraient favoriser la dissolution de carbonate de Ca et par extension celle des stromatolites.

Le second axe s'est intéressé à l'étude de la formation de silicates de magnésium dans les sédiments et mésocosmes analogues de 3 lacs alcalins mexicains mais également par des expériences de biominéralisation. Les analyses minéralogiques et chimiques des silicates de magnésium ont été couplées aux caractérisations géochimiques des solutions. L'étude des sédiments a montré la formation de deux smectites, l'une pauvre et l'autre riche en Al et également de smectite ferrugineuse ou sans forte teneur en Fe. Plusieurs interprétations ont été proposées quant à leur formation : 1) la dissolution conjointe d'hydromagnésite et des frustules de silice biogénique, 2) elle est héritée de la colonne d'eau, 3) est liée à l'altération des feldspaths dans les sédiments et 4) à la biominéralisation dans la colonne d'eau. Il a également été montré qu'une souche de cyanobactéries est capable d'induire la précipitation de silicates de magnésium en milieu non tamponné. Dans les mésocosme des lacs alcalins, la formation de silicate de Mg serait directement liée à la composition minéralogique des microbialites, et possiblement des diatomées permettant l'apport de Si dans la solution et localement dans le biofilm, et est biologiquement influencée par les EPS des communautés microbiennes.

Mots clés : Stromatolites ; sédiments ; alcalinité ; biominéralisation ; silicates de magnésium ; ACC intracellulaire.

Study of the biomineralization of intracellular carbonates and hydrated magnesium silicates in alkaline lake environments

Abstract

Stromatolites are laminated organo-sedimentary rocks composed of Ca and/or Mg carbonates but also Mg-silicates in some cases. The processes involved in their formation are still poorly understood. The main goal of this thesis was to better understand the geochemical and geomicrobiological processes that favor the formation or dissolution of carbonates and Mg-silicates in Mexican alkaline lacustrine environments. Two main axes have been developed. The first axis focused on the study of 52 cyanobacterial strains, some forming ACC intracellular, others not forming ACC. The strains were analyzed for their ability to incorporate Ca. The impact of alkaline earth elements on the growth of some of the strains was determined. In this study we have shown that ACC+ cyanobacterial strains incorporate more Ca than others and they store this Ca strongly in ACC and in polyP. In addition, we determined that ACC+ strains need more Ca for their growth and some of them are capable to substitute Ca by Sr and Ba for this purpose. We propose that ACC inclusions 1) can serve as ballasts, 2) can buffer intracellular pH and balance the formation of HCO₃ conversion hydroxide to CO₂ during carbon fixation and 3) available inorganic carbon storage for carbon dioxide. In addition, polyP could be involved in Ca storage. More broadly, ACC+ cyanobacteria have contributed to the dissolution of calcium carbonate and by extension stromatolites.

The second axis focused on the study of Mg-silicate formation in sediments and mesocosms of 3 Mexican alkaline lakes but also in laboratory experiments. Mineralogical and chemical analyzes of magnesium silicates have been coupled with geochemical characterization of the solutions. The study of sediments showed the formation of an Al-low and an Al-rich stevensite-like phase and of ferrous or non-ferrous saponite-like. Several interpretations have been proposed regarding their formation: 1) dissolution of hydromagnesite and biogenic silica frustules, 2) it is inherited from the water column, 3) it is related to the alteration of feldspaths within sediments and 4) biomineralization in the water column. It has also been shown that a cyanobacterial strain was able to induce precipitation of magnesium silicates in an unbuffered medium. Mg-silicate formation in mesocosms from alkaline lakes is thought to be directly related to the mineralogical composition of microbialites, and possibly diatoms that allow Si to be introduced into the solution and locally into the biofilm and is biologically influenced by microbial community EPS.

Keywords: Stromatolites; sediments; alkalinity; biomineralization; magnesium silicates; intracellular ACC.