



HAL
open science

Les mécanismes moléculaires de la biominéralisation intracellulaire de CaCO₃ chez les cyanobactéries

Sigrid Görgen

► **To cite this version:**

Sigrid Görgen. Les mécanismes moléculaires de la biominéralisation intracellulaire de CaCO₃ chez les cyanobactéries. Sciences de la Terre. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS158 . tel-03807532

HAL Id: tel-03807532

<https://theses.hal.science/tel-03807532v1>

Submitted on 10 Oct 2022

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

École doctorale Géosciences, Ressources Naturelles et Environnement-ED398

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

Laboratoire de Biologie et Biotechnologie des cyanobactéries

Les mécanismes moléculaires de la biominéralisation intracellulaire de CaCO_3 chez les cyanobactéries

Par Sigrid Görden

Thèse de doctorat de Géobiologie

Dirigée par Karim Benzerara et Corinne Cassier-Chauvat

Devant un jury composé de :

Virginie Chapon – Directrice de recherche - Rapportrice

David Moreira - Directeur de recherche - Rapporteur

Jorge Cubo – Professeur – Examineur

Muriel Gugger – Chargée de recherche – Co-encadrante de thèse

Corinne Cassier-Chauvat – Directrice de recherche – Co-directrice de thèse

Karim Benzerara – Directeur de recherche – Directeur de thèse

2020



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

Remerciements

A Mesdames et Messieurs les membres du jury, j'exprime ma gratitude pour avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse Karim Benzerara et Corinne Cassier-Chauvat qui m'ont permis d'intégrer leur équipe pendant ces trois années. Je les remercie pour m'avoir accueillie avec bienveillance et pour la confiance qu'ils m'ont témoignée dans la réalisation de ces travaux. Grâce à leur expérience, j'ai beaucoup appris tant au niveau technique qu'au niveau scientifique.

Je remercie également Franck Chauvat, pour ses nombreux conseils scientifiques et pour le temps qu'il a passé afin de me faire partager ses connaissances.

J'exprime aussi mes remerciements chaleureux à Ferial Skouri-Panet pour sa disponibilité, sa gentillesse et son aide ainsi que ma gratitude à Cynthia Traveret pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée ces derniers mois.

Merci aussi à Laure Cordier pour sa contribution à l'ICP-AES et Margaux Coutaud pour ses explications et nos discussions.

Sans mes collègues qui sont devenus des amis, particulièrement Celia, Victoire, Dania, Adèle, Valentin, Jaysen, cette thèse n'aurait pas été aussi agréable à vivre. Célia et Victoire, vous allez me manquer. Nos moments de « biiiiip » vont me manquer ; ils ont été indispensables pour se défouler. Vous avez été précieuses pendant ces trois années. Un grand merci également à toutes les personnes du bâtiment 142, à l'équipe LBBC et à l'équipe BIOMIN.

Merci à mes amis, toujours présents, Claudine, Fred, Pedro, « les meufs », les « cocottes » et tous les autres.

Enfin, pour leur soutien constant et leurs encouragements, je remercie chaleureusement ma famille, ma sœur, Justin, Constance, Jonas et bien sûr les plus importants de tous mes parents. Merci à mon père pour ses petits plats car « quand l'appétit va, tout va ». Merci à ma mère à qui je dois beaucoup.

Avant-propos

Mon travail de thèse présenté dans ce manuscrit est le résultat d'expériences menées pendant trois années dans l'équipe BIOMIN de l'Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie et dans le laboratoire de Biologie et Biotechnologie des Cyanobactéries au Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives de Saclay, sous la direction du Dr Karim Benzerara et du Dr Corinne Cassier-Chauvat. Cette thèse a été financée par le programme doctoral « Interface pour le vivant ». En effet, pour mener à bien mon projet intitulé « les mécanismes moléculaires de la biominéralisation intracellulaire de CaCO_3 chez les cyanobactéries » une approche pluridisciplinaire a pu être mise en oeuvre grâce à la complémentarité d'expertises et d'accès à diverses plateformes des deux laboratoires.

La biominéralisation de carbonate de calcium est un processus répandu chez les bactéries, cependant les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore mal compris. Avant de rentrer dans le détail de mon travail de thèse, j'ai décidé d'introduire le sujet par une revue (invited review soumise à BMC materials) faisant le point sur les connaissances acquises sur la formation des carbonates de calcium dans diverses bactéries. A l'heure actuelle, différents modes de minéralisation de carbonate de calcium produits par des bactéries peuvent être distingués selon qu'ils sont influencés (par des molécules organiques extracellulaires), induits (par l'activité métabolique) ou contrôlés (par des gènes spécifiques). Dans les deux premiers cas, la minéralisation se produit généralement à l'extérieur des cellules, tandis que c'est un processus intracellulaire dans les deux exemples de biominéralisation contrôlée découverts à ce jour. Bien que dans le troisième cas, la cellule contrôle le lieu de nucléation, la croissance, la composition du minéral formé *etc.*, aucun gène impliqué dans l'une ou l'autre de ces étapes n'a encore été identifié à ce jour.

Ma thèse s'inscrit dans le but d'identifier et de caractériser des acteurs moléculaires impliqués dans la formation contrôlée d'inclusions intracellulaires de CaCO_3 par certaines espèces de cyanobactéries et de tenter de comprendre le rôle de ce processus. Mon travail de thèse a consisté à développer une approche génétique (création de mutants) couplée à une analyse phénotypique en utilisant des méthodes de microscopie (MEB, STXM, CEMOVIS) et d'analyses chimiques (ICP-AES).

Plusieurs stratégies ont été développées en parallèle et seront présentées dans les divers chapitres correspondants. Pour chacune de ces stratégies, les résultats obtenus seront discutés et des perspectives seront proposées à la fin de chaque chapitre. Enfin des perspectives à long terme ainsi que des méthodes à développer pour mieux appréhender la formation de carbonates de calcium intracellulaires chez les cyanobactéries seront énoncées.

Abréviations	9
Introduction	10
I. Mécanismes moléculaires de la formation de carbonate par les bactéries.....	10
II. Le gène <i>ccyA</i>, un gène orphelin, marqueur de la biominéralisation intracellulaire chez les cyanobactéries ?.....	64
A. Découverte d'un gène candidat : <i>ccyA</i>	67
B. Prédictions bio-informatiques de la protéine Calcyanine.....	68
C. Approche biochimique : expression hétérologue de <i>ccyA</i> chez <i>E. coli</i>	71
III. Approches génétiques sur les cyanobactéries	72
A. Les mécanismes de transfert latéral de gènes	72
1. La transformation naturelle.....	72
2. La conjugaison	77
B. Les cyanobactéries génétiquement manipulables.....	78
IV. Problématiques de mon travail de thèse.....	83
Chapitre 1 : Délétion du gène <i>ccyA</i> chez des souches formant des inclusions de carbonate intracellulaires	85
I. Introduction.....	85
II. Sélection des souches pour la génétique.....	85
A. Présélection de 7 souches à partir de critères généraux	85
B. Sélection des deux souches candidates pour une approche génétique.....	89
1. <i>Gloeomargarita lithophora</i>	90
2. <i>Neosynechococcus sphagnicola</i> Sy1	92
3. <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6716.....	93
4. <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6717.....	95
5. <i>Synechococcus calcipolaris</i> PCC 11701	95
6. <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	97
7. <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312.....	100
8. Amplification de <i>ccyA</i> par PCR.....	101
a) <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425.....	102
b) <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312	103
C. Revue des connaissances sur les deux souches sélectionnées.....	104
1. <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	104
2. <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312.....	105
III. Délétion du gène <i>ccyA</i>.....	107
A. Stratégie choisie	107
B. Construction des plasmides de délétion de <i>ccyA</i>	107
1. Principe de l'approche.....	107
2. Construction de la cassette de délétion de <i>ccyA</i> _{C,7425}	108
3. Construction de la cassette de délétion de <i>ccyA</i> _{S,6312}	111
C. Manipulations génétiques	114
1. Introduction par transformation naturelle.....	114
a) Chez <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	116
b) Chez <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312	116
2. Introduction par électroporation.....	118
a) Chez <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	120
b) Chez <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312	122
D. Discussion	122
E. Perspectives	129

Chapitre 2 : Expression du gène <i>ccyA</i> dans des souches ne formant pas d'inclusions intracellulaires de CaCO ₃	132
I. Introduction.....	132
A. Choix des châssis cyanobactériens.....	132
1. <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	132
2. <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	133
B. Choix des gènes <i>ccyA</i> étudiés.....	134
II. Construction des plasmides d'expression et introduction dans les souches modèles	135
III. Analyse de l'effet de l'expression du <i>ccyA</i> sur la croissance en présence de diverses concentrations en calcium.....	139
A. Comparaison de la croissance des mutants et des souches sauvages dans des milieux de croissance contenant différentes concentrations en calcium.....	139
1. Croissance de la souche sauvage et des mutants de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 exprimant <i>ccyA</i>	139
2. Croissance de la souche sauvage et des mutants de <i>S. elongatus</i> PCC 7942 exprimant <i>ccyA</i> 144	
IV. L'expression de <i>ccyA</i> influence-t-elle l'incorporation du calcium et sa distribution ? ...	148
A. Quantification du calcium incorporé par les cellules par ICP-AES.....	148
1. Suivi du calcium solution avec les mutants <i>ccyA</i> _{Gloeo} et <i>ccyA</i> _{S.11701} chez <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	148
2. Suivi du calcium en solution avec les mutants <i>ccyA</i> _{Gloeo} , <i>ccyA</i> _{S.11701} et <i>ccyA</i> _{S.6312} chez <i>S. elongatus</i> PCC 7942	150
B. Observation des mutants de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 par microscopie.....	152
1. Microscopie électronique à balayage.....	152
2. Scanning transmission X-ray microscopy.....	156
V. L'expression de <i>ccyA</i> induit-elle l'apparition de structures liées aux carbonates ?	161
A. Observation de l'ultrastructure des cellules par cryo-microscopie électronique en transmission	161
VI. Discussion	164
VII. Perspectives	168
Chapitre 3 : Localisation cellulaire de la protéine Calcyanine	170
I. Introduction.....	170
A. Design des constructions et des plasmides	170
1. Choix des protéines Ccya à fusionner	170
2. Choix des souches dans lesquelles nous avons introduit les protéines de fusion.....	171
3. Choix de la protéine fluorescente utilisée	171
4. Choix du vecteur d'expression.....	172
5. Choix des emplacements relatifs aux gènes <i>egfp</i> et <i>ccyA</i>	172
6. Choix du linker.....	172
II. Manipulations génétiques	174
A. Introduction des plasmides dans <i>E. coli</i>	174
B. Introduction des plasmides dans divers châssis cyanobactériens.....	177
1. Localisation de la Calcyanine chez <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312.....	177
2. Localisation de la Calcyanine chez <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942.....	180
III. Discussion	183
IV. Perspectives.....	184

Matériels et Méthodes	186
I. Les souches utilisées, leurs conditions de culture et leur conservation.....	186
A. Les souches de cyanobactéries et d' <i>Escherichia coli</i>	186
B. Les conditions de culture	188
C. La congélation.....	189
II. Construction et vérification des plasmides.....	189
A. Les plasmides utilisés	189
B. Extraction, purification et concentration des ADN.....	192
1. Extraction et purification des plasmides à partir de souches d' <i>Escherichia coli</i>	192
2. Purification des produits de PCR.....	192
3. Purification des ADN après digestion	192
4. Concentration d'ADN.....	193
C. Obtention des fragments d'ADN et vérification des plasmides par PCR.....	193
1. Par Polymerase Chain Reaction	193
a) Taq polymérase.....	193
b) Phusion polymérase.....	194
c) PCR sur colonies à partir de cellules d' <i>Escherichia coli</i> et de cyanobactéries	194
d) Vérification des clones d' <i>Escherichia coli</i> et de cyanobactéries	195
D. Construction des plasmides	200
1. Digestion enzymatique et ligation	200
a) Clonage des cassettes de délétion de <i>ccyA</i>	201
b) Clonage des cassettes d'expression du <i>ccyA</i>	201
c) Clonage des cassettes d'expression du gène fusion <i>ccyA-egfp</i>	202
d) Linéarisation des plasmides pour les expériences de transformation	202
2. Assemblage des cassettes de délétion par la technique Gibson.....	202
E. Vérification des plasmides par séquençage.....	206
III. Obtention des mutants d'<i>Escherichia coli</i> et de cyanobactéries	206
A. La transformation	206
1. Chez <i>Escherichia coli</i>	206
2. Chez les cyanobactéries	206
a) Transformation naturelle.....	206
b) Transformation par électroporation.....	207
B. La conjugaison.....	207
IV. Analyses en microscopie et analyses chimiques.....	209
A. CEMOVIS.....	209
B. Microscopie électronique à transmission (MET)	209
C. Microscope optique et confocal à balayage laser.....	209
D. Microscopie électronique à balayage.....	209
E. Analyses par Scanning Transmission X-ray Microscopy (STXM).....	210
F. Analyses chimiques des solutions.....	210
Conclusion	211
Perspectives Générales.....	213
Bibliographie.....	218
ANNEXE	234
Résumé.....	261

Abréviations

- AA : acides aminés
- ACC : amorphous calcium carbonate
- Amp^R : ampicilline résistante
- Ba : baryum
- C-ter : C-terminal
- Ca : calcium
- CCM : mécanisme de concentration du carbone
- CEMOVIS : cryo-electron microscopy vitreous section
- CLSM :
- Cm : chloramphénicol
- D.O : densité optique
- *E. coli* : *Escherichia coli*
- EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
- EDXS : spectroscopie de rayon X à dispersion d'énergie
- eGFP : enhanced green fluorescent protein
- EPS : exopolysaccharides
- Fw : forward
- HCA : hydrophobic cluster analysis
- HMA : heavy metal associated-domain
- iACC : intracellular amorphous calcium carbonate
- ICP-AES : inductively coupled plasma – atomic emission spectroscopy
- Km : kanamycine
- MCS : sites multiples de clonage
- MEB : microscopie électronique à balayage
- MET : microscopie électronique à transmission
- MBD : metal binding protein
- MM : milieu minéral
- Nt : nucleotides
- N-ter : N-terminal
- Pb : paire de bases
- PCR : polymerase chain reaction
- RBS : ribosome binding site
- RH : recombinaison homologue
- R-M : système de restriction-modification
- RT-PCR : reverse Transcriptase polymerase chain reaction
- Rv : reverse
- Sm : streptomycine
- Sp : spectinomycine
- Sr : strontium
- STXM : scanning transmission X-ray microscopy
- WT : wild-type (souche sauvage)

Introduction

I. Mécanismes moléculaires de la formation de carbonate par les bactéries

Cette thèse porte sur les mécanismes moléculaires de la biominéralisation intracellulaire des carbonates par les cyanobactéries. Afin de replacer le processus de biominéralisation des carbonates dans un contexte plus large de la formation de minéraux par les bactéries, j'expose, en introduction, un article de synthèse que nous avons soumis sur invitation dans un numéro spécial de la revue BMC Materials et intitulé « The Role of Organic Matrices in Biomineralization ».

Cette revue porte sur la diversité des processus intervenant dans la formation des carbonates par les bactéries, dont les acteurs moléculaires et les mécanismes sont encore peu connus contrairement aux connaissances acquises sur les Eucaryotes. La revue aborde les trois types de minéralisation : celle qui est influencée par des molécules organiques extracellulaires, celle considérée comme induite par l'activité métabolique des organismes et enfin celle contrôlée par des acteurs spécifiques (gènes, protéines). Elle aborde aussi la localisation des carbonates de calcium extracellulaires ou intracellulaires du précipité et leur rôle. L'avantage pour les bactéries de précipitation du carbonate a aussi été discuté.

Nous avons dans le cadre de cet article de synthèse souligné l'importance de progresser dans la connaissance des nombreux mécanismes moléculaires de la biominéralisation des carbonates par les bactéries ; notamment afin de pouvoir utiliser plus efficacement à l'avenir les nombreuses données omics qui commencent à être produites et au sein desquelles on peut vraisemblablement trouver des informations importantes sur les capacités des écosystèmes microbiens (par exemple les stromatolites) à biominéraliser. Le manuscrit est à ce jour en cours d'évaluation.

1 **The diversity of molecular mechanisms of carbonate biomineralization by bacteria**

2

3 Görge Sigrīd^{1,3}, Benzerara Karīm¹, Skouri-Panet Fériel¹, Gugger Muriel², Chauvat Franck³,

4 Cassier-Chauvat Corinne³

5

6 ¹Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, Sorbonne Université,

7 UMR CNRS 7590, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

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

9 ³Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC),
10 91198, Gif-sur-Yvette, France

11

12 Corresponding author: Karim Benzerara, karim.benzerara@sorbonne-universite.fr

13

14 To be submitted to BMC, Special volume: *"The Role of Organic Matrices in*
15 *Biomineralization"*

16

17

18 Acknowledgments:

19 This work was supported by the French National Research Agency (HARLEY: ANR-19-CE44-

20 0017) and the Action Transversale du Muséum (ATM, MNHN). Sigrid Görge's PhD was

21 supported by the program Interfaces pour le vivant from Sorbonne University.

22

23

24

25

26 **Abstract**

27 Although biomineralization of CaCO₃ is widespread in Bacteria and Archaea, the molecular
28 mechanisms involved in this process remain less known than those used by Eukaryotes. A better
29 understanding of these mechanisms is crucial for a broad diversity of studies including those (i)
30 aiming at assessing the role of bacteria in the geochemical cycles of Ca and C, (ii) investigating
31 the process of fossilization, and (iii) engineering applications using bacterially mediated CaCO₃
32 mineralization. Different types of bacterially-mediated mineralization modes have been
33 distinguished depending on whether they are influenced (by extracellular organic molecules),
34 induced (by metabolic activity) or controlled (by specific genes). In the first two types,
35 mineralization is usually extracellular, while it is intracellular for the two ascertained cases of
36 controlled bacterial mineralization. In this review, we list a large number of cases illustrating
37 the three different modes of bacterially-mediated CaCO₃ mineralization. Overall, this shows
38 the broad diversity of metabolisms, organic molecules and thereby microorganisms that can
39 biomineralize CaCO₃. In the future, the increasing number of (meta)-omics studies will help to
40 estimate the significance of bacterially mediated CaCO₃ mineralization, providing an improved
41 understanding of the mechanisms involved.

42

43

44 **Keywords**

45

46 Prokaryote; biologically-influenced mineralization; biologically-induced mineralization;
47 biologically-controlled mineralization; alkalinity engine; MICP; heterogeneous nucleation;
48 ACC; exopolymeric substances

49

50

51

52 **Introduction**

53

54 Here, we define biomineralization in the broadest sense as the process by which organisms form
55 minerals, i.e. including both indirect and controlled formation pathways. Although
56 biomineralization has been extensively studied in eukaryotes, it is also widespread among
57 Bacteria and Archaea [1, 2].

58 Bacterial biomineralization has been known for more than a century. Ehrenberg discovered the
59 iron-oxidizer *Gallionella ferruginea* in 1838, which biomineralizes iron oxyhydroxides on
60 extracellular stalks [3]. Schewiakoff in 1893 described intracellular biomineralization by
61 *Achromatium oxaliferum*, although at that time the taxonomic affiliation of this giant sulfur
62 bacterium was uncertain and the identity of the biominerals misidentified [4]. In 1903, Nadson
63 showed that calcium carbonate deposits in Lake Veisowe, Russia, could have originated from
64 bacterial activity [5]. Later on, Drew in 1911 suggested that marine denitrifying bacteria played
65 an active role in the precipitation of calcium carbonates with a potential geological significance
66 of this process [6]. Kalkowsky in 1908 coined the word stromatolite (Stromatolith) insisting on
67 the importance of microorganisms in the formation of these carbonate rocks [7], which are now
68 known to be populated by a high diversity of microbes [8].

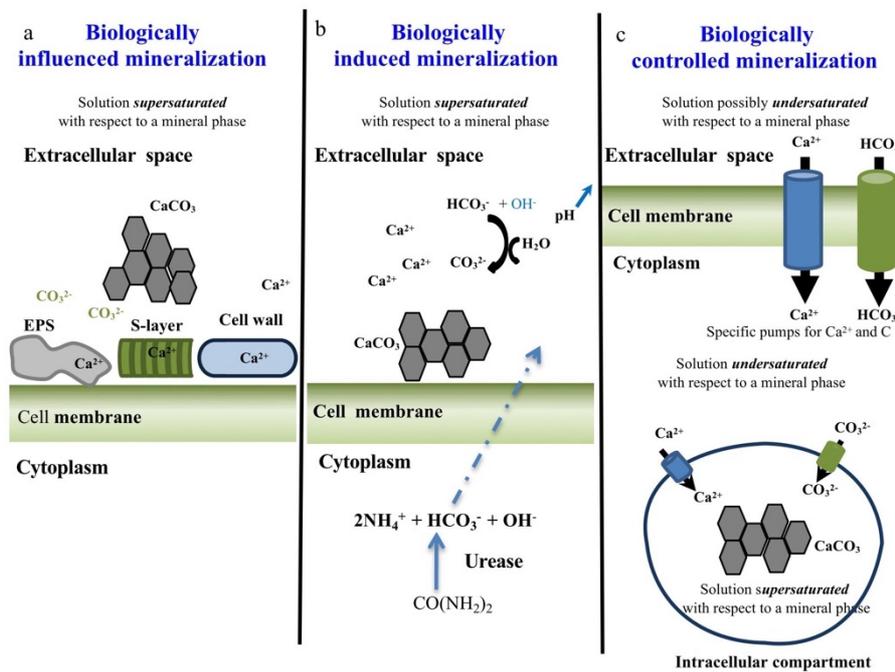
69 More recently, studies have strengthened the idea that bacterial biomineralization is pervasive
70 and very diverse. Boquet in 1973 showed that diverse soil bacteria produce calcium carbonates
71 [9]. A broad diversity of carbonate mineral phases can be formed by bacteria including the
72 different polymorphs of Ca-carbonates: calcite but also, aragonite [10] and vaterite [11],
73 hydrated Ca-carbonates such as monohydrocalcite [12, 13], amorphous (Ca, Sr, Ba, Ra)-
74 carbonates [14, 15], dolomite (Ca-Mg-CO₃) [16], hydromagnesite (Mg₅(CO₃)₄(OH)₂·4H₂O)
75 [17], or siderite (FeCO₃) [18].

76 Diverse objectives have motivated studies about bacterial carbonate biomineralization
77 (carbonatogenesis): (1) some studies aimed at quantifying the impact of bacteria on modern and
78 ancient geochemical cycles of C and/or Ca [19, 20]. It has been convincingly argued that
79 bacterial biomineralization has massively contributed to the formation of large-scale carbonate
80 deposits all over Earth's history [20, 21]. (2) Similarly, it has been suggested that bacterial
81 biomineralization can favor fossilization and the preservation of traces of life in ancient rocks
82 [22]. Consistently, bacterial carbonate biominerals are prone targets for searching traces of
83 ancient life on Earth or Mars [23, 24]. For example, carbonate microbialites, which include
84 stromatolites, are emblematic byproducts of bacterial biomineralization, considered as among
85 the oldest traces of life [25–27]. (3) In addition, an active field of research aims at using bacterial
86 carbonate biomineralization for diverse engineering applications. For example, the removal of
87 polluting heavy metals or radionuclides (e.g. Ra, Sr) may be achieved by their co-precipitation
88 with calcium carbonate by biomineralizing bacteria [15, 28]. Alternatively, bacterial carbonate
89 biomineralization has been proposed as a strategy for carbon capture and storage [29].
90 Microbially enhanced oil recovery by plugging highly permeable rocks with bacterial carbonate
91 biominerals has also been considered [30, 31]. Finally, bacterial carbonate biomineralization
92 can be used for stabilizing soils and sediments [32], and restoring weathered limestone and
93 cement monuments [30, 33].

94 For all these basic and applied science applications, there are crucial needs to understand the
95 mechanisms involved in the mediation of carbonate precipitation by bacteria. Mineral
96 precipitation can be triggered by: (1) the increase of the saturation index of the solution
97 surrounding cells with this mineral phase. In the case of carbonate mineral phases, the saturation
98 index increases with calcium ion activity (Ca^{2+}) and carbonate ion activity (CO_3^{2-}), hence
99 bicarbonate ion activity (HCO_3^-) and pH; (2) the decrease of the nucleation energy barrier. In
100 that regard, some molecules produced by the cells act as preferential nucleation sites and favor

101 heterogeneous nucleation [34, 35]. Following these principles, different biomineralization
102 pathways have been distinguished [36]. (a) Biologically induced mineralization encompasses
103 all cases when the precipitation of carbonate mineral phases results from chemical
104 modifications of the microenvironment surrounding cells induced by their metabolic activities.
105 These chemical shifts mostly include an increase of pH, or $[\text{HCO}_3^-]$ at constant pH. This is
106 termed the “alkalinity engine”. (b) Biologically influenced mineralization comprises cases
107 when mineral precipitation is favored by nucleation on bacterially produced organic polymers,
108 such as those composing cell surfaces or extracellular polymeric substances (EPS). In such
109 cases, biomineralization occurs in already saturated solution and does not require the cells to
110 be metabolically active. (c) biologically controlled mineralization groups cases when a specific,
111 genetic control of some of the mineral precipitation steps (e.g. nucleation and/or growth) occurs.
112 As detailed below, there are known cases of bacterial carbonatogenesis for all three classes.
113 Alternatively, biomineralization pathways can be discriminated as active *vs* passive based on
114 whether they cost energy (they depend on metabolically active cells) or not (they need cells not
115 necessarily alive). Last, biomineralization processes can be distinguished based on their
116 localization respectively to the cell (intra- or extra-cellular). While bacterial carbonatogenesis
117 has often been considered as extracellular, numerous environmentally significant bacteria
118 perform intracellular biomineralization [37, 38].
119 Overall, to infer whether carbonatogenesis depends on specific genes (controlled
120 mineralization), it is important to decipher the operating molecular mechanisms, and identify
121 the templating molecules or the metabolic pathways involved. This will be useful to better
122 interpret the massive data generated by the increasing use of omics approaches such as
123 metagenomics, metatranscriptomics, metaproteomics to study biomineralizing microbial
124 ecosystems, such as carbonate microbialites [8, 39] or calcifying soil microbes [40]. These
125 approaches may provide information about the carbonatogenesis potential of an ecosystem

126 provided if molecular mechanisms favoring or inhibiting biomineralization are sufficiently
 127 understood. Here, we review some of our current knowledge about the diversity of bacterial
 128 carbonate biomineralization processes and the underlying molecular mechanisms (Fig. 1). We
 129 also highlight gaps that will need to be filled to better use omics data in the future. Last, we
 130 shed light on intracellular carbonate biomineralization that is often overlooked although current
 131 studies suggest that it is more widespread than previously thought.



132
 133 Figure 1: Classification of the CaCO₃ biomineralization processes found in bacteria: a)
 134 biologically influenced mineralization; b) biologically induced mineralization; c) biologically
 135 controlled mineralization. The grey hexagons represent CaCO₃ precipitates. Ca²⁺ cations can be
 136 replaced by, e.g. other alkaline earth elements such as Mg²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺.

137
 138
 139

140

141

142 **Bacterially influenced mineralization of calcium carbonates**

143 This mode of mineralization has been sometimes named organomineralization by Trichet and
144 Défarge [41]. A broad diversity of molecules, mostly (glyco-)proteins and polysaccharides, has
145 been shown to impact the nucleation of carbonates in eukaryotes and metazoans [42]. However,
146 they are less documented in bacteria. There are distinct supporting theories behind that: first, it
147 has been suggested that a continuum exists between biomineralization and cation adsorption by
148 diverse functional groups at the bacterial surfaces/exopolysaccharides [43]. In this respect, the
149 local adsorption of cations such as Ca^{2+} or Mg^{2+} may drive the subsequent nucleation.
150 Alternatively, it has been convincingly shown that diverse organic molecules, including
151 polysaccharides, favor nucleation by decreasing the net interfacial energy between the growing
152 crystal, the substrate and the solution [35] (Table S1).

153

154 **Influence of extracellular polymeric substances (EPS)**

155 EPS are a complex mixture of high-molecular-weight polymers, mostly composed of
156 polysaccharides with some nucleic acids, lipids proteins and other polymers such as humic acids
157 [44]. EPS are a major component of biofilms, sometimes accounting for more than 90% of their
158 dry mass [44], and support the aggregation of cells and attachment to surfaces [45].
159 Polysaccharides have been repeatedly observed as intimately and pervasively associated with
160 carbonate mineral grains suggesting their involvement in mineral precipitation, possibly
161 through mineral templating [46, 47] (Fig. 2). The diversity of bacteria capable of producing
162 EPS is tremendous, including Cyanobacteria, sulfate-reducing bacteria and other diverse
163 Proteobacteria [48]. By studying functional genes in lacustrine carbonate microbialites, Saghai
164 et al. [8] showed that genes associated with trehalose and rhamnose synthesis were mostly

7

165 affiliated to Cyanobacteria, Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria. Genes involved in
166 the metabolism of other sugars were dominated by some of these phyla and additional ones.
167 Bacteria produce hundreds of different EPS with various chemical structures [49]. This
168 chemical and structural diversity of EPS relies on the identity and number of the saccharide
169 monomers, the glycosidic linkages and the nature of functional groups. There is also a broad
170 diversity of bacteria able to degrade EPS that can be found in carbonatogenic environments
171 [50]. Overall, how the chemical diversity of EPS matters for the precipitation of carbonate
172 mineral phases needs to be better assessed. In the future, this may help assessing which bacterial
173 groups may have more impact on carbonatogenesis based on their EPS production.
174 There are still diverging views about how EPS are involved in carbonate precipitation. In some
175 cases, it has been proposed that acidic polysaccharides inhibit carbonate precipitation [51, 52].
176 As a result, carbonatogenesis may occur in EPS-poor areas only, where high concentrations of
177 Ca^{2+} and Mg^{2+} have been released by the degradation of polysaccharides by heterotrophic
178 bacteria [53]. Alternatively, it has been speculated that EPS may transform upon decay into a
179 highly organized template structure favoring calcium carbonate nucleation [41].
180 Giuffre et al. [35] provided a different –yet compatible– view based on a more mechanistically-
181 proven basis. They showed that charge density is a prominent parameter to predict the impact
182 of EPS on nucleation: the higher the charge density (e.g. presence of highly sulfated or
183 carboxylated polysaccharides), the greater the energy barrier for nucleation. As a result, EPS
184 with higher charge density induce higher nucleation rates at higher supersaturation indices of
185 the solution, while at lower supersaturation indices, near-neutral EPS macromolecules induce
186 higher nucleation rates. Structural variations in EPS impact nucleation rates to a lower extent
187 than charge densities.
188 Moreover, the EPS composition in uronic acid, carbohydrates and protein influence carbonate
189 polymorphism *in vitro* [52], with some EPS favoring aragonite precipitation, while others favor

190 calcite formation (Fig. 2). This might be particularly related to the identity of some small acidic
191 proteins. These proteins, more precisely their aspartic acid residue (Asp) possibly interact with
192 the surface of the growing precursor crystals and inhibit further transformation into the most
193 stable polymorph, i.e., most often calcite. [54]. Similarly, variations of xanthan content and the
194 presence of acidic amino-acids were shown to impact carbonate phase polymorphism and
195 crystal habits [55]. Consistently, Han et al. [10] recently showed that EPS produced by *Bacillus*
196 *subtilis* species [10] (Table S1) contain abundant acidic amino-acids such as glutamic acid and
197 Asp, and act as nucleation sites for carbonate mineral phases in supersaturated solutions. Last,
198 high molecular weight acidic proteins secreted by some bacteria were shown to influence the
199 precipitation of diverse mineral phases including carbonates [56]. The significance of such
200 secretions remains to be more widely assessed.

201 Systematically exploring the relationship between chemical and structural properties of EPS
202 and nucleation rates as well as crystal habits and carbonate polymorphism will be an important
203 achievement. This might depend on the chemical conditions prevailing where carbonatogenesis
204 occurs [35]. Among the different approaches to test relationships between EPS and carbonate
205 formation, it will be very interesting to use EPS-producing and EPS-free mutants of
206 cyanobacterial strains [57]. Finally, dedicated metagenome analyses may also help to better
207 assess the relationship between taxonomic diversity and EPS that may have a strong impact on
208 carbonatogenesis.

209

210 **Influence of bacterial cell walls**

211 The cell walls of *Myxococcus xanthus* were shown to favor the precipitation of calcite and
212 diverse phosphate mineral phases in supersaturated solutions [58]. Negatively charged
213 functional groups in glycoproteins and proteoglycans (Fig. 2) play a role in heterogeneous
214 nucleation but the need for some stereochemical analogy between the calcite surface and

215 nucleating polymers has also been briefly suggested. Independently, calcite precipitation by
216 *Myxococcus xanthus* can also be triggered in some cases by the supersaturation increase caused
217 by the cell metabolic activity as further explained below [59]. The cell wall of *Bacillus subtilis*,
218 mostly composed of peptidoglycan and teichoic acids was also shown to promote the nucleation
219 of carbonate mineral phases. This occurred even when cells were dead or disrupted,
220 demonstrating a clear case of biologically-influenced mineralization [60]. The exact molecular
221 drivers were not identified but nucleating properties were kept even when the cell wall fraction
222 was heated up to 100°C.

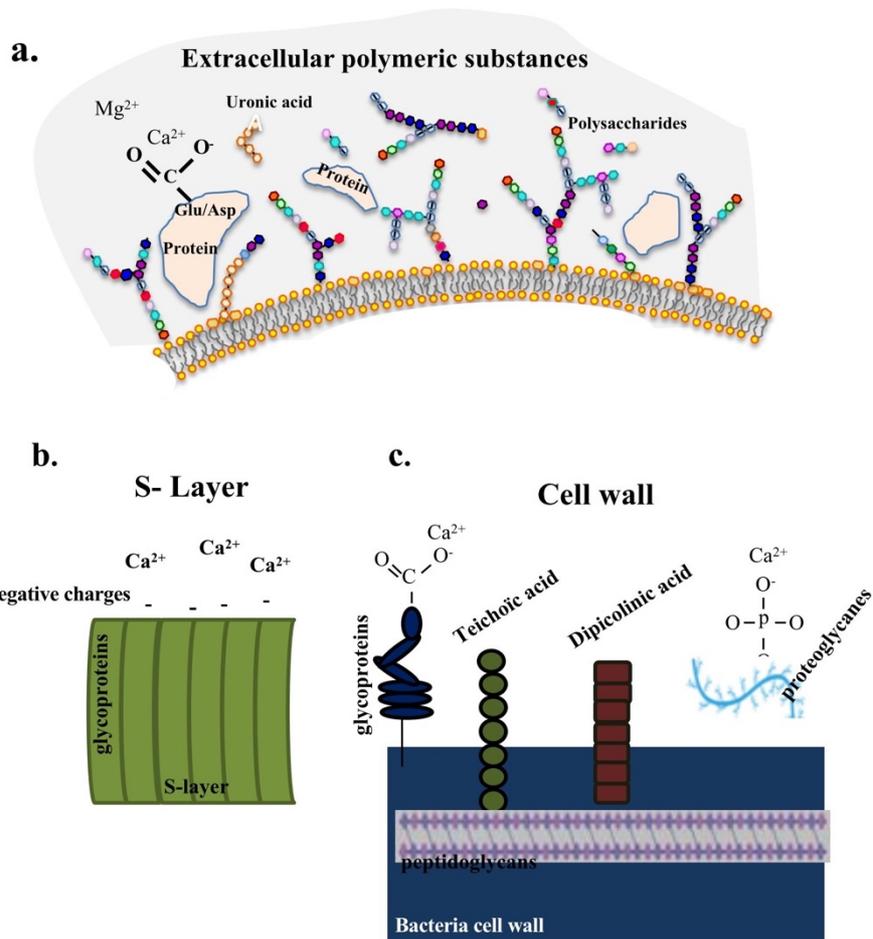
223 A whole set of studies have considered functional groups composing biomolecules at the
224 surface of bacteria regardless of the molecules containing them. They have quantified their
225 surface densities and acidity constants to model their capabilities to adsorb cations [61]. In
226 particular, they have tracked functional groups which are negatively charged at alkaline pH and
227 can therefore interact with Ca²⁺. These functional groups, carried by cell bound polysaccharides
228 but not exclusively, are involved in passive nucleation of CaCO₃ by bacteria [62]. Carboxylate
229 and phosphoryl functional groups likely play the major role [63–65]. In contrast, Martinez et al
230 [66] suggested that some bacteria may express different functional groups at their surface such
231 as amines, creating a positively charged surface which impedes carbonate precipitation. The
232 precise biochemical carriers of these amine groups remain uncertain.

233 Surface layers (S-layers), a single layer of identical (glyco-)proteins arranged periodically and
234 integrated within the cell walls of some bacteria, have received attention for they role in the
235 precipitation of CaCO₃ phases by the *Synechococcus* strain GL24 [67] (Fig. 2). Schultze-Lam
236 and Beveridge [68] suggested the presence of high densities of negatively charged binding sites
237 exposed locally within the large holes of the S-layer arrays where mineral nucleation starts.
238 They also suggested that the mineralized S-layer could be shed by the cells, feeding carbonate
239 deposition in the lake [67]. Despite the importance of these pioneering studies, none to our

240 knowledge has further assessed the significance of these proteinaceous structures in bacterial
241 carbonatogenesis.

242 More recently, Marvasi et al. [69] evidenced the role in carbonatogenesis of two additional
243 types of organic molecules abundantly found in some bacterial cell walls: dipicolinic acid
244 (DPA, pyridine-2,6-dicarboxylic acid), a pyridine ring substituted by two carboxylic functional
245 groups, and teichoic acids, polymers of glycerol- or ribitol-phosphate and carbohydrates linked
246 by phosphodiester bonds (Fig. 2). This was achieved by the production of *B. subtilis etfA*
247 deletion mutants impaired in their capability to precipitate CaCO₃, which possess significantly
248 less dipicolinic acid and teichoic acid in their cell walls. Interestingly, DPA was also previously
249 shown to be involved in very high Ca accumulation by *B. subtilis* endospores [70].

250 In this section, we focused on influenced mineralization mode. It is mediated by a diversity of
251 molecules favoring heterogeneous nucleation, which operate even in metabolically inactive
252 cells, as long as the extracellular solution is supersaturated with mineral precipitates. In the case
253 of metabolically active cells, their impact can combine with a local increase of the solution
254 supersaturation induced by some metabolic reactions that we discuss below, and which
255 contribute to biologically induced mineralization [71].



256

257 Figure 2: Some diversity of the molecules involved in biologically influenced mineralization
 258 of $CaCO_3$: a) extracellular polymeric substances, comprising polysaccharides and proteins; b)
 259 surface layers; c) cell walls comprising teichoic and/or dipicolinic acid functions and/or
 260 proteoglycans and glycoproteins.

261

262

263

264

Bacterially induced mineralization of calcium carbonates

265 This section focuses on bacterial metabolic activities promoting and/or speeding up the kinetics
266 of carbonate precipitation by shifting extracellular chemical conditions.

267 Calcium carbonate precipitation is a chemical reaction that can be captured by the following
268 equation:



270 where K_s is the solubility constant which depends on the structure of the CaCO_3 mineral phase
271 and temperature. The activity product of the reactants, Q , is defined as: $Q = a(\text{Ca}^{2+}) \cdot a(\text{CO}_3^{2-})$,
272 where $a()$ refers to the activity of chemical species.

273 When Q exceeds the K_s of a mineral phase, the solution is supersaturated with this phase and
274 precipitation may thermodynamically occur. Q depends on the concentrations of Ca^{2+} and CO_3^{2-}
275 , hence on the concentrations of Ca^{2+} and HCO_3^- , and pH. By modifying pH, $a(\text{Ca}^{2+})$ and/or
276 $a(\text{HCO}_3^-)$, at least locally, a metabolizing bacterium can increase the saturation of a solution to
277 a value exceeding mineral solubility, thereby rendering precipitation thermodynamically
278 possible when it was not possible before the bacterial action. In many cases, organisms thrive
279 in solutions which are already saturated/supersaturated with some mineral phases. However, in
280 slightly supersaturated solutions, precipitation may be slow [72]. Morse et al. [73] suggest that
281 Q should be 20-30 times higher than K_s so that carbonate mineral phases precipitate
282 spontaneously, i.e. within a few hours to a day. Under these circumstances, the increase of the
283 solution saturation by biological activity speeds up the kinetics of precipitation and makes it
284 effectively occurring [74].

285 The increase of $a(\text{CO}_3^{2-})$ induced by metabolic activities has been called the intrinsic 'alkalinity
286 engine' [36]. The diversity of metabolisms contributing to this has been particularly studied in
287 the context of microbialites. Alternatively, some bacterial processes may increase at least
288 locally $a(\text{Ca}^{2+})$, contributing overall to the increase of Q as well.

289

290 **The diversity of metabolisms involved in the alkaline engine**

291 As mentioned above, any metabolism increasing $a(\text{CO}_3^{2-})$, i.e. increasing $[\text{HCO}_3^-]$ at a constant
292 pH and/or increasing pH at a constant $[\text{HCO}_3^-]$, favors the precipitation of carbonate mineral
293 phases. An increasing number of studies assessing microbial diversity in microbialites aim at
294 highlighting these metabolisms [50, 75].

295

296 ***Photolithotrophy and more generally carbon autotrophy***

297 In the context of microbialites, photolithoautotrophs and in particular Cyanobacteria have
298 received thorough attention for their involvement in carbonate biomineralization. Indeed, many
299 cyanobacteria tend to increase the pH of extracellular solutions that are not highly pH-buffered.

300 Overall, this is due to their propensity to fix CO_2 using RuBisCO after bicarbonate ions (HCO_3^-
301) uptake. Indeed, this results in a net consumption of protons by the cells, hence an increase of
302 extracellular pH [76]. There may be no net proton consumption by cyanobacteria and therefore
303 no impact on carbonatogenesis, in environments where enough CO_2 is available because CO_2
304 might be preferentially used over HCO_3^- . However, while high environmental $p\text{CO}_2$ may have
305 been common on the Precambrian Earth [20, 77], this is usually not the case in most modern
306 aqueous environments. In that case, inorganic carbon acquisition mostly involves the active
307 uptake of HCO_3^- . A complex set of molecular pathways increases HCO_3^- uptake, storage and
308 conversion to CO_2 within the cells. Altogether, these pathways are referred to as CO_2 -
309 concentrating mechanisms (CCM) (Fig. 3). There is a broad diversity of molecular actors
310 involved in CCM among the diverse lineages of Cyanobacteria [78, 79]. More specifically,
311 HCO_3^- ions are imported against their concentration gradient by a diversity of transporters, such
312 as through a symport with Na_2^+ or by ATP hydrolysis [78]. The expression of some of these
313 transporters-encoding genes is constitutive, while it is induced for some others when CO_2
314 fugacity is low enough. This shows that CCM can partly respond to environmental conditions

315 and that inferring the genetic capabilities of strains might not be enough to predict their role in
316 carbonatogenesis.

317 Bicarbonates are transformed into CO₂ by carbonic anhydrases (CAs) within
318 microcompartments delimited by protein shell, called carboxysomes. This releases hydroxyl
319 ions, which are buffered by the import of H⁺ for the sake of intracellular pH regulation. As a
320 result, extracellular pH and therefore the extracellular solution saturation increase in regard with
321 carbonate mineral phases [20]. Moreover, it has been suggested that part of the H⁺ import can
322 be achieved by antiport with Ca²⁺ ions by Ca²⁺/H⁺ exchangers. This further increases
323 extracellular solution saturation with calcium carbonate mineral phases [80]. A link between a
324 Ca²⁺/H⁺ exchanger and an HCO₃⁻ transporter has been shown in *Synechocystis* PCC 6803.
325 Indeed, the inactivation of the unique Ca²⁺/H⁺ exchanger (slr1336) in this organism significantly
326 increased the calcification rate and stimulated the expression levels of CCM-related genes,
327 especially *cmpA*, which encodes the BCT1 HCO₃⁻ transporter [81].

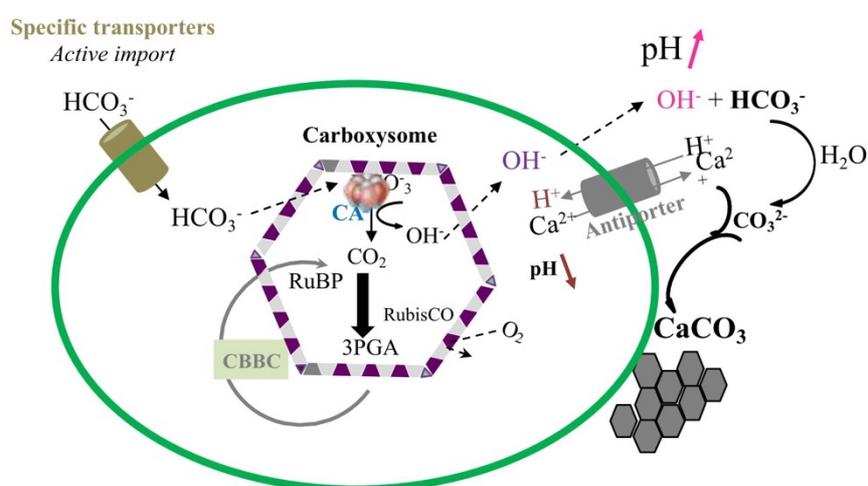
328 Carbonic anhydrases are Zn(II)-(and/or Fe(II)- or Co(II)-) metalloenzymes catalyzing the
329 reversible hydration of CO₂, i.e. the interconversion of CO₂ and HCO₃⁻. Therefore, they
330 participate in pH regulation, and inorganic carbon handling. They have been intensively studied
331 in the frame of CO₂ capture and sequestration [82, 83]. While they have been shown to be major
332 players in eukaryotic calcification [84], their role in bacterial carbonatogenesis often remains
333 undermined [85]. CAs are ubiquitous in the kingdom of Bacteria and diverse, belonging to three
334 families (α , β , γ), which may have evolved from a γ -like ancestral CA [86–88]. A broad
335 structural diversity occurs amongst CAs, which can exist as monomers or polymers, coupled
336 with a low sequence similarity [88]. Cell localization is also diverse, some CAs being
337 intracellular, intra-organellar and others periplasmic or extracellular. How this localization may
338 control their capability to induce carbonatogenesis remains to be determined.

339 A recombinant γ -carbonic anhydrase from *Serratia* sp. expressed and purified in *E. coli* was
340 capable to promote the precipitation of calcite. Its activity was optimal at near-neutral pH (7.6-
341 8.0) at 4°C. Concentrations of 1 and 2 mg of the purified enzyme produced 26.0 and 31.5 mg
342 of CaCO₃ in 15 min, respectively [89]. Moreover, some CAs were shown to be more efficient
343 than others at inducing CaCO₃ precipitation [90, 91].

344 However, many uncertainties remain. First, are there cyanobacteria harboring particularly
345 effective CCMs that may therefore strongly impact carbonatogenesis? Second, which part of
346 intracellular pH regulation is achieved by the functioning of Ca²⁺/H⁺ exchangers vs other H⁺-
347 transporters in calcifying cyanobacteria? Third, some debate concerning the way cyanobacteria
348 impact carbonatogenesis still occurs. Some authors stress on the importance of metabolic
349 activity in the induction of carbonate precipitation by cyanobacteria [92, 93], whereas others
350 suggest that inactive heterogeneous nucleation is the dominant mechanism (e.g. biologically
351 influenced mineralization, see above). In the latter case, molecules at cell surface would play a
352 dominant role [62]. One possible explanation for the conflicting conclusions of these studies is
353 that experiments maintaining relatively high pCO₂ conditions [62] may undermine CCM effects
354 and therefore favor heterogeneous nucleation over biologically induced mineralization. Last
355 but not least, it should be noted that some endolithic Cyanobacteria, despite having the same
356 molecular apparatus as described above, are known to induce CaCO₃ dissolution instead of
357 precipitation [94]. Deciphering the molecular reasons that make a cell dissolve or precipitate
358 CaCO₃ will be crucial in the future. In that regard, Zhu et al. [95] showed that the a non-
359 photosynthetic bacterium *Brevibacterium linens* BS258 can induce precipitation or dissolution
360 of CaCO₃ depending on extracellular Ca²⁺ concentration and the subsequent variations in CA
361 genes expression.

362 Finally, the relationship between the metabolic activity of Cyanobacteria and the induction of
363 carbonate mineral phase precipitation may be generalized to all other bacteria using the CO₂-

364 assimilating Calvin-Benson-Bassham cycle and also to all other autotrophic carbon fixation
 365 pathways such as the reductive citric acid cycle, the Wood-Ljungdahl pathway, and the
 366 dicarboxylate/4-hydroxybutyrate cycle [96], at least when cells both incorporate bicarbonate
 367 and fix CO₂. Although some studies have stressed on the role of anoxygenic phototrophs in
 368 carbonate precipitation, e.g. in microbialites [8, 97], the assessment of the contribution of this
 369 much broader bacterial (and archaeal) diversity to carbonatogenesis and how CCM might be
 370 widespread and effective in them remain poorly explored.



371
 372
 373
 374

375 Figure 3: Simplified model of CCM-dependent biological induced mineralization of CaCO₃.
 376 Carbon concentrating mechanism CCM involves the uptake of HCO₃⁻. Carbonic anhydrase
 377 (CA) converts CO₂ into HCO₃⁻ in the cytoplasm and HCO₃⁻ into CO₂ in the carboxysome. CO₂
 378 is fixed by RubisCO and used by the Calvin-Benson-Bassham Cycle (CBBC). Conversion of
 379 HCO₃⁻ into CO₂ releases OH⁻. To buffer intracellular pH, specific transporters such as Ca²⁺/H⁺
 380 antiporters import H⁺ and export Ca²⁺. The import of H⁺ inside the cell lead to an increase of

381 the extracellular pH, which together with export of Ca²⁺ favors the precipitation of extracellular
382 CaCO₃. [20, 30, 167].

383

384

385

386 **Other carbon-based metabolisms**

387

388 ***Methanotrophy***

389 Anaerobic methane oxidation has been shown as a pathway inducing the precipitation of
390 significant amounts of carbonate mineral phases with low δ₁₃C [98]. In contrast, aerobic
391 methane oxidation should favor carbonate dissolution since it releases CO₂ [99]. However,
392 some studies have shown that the so-generated CO₂ with low δ₁₃C may be re-sequestered within
393 Mn- and/or Fe-rich carbonates under particular conditions [100]. Anaerobic-methane oxidation
394 can be coupled by some Bacteria and/or Archaea with the reduction of sulfates (in consortia
395 associating Archaea and Bacteria), nitrates, nitrites, humic acids, iron or manganese [101].
396 Bacterial methanotrophs can be detected based on genes coding for the particulate (*pmoA*) or
397 soluble (*mmoX*) forms of the methane monooxygenase [101], while Archaeal methanotrophs
398 can be detected by the presence of the *mcrA* gene encoding methyl co-enzyme reductase.

399

400 ***Fatty acid catabolism***

401 Three mechanisms are proposed to mediate bacterially-induced carbonate mineralization in *B.*
402 *subtilis*. One occurs through ureolysis (see below), whereas the other two take place in urea-
403 free growth media through the production of dipicolinic and teichoic acids (see above) or in
404 connection with the fatty acid metabolism [102, 103]. Several mutants impaired in their ability
405 to precipitate calcite in urea-deprived growth media highlighted the involvement of several
406 operons including *yus*, *yko* and *eft* genes [102]. The *lcfA* operon composed of five genes (*cfA*,

407 *ysiA*, *ysiB*, *etfB*, and *etfA*) received particular attention. *etfA* encodes a putative flavoprotein
408 possibly involved in the metabolism of fatty acids, which appeared to be essential for calcite
409 precipitation in the absence of urea [103]. It was suggested that the loss of calcite precipitation
410 in the *etfA* mutants was due to a higher extracellular release of H⁺ no longer consumed by the
411 fatty acids metabolism as compared to the wild-type strain, which favors extracellular CaCO₃
412 precipitation [104]. In a later study, Marvasi et al. [68] suggested that the *etfA* mutation may
413 also change the phospholipids membrane composition, which therefore may have a role in
414 calcite precipitation. Overall, it becomes apparent that *B. subtilis* can induce CaCO₃
415 precipitation through various mechanisms depending on the culture conditions.

416

417 ***Ureolysis***

418 Bacterial ureolysis has also received particular attention, especially from studies with applied
419 purposes since it seems capable of inducing massive carbonate precipitation [91, 105, 106]. The
420 hydrolysis of urea (CO(NH₂)₂) releases ammonium (NH₄⁺), HCO₃⁻ and hydroxyls, the two latter
421 contributing to the high increase of solution saturation with carbonate phases, hence their
422 precipitation. Ureolysis primarily depends on the activity of the urease with some additional
423 role of cell surfaces in the heterogeneous nucleation of the mineral phases [107]. Consistently,
424 strong carbonatogenesis capabilities could be provided to the *E. coli* HB101 strain harboring a
425 plasmid encoding *Bacillus pasteurii* (*Sporosarcina pasteurii*) urease genes [108]. Similarly,
426 mutants of *S. pasteurii* with urease activities higher than the wild type strain produced more
427 calcite [109].

428 Ureases can be found in a wide diversity of organisms, including a broad diversity of bacteria
429 [107, 110]. Almost all ureases are cytoplasmic and can constitute up to 1% of the cell dry weight
430 in *S. pasteurii* [108]. However, ureases can also function extracellularly, and it has been
431 reported that soil matrix-bound ureases can represent significant players of ureolysis [111].

432 Bacterial ureases are high molecular weight, cysteine-rich enzymes belonging to the
433 superfamily of amidohydrolases and phosphotriesterases [112]. Genes coding for the three
434 subunits (*ureA*, *ureB* and *ureC*) as well as accessory proteins (UreF, UreH, and UreG, involved
435 in the nickel active site assembly) can be tracked in genomes [95, 106]. Moreover, the *ureC*
436 gene, encoding the well-conserved subunit harboring the nickel catalytic active site has been
437 used as a marker gene that can be tracked by molecular approaches [110].

438 Some structural diversity among bacterial ureases may be associated with variations in affinities
439 for substrates [107] and pH of optimal activity [112].

440 Carbonate precipitation by ureolytic bacteria follows a Michaelis–Menten kinetics with
441 ureolysis as the rate-limiting step [113]. Carbonatogenesis rates are therefore organism-
442 dependent since they depend on the activity of the intrinsic urease [114]. Moreover, when
443 ureolysis occurs intracellularly, the efficiency of cell transmembrane transport of urea by urea
444 permeases, of ammonia, protons and Ni by transporter systems matter for the overall
445 carbonatogenesis capabilities of the cells [108]. Last, it has been suggested that synergies exist
446 between the functioning of ureases and CAs in addition to their direct contribution to
447 calcification, since, e.g. Ni incorporation in urease is dependent on the intracellular CO₂/HCO₃-
448 ratio, which is regulated by CA [85].

449 Ureolysis activity can also be affected by external environmental conditions, including pH
450 [105], urea concentration and temperature [113]. For example, a pH increase can favor in some
451 soils the growth of urease-producing microorganisms, resulting in an increased number of *ureC*
452 detected copies and an increased ureolysis rate [115]. In contrast, oxygen fugacity does not have
453 a direct impact on urease activity, but anoxic conditions may impede the growth of aerobic
454 strains, therefore urease production, hence carbonatogenic activity [113]. Some authors have
455 suggested that the activity of urease can be modulated by calcium concentration [107]. Zhu et
456 al. [95] showed in the marine Actinobacterium *Brevibacterium linens* BS258 that an increase

457 of Ca²⁺ upregulated the expression of genes encoding peptide/nickel ABC transporters which
458 boosted urease activity. Whether, this correlation is systematically positive is yet to clarify.
459 Ureolytic bacteria are found in a wide range of environments [110]. Interestingly, ureolysis has
460 also been shown to be an important metabolism in some microbialites, by the detection in
461 metagenomes of urea ABC transporters, and ureases, dominated by genes of Proteobacteria
462 [75].

463

464 ***Other nitrogen-related metabolisms***

465 Nitrate reduction and ammonification of amino-acids are prone to induce the precipitation of
466 CaCO₃ [116, 117]. Some of these processes are dissimilatory, i.e. reduction provides ATP to
467 the cell, while others are assimilatory, i.e., they serve as a source of nitrogen for biosynthesis.
468 Interestingly, nitrate reduction has been highlighted as an important mechanism inducing
469 carbonate precipitation in the earliest times by Drew [118] on marine bacteria, but its
470 significance in modern CaCO₃ precipitation rates remains poorly assessed.

471 Denitrification consists in the reduction of NO₃⁻ (nitrate) to N₂ through several intermediates,
472 including nitrite (NO₂⁻), nitric oxide (NO), and nitrous oxide (N₂O). Each step of denitrification
473 is catalyzed by various enzymes harboring diverse metal cofactors. The first one is performed
474 by either periplasmic or cytoplasmic nitrate reductases, encoded by *napAB* and *narGHI* genes,
475 respectively [119–121]. Overall, more than 50 genes in a genome are encoding the core
476 structures of the denitrification apparatus [119]. Nitrate reduction encompasses a larger group
477 of bacteria, some of which proceeding through the first NO₃⁻ → NO₂⁻ step only.

478 Nitrate is used as an electron acceptor in anoxic environments by bacteria that are often
479 facultative nitrate reducers. Nitrate reduction can be coupled by diverse heterotrophic bacteria
480 with the oxidation of organic C but also by some autotrophic bacteria with alternative electron
481 donors including H₂ and reduced S, As and Fe chemical species [122]. Depending on the

482 electron donor, nitrate reduction consumes (e.g. organic C, H₂, HS⁻), or produces (e.g. S₂O₃²⁻,
483 Fe²⁺, Mn²⁺) protons, the former favoring the induction of CaCO₃ precipitation. In the case of
484 heterotrophic denitrification, the additional production of CO₂ may further impact saturation
485 with CaCO₃. For example:

486



488

489 Since denitrification is distributed among a highly polyphyletic group of bacteria [122], the
490 targeting of functional genes such as *narGHI* and *napAB* (encoding the respiratory and
491 periplasmic nitrate reductases respectively) has been used to look for nitrate-reducing bacteria
492 in the environment [123].

493 Nitrate reduction has been studied as a driver of bacterially-induced carbonate precipitation in
494 several geotechnical applications but also in environmental microbial mats where calcification
495 occurs [124]. Although it seems to have a lower efficiency than ureolysis for carbonatogenesis
496 [117], nitrate reduction has been proposed as an alternative pathway for applications where the
497 production of ammonium would be unwanted and/or where wastewater with elevated nitrates
498 concentrations are available. Nitrate reduction may even supplement ureolysis in some cases,
499 and improve CaCO₃ precipitation efficiency [125]. High Ca²⁺ concentrations and urea have
500 been reported to decrease nitrate reduction rates [125], but this effect will need to be assessed
501 more systematically. Heterotrophic denitrification was reported to be optimal at a pH around 7-
502 8 but it can also occur at higher pH [126, 127]. Many other parameters may affect denitrification
503 rates including salinity, limitation of metal cofactors, phosphorus availability [128]. Last,
504 Karatas [128] concluded that CaCO₃ precipitation is also controlled by the ratio of the alkalinity
505 production (consumption of H⁺) to CO₂ production. This ratio depends on the oxidation state
506 of C and the N content in the electron donor. Overall, *Pseudomonas aeruginosa* and

507 *Diaphorobacter nitroreducens* are known to promote precipitation via denitrification
508 metabolism [129] (Table S1).

509 Ammonification refers to diverse processes resulting in the hydrolysis of nitrogenous organic
510 matter and the release of ammonium. This includes the already discussed ureolysis and
511 reduction of nitrate into ammonium. In addition, ammonification of proteins or amino-acids,
512 among others, under oxic conditions was also shown to produce ammonium, sometimes CO₂
513 and to consume H⁺ [130]. Therefore, ammonification is capable of inducing CaCO₃
514 precipitation [91] following the general equation:

515



517

518 It involves multiple steps of protein, peptide and amino acid decomposition by a diversity of
519 enzymes, including proteases, hydratases, peptidases, and deaminases. Reyes et al. [131]
520 provided a list of 47 enzymes retrieved from metagenomes of marine sediments, possibly
521 involved in ammonification. The corresponding genes were among the most abundant genes
522 involved in nitrogen metabolism. Recently, using the model bacterium *Alcanivorax*
523 *borkumensis*, Krause et al. [132] proposed that bacterial ammonification might be an important
524 driver of carbonate formation in shallow costal marine environments. Similarly, Rodriguez-
525 Navarro et al. [133] showed the capability of *Myxococcus xanthus* to induce CaCO₃
526 biomineralization by performing oxidative deamination of amino acids.

527

528 ***Sulfur-related metabolisms***

529 Many studies have highlighted the role of sulfate-reducing bacteria (SRB) in CaCO₃
530 precipitation in anaerobic environment. Braissant et al. [134] enumerated several processes
531 mediated by SRB that favor CaCO₃ precipitation: sulfate reduction consumes protons and

532 therefore increases the saturation of the extracellular solution. SRB also increase Ca^{2+} activity
533 by removing carboxylic acids which otherwise complex Ca^{2+} . By removing sulfates ions, they
534 also relieve the kinetic inhibition of dolomite precipitation. Last but not least, the EPS produced
535 by SRB may favor influenced mineralization. However, SRB may alternatively decrease the
536 pH of the extracellular solution to an extent that depends on the electron donors they use, so
537 that the positive impact of SRB on CaCO_3 precipitation should not be considered as systematic
538 [135]. Moreover, Aloisi [136] suggested that SRB may have a limited impact on the increase
539 of saturation with CaCO_3 , in comparison with oxygenic photosynthesis. In contrast, SRB have
540 been advocated as important players in the formation of the modern microbialites in the
541 Bahamas [137]. Whether, this is due to their metabolic activity or influenced mineralization
542 remains to be clearly assessed.

543 Sulfide oxidation has sometimes been considered as a metabolism promoting CaCO_3
544 dissolution [36]. This actually depends on the nature of the reactants (sulfides *vs.* sulfur *vs.*
545 thiosulfate) and the ultimate byproducts (sulfur *vs.* thiosulfates *vs.* sulfates). Several
546 sulfoxidizing pathways consume protons and may induce CaCO_3 precipitation. Consistently,
547 Himmler et al. [138] proposed that nitrate-driven sulfide oxidation may be involved in the
548 formation of deep stromatolite-like deposits.

549

550 **Biologically induced mineralization by metabolic modifications of** 551 **extracellular calcium activity**

552 As already mentioned, the activity of Ca^{2+} ions also controls the saturation of a solution in
553 respect with CaCO_3 phases. Calcium is known to be involved in membrane transport
554 mechanisms, photosynthesis, cell division, cell differentiation processes such as sporulation,
555 and heterocyst formation [139]. The intracellular Ca^{2+} concentration is tightly regulated at a
556 low value, in the submicromolar range. In the environment, calcium concentration is usually up

557 to 10^3 times higher than intracellular concentration [140]. Therefore, Ca^{2+} enters within the cell
558 via a passive influx. In contrast, the efflux of Ca^{2+} is usually active, involving different types of
559 pumps, including ATPases and $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchangers. At these locations, the local extrusion of
560 Ca^{2+} may favor CaCO_3 precipitation by an increase of Ca^{2+} activity, sometimes coupled with a
561 decrease of H^+ activity [141]. Castanier et al. [33] and McConnaughey and Whelan [142]
562 consistently proposed that Ca^{2+} extrusion might induce CaCO_3 precipitation. Partly supporting
563 this hypothesis, Banks [143] showed that the knock-out mutant of the *chaA* gene encoding the
564 $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ antiporter of *Salmonella typhimurium* has lost its capacity to grow on media
565 containing calcium and thus they suggested that calcification might be involved in Ca
566 detoxification. However, the significance of this process in induced (i.e., non-controlled)
567 mineralization remains to explore.

568

569 **A particular case of induced CaCO_3 mineralization: viral lysis**

570 CaCO_3 precipitation may be induced in some cases by the viral lysis of cyanobacterial cells.
571 This case may not be strictly considered as biologically-induced mineralization since it occurs
572 when cells burst and die. Yet, it involves a local chemical shift created by the cells. A theoretical
573 model was developed based on the following rationale [144]: cyanobacteria use active
574 processes to highly concentrate bicarbonates intracellularly compared to the surrounding
575 solution. Overall, this intracellular dissolved inorganic carbon may represent up to 1 Gigaton
576 in the whole ocean [144]. When the intracellular content is fully released, e.g. by cell rupture
577 following a viral infection, the local increase of bicarbonate concentration in an already
578 supersaturated solution, such as seawater, may be high enough to overcome the energy barrier
579 of homogenous nucleation. As a result, CaCO_3 precipitation occurs at once without the
580 involvement of the cell surface. In contrast, homogenous nucleation is kinetically limited in
581 seawater in the absence of viral lysis and never occurs. Only alternative processes such as

582 heterogeneous nucleation on EPS and/or microbial cell surfaces or increase of saturation by
583 metabolic activity would otherwise allow the precipitation of CaCO₃. In their model, Lisle and
584 Robbins [144] assessed the outward diffusion of bicarbonate molecules and the inward
585 diffusion of Ca²⁺ ions after the cell burst and showed that the formation of vaterite became
586 highly favorable in a limited yet significant volume around the cells. They postulated that this
587 process might result in a significant source of carbonate sediments, when it occurs during bloom
588 events with enhanced viral lytic events, possibly in the so-called whiting events. More recently,
589 Xu et al. [145] conducted laboratory experiments to test this model. Consistently, they observed
590 that cyanobacterial cells of *Synechococcus* sp. PCC 7177 incubated in seawater induced the
591 precipitation of brucite (Mg(OH)₂), whereas after phage infection, lysed cells seemed to favor
592 amorphous calcium carbonate (ACC) and aragonite precipitation.

593

594 **Bacterially controlled mineralization of calcium carbonates**

595

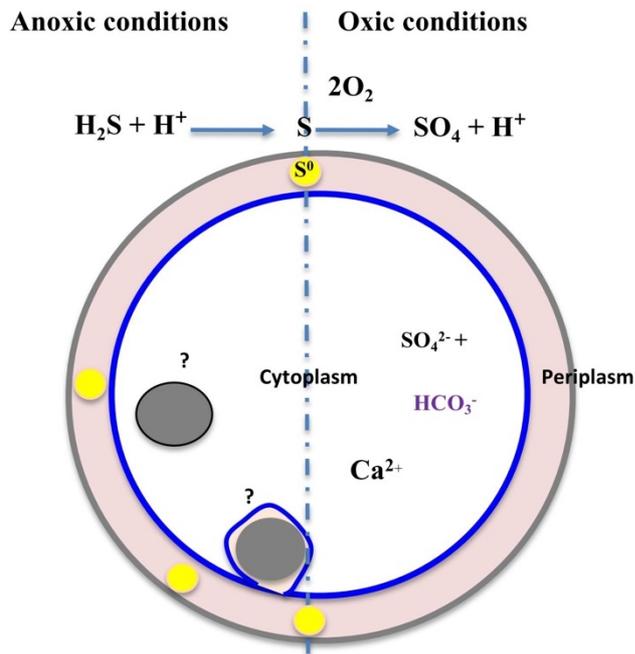
596 Determining the control of mineralization by bacteria is not straightforward. Indeed, it
597 ultimately requires to characterize specific genes and the involved molecular mechanisms.
598 Therefore, we may ignore some cases of controlled mineralization of CaCO₃ even among well-
599 studied model bacteria. Presently, there are two accepted cases of bacterially controlled
600 mineralization of CaCO₃: CaCO₃ formation by *Achromatium* sp. and ACC formation by several
601 cyanobacteria. These cases have several peculiarities compared with the induced and influenced
602 mineralization pathways: (i) mineralization is intracellular; (ii) it can occur under apparently
603 out-of-equilibrium conditions, i.e. in extracellular solutions undersaturated with CaCO₃ mineral
604 phases. This biomineralization results from an energetically costly creation of intracellular
605 supersaturated conditions; (iii) Relatedly, the chemical composition and structure of the
606 resulting biominerals may be different from those expected when considering the chemical

607 conditions prevailing extracellularly. Hence, they may be true markers of biogenicity in these
608 environments.

609 The first evidence of controlled biomineralization was found in *Achromatium*, a genus affiliated
610 to the Gammaproteobacteria. It was described by Schewiakoff as early as 1893. Presently, all
611 known *Achromatium* species can form intracellular CaCO_3 [146]. They are found at the
612 oxic/anoxic boundary in freshwater, brackish or marine sediments [147, 148]. These giant
613 bacteria with cells measuring up to 100 μm in length, contain large (5-6 μm) inclusions of
614 intracellular CaCO_3 , which sometimes occupy most of the cell volume. They also contain small
615 (0,5-2 μm) sulfur (S_0) inclusions [147]. Some *Achromatium* cells were observed to contain
616 intracellular CaCO_3 granules in extracellular solutions undersaturated with all CaCO_3 phases
617 [146].

618 The underlying molecular mechanisms are difficult to study because there is no cultivated
619 representative of *Achromatium*. However, several observations have provided hints. First, some
620 TEM observations have suggested a membrane around CaCO_3 inclusions [146, 147]. However,
621 this feature is not obvious on published pictures. Recently, Schorn et al. [149] intriguingly
622 suggested that CaCO_3 granules in *Achromatium* may actually form within invaginations of the
623 cytoplasmic membrane, i.e. within the periplasm. This clearly shows that significant work
624 remains to be achieved. Then, the usual three ingredients for CaCO_3 mineralization, i.e. Ca^{2+}
625 and HCO_3^- provision as well as proton consumption, have been assessed. First, the formation
626 of intracellular CaCO_3 granules requires a relatively large amount of Ca, although Ca is usually
627 poorly available within cells. Thus, CaCO_3 biomineralization by *Achromatium* may involve a
628 specific active mechanism for concentrating Ca from the environment. Moreover, Salman et al.
629 [148] evidenced an intracellular compartment overlooked so far, which may contain high
630 concentrations of free Ca^{2+} and where CaCO_3 precipitation may start. The detection of genes
631 encoding a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA-like) and a Na/H^+ -Ca exchanger (*yrbG*),

632 and several genes encoding pyrophosphatases and vacuolar (V)-type ATPases in the draft
633 genomes obtained by single-cell genome sequencing was discussed in that regard [150].
634 Second, the provision of HCO_3^- may be achieved in some *Achromatium* populations by CCM.
635 Carbonic anhydrase encoding genes were detected in *Achromatium* draft genomes [150].
636 However, a gene encoding a RuBisCO large subunit (*rcL*) was detected in *Achromatium*
637 populations from Rydal Water but not in those from Hell Kettle [147]. Similarly, some diversity
638 regarding the capability to grow autotrophically was observed among various *Achromatium*
639 populations: some were able to assimilate carbon from bicarbonate, while others needed organic
640 C such as acetate [146]. Last, a correlation has been observed between variations of
641 environmental O_2 fugacity and the amount of sulfur and CaCO_3 inclusions within the cells. This
642 led Salman et al. [148] and Yang et al. [151] to propose that intracellular CaCO_3 accumulates
643 upon oxidation of sulfide to elemental sulfur, a redox process consuming protons and occurring
644 mostly under anoxic conditions. In contrast, CaCO_3 dissolves upon oxidation of sulfur to
645 sulfate, a redox process releasing protons and occurring under oxic conditions (Fig. 4). As a
646 result, CaCO_3 formation would be directly related with the sulfur metabolism of the bacteria
647 and serve somehow as a pH buffer. Accordingly, genes involved in oxidation of sulfide to sulfur
648 and sulfur to sulfate were detected in the draft genomes of *Achromatium*. The increasing
649 number of molecular studies published lately about *Achromatium* holds great promises for soon
650 unravelling more completely the mechanisms of CaCO_3 biomineralization by this bacterium.



651

652 Figure 4: Intracellular CaCO_3 precipitation and the dissolution within *Achromatium* cells.

653 Protons are consumed when sulfides (H_2S) are oxidized to elemental sulfur under anoxic

654 conditions. This leads to an increase of pH and precipitation of CaCO_3 (grey ellipsoid). Protons

655 are released when elemental sulfur (S) is oxidized to sulfates (SO_4^{2-}) under oxic conditions.

656 This results in the decrease of pH and dissolution of CaCO_3 . Some debate exists about the

657 localization of CaCO_3 precipitation: Head et al. [144] and Gray and Head [143] suggested that

658 intracellular CaCO_3 are enclosed within an intracellular compartment delimited by a lipid

659 bilayer (black line). In contrast, Schorn et al. [146] suggested that CaCO_3 forms within an

660 invagination of the cytoplasmic membrane (blue line), open to the periplasm.

661

662

663 For a long time, it has been believed that only *Achromatium* performed controlled
664 mineralization of CaCO₃ among bacteria until the recent discovery of a similar process in some
665 cyanobacteria. This was first discovered in *Gloeomargarita lithophora*, a deep-branching
666 cyanobacterium isolated from modern carbonate deposits forming in the highly alkaline
667 (pH~8.9) Lake Alchichica, Mexico [152, 153]. *G. lithophora* is the closest extant relative of
668 plastids [154]. Cells harbor intracellular amorphous Ca-Mg-Sr-Ba-carbonates granules
669 distributed within the whole cell [152]. There are 21 ± 5 inclusions per cells on average,
670 occupying ~6% of the total cell volume and these inclusions measure $270 \text{ nm} \pm 44 \text{ nm}$ in
671 diameter. Fifteen additional cultivable cyanobacterial strains were later found to form
672 intracellular ACC (iACC) [38, 155] (Table S2). Some of these strains had been extensively
673 studied before, including by TEM, supporting the idea that they have been overlooked. This
674 suggests that we may still have an incomplete assessment of the diversity of bacteria forming
675 intracellular CaCO₃. Cyanobacteria forming iACC are phylogenetically-distant and live in
676 diverse biotopes such as alkaline lakes, hot springs, or soils [38, 156]. All the members of the
677 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 clade, shared the ability to form iACC showing that this
678 biomineralization process is heritable, and might be ancient [38]. Moreover, two types of
679 intracellular distributions of the inclusions were observed among the 16 iACC-forming strains
680 known so far: iACC granules were scattered throughout the cells in 11 cyanobacteria, whereas
681 they were located at cell poles and septa in five other cyanobacteria [14, 38, 155, 157] (Fig. 5).
682 In the latter group, iACC formation is therefore obviously related with cell division. Overall,
683 this questions whether a single pathway is involved or iACC biomineralization appeared several
684 times by convergence during evolution in cyanobacteria.

685 Similar to *Achromatium*, the molecular mechanisms involved in cyanobacterial iACC
686 biomineralization remain poorly known. However, several observations allow discussing
687 hypotheses. First, in cyanobacteria where ACC formation starts at the cell septum, the

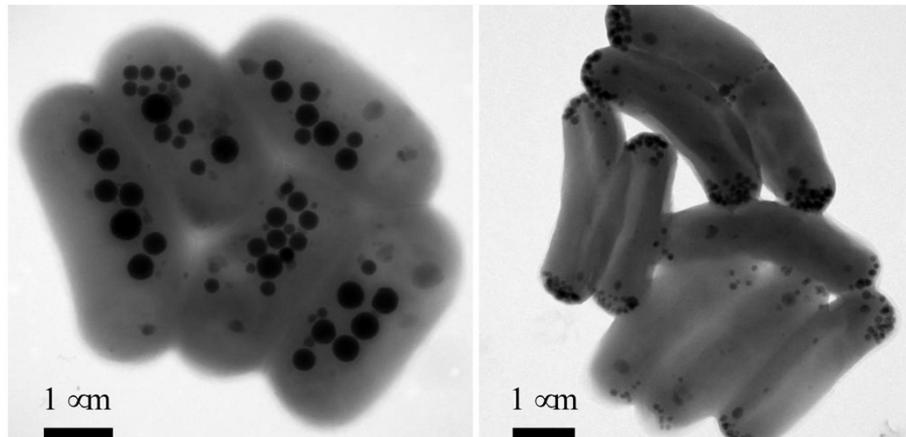
688 involvement of a Ca^{2+} influx and nucleation of ACC on the cell division FtsZ protein have been
689 suggested as potential mechanisms [14]. Li et al. [14] observed in other species the alignment
690 of carbonate inclusions in some cells and facets on some them. They also noted a tight spatial
691 association between ACC and polyphosphate inclusions in *G. lithophora*, similar to the tight
692 association sometimes observed between polyphosphates and carboxysomes. Based on these
693 observations and since the conversion of bicarbonate ions to CO_2 in carboxysomes might be a
694 driver of ACC precipitation, they suggested that ACC precipitation may start on carboxysomes.
695 However, this was not confirmed by TEM observations. TEM analyses of samples prepared by
696 conventional ultramicrotomy are not appropriate since iACC dissolves very fast upon sample
697 processing [14]. Blondeau et al. [157] solved the problem by using cryo-electron microscopy
698 of vitreous section (CEMOVIS). As a result, they showed that iACC inclusions were
699 systematically surrounded by an electron dense envelope measuring ~ 2.5 nm in thickness, i.e.
700 about half of the thickness of a lipid bilayer. The exact nature of this envelope, either
701 proteinaceous or a lipid monolayer remains unknown. However, this suggests that ACC forms
702 within an intracellular compartment where pH and/or Ca^{2+} and CO_3^{2-} concentrations might be
703 much higher than in the cytoplasm. Moreover, confinement in such a compartment may explain
704 the stabilization of the amorphous structure of CaCO_3 [158]. The observation of such a
705 compartment, where chemical conditions might be different from those prevailing in the
706 cytoplasm reconciles our knowledge about the conditions necessary for ACC precipitation and
707 the observation of iACC in cyanobacteria. Indeed, ACC precipitation is thermodynamically
708 impossible under the chemical conditions that are believed to exist within the cytoplasm of
709 cyanobacteria [159]. Similarly, with what has been proposed for *Achromatium*, an active uptake
710 of Ca^{2+} may feed iACC biomineralization. This active transport may be at least partly at the
711 origin of the energy cost of this biomineralization pathway and explain how cyanobacteria can
712 form ACC in otherwise undersaturated extracellular solutions [160]. Following the same line

713 of a strong connection between ACC biomineralization and a particular Ca homeostasis, De
714 Wever et al. [155] showed that iACC-forming cyanobacteria incorporate much more Ca than
715 other cyanobacteria. Moreover, some of the iACC-forming strains require higher Ca
716 concentrations to grow well. However, no molecular actor has been evidenced yet which might
717 be exclusively shared by all iACC-forming cyanobacteria. Genes coding for Ca_2^+/H^+
718 exchangers, and diverse calcium/cation exchangers, all involved in Ca active transport, have
719 been found in all studied genomes of iACC-forming cyanobacteria [155]. Genes coding for a
720 mechanosensitive channel have also been found in all these genomes. However, those genes
721 can also be found in bacteria not forming ACC [155]. In contrast, genes coding for Ca_2^+ -
722 ATPases, Pit and $\text{Ca}_2^+/\text{Na}^+$ antiporters were found in some but not all iACC-forming
723 cyanobacteria.

724 Last, a preferential uptake of the heaviest alkaline earth elements ($\text{Ba} > \text{Sr} > \text{Ca} > \text{Mg}$) was
725 observed in *G. lithophora* but not in several other iACC-forming cyanobacteria, suggesting that
726 it involves additional molecular mechanisms [161]. Such a preferential uptake explains why the
727 Ba/Ca and Sr/Ca atom ratios of the intracellular carbonates in *G. lithophora* cells were higher
728 by factors of 1370 and 86 than those prevailing in their extracellular solution. This preferential
729 uptake is interesting since it may have a significant impact on the geochemical cycles of trace
730 alkaline earth elements [162] and may be used to remediate pollutions by radioactive isotopes
731 [15].

732 As mentioned above, because of the poor stability of ACC and based on recent teachings from
733 the discovery of iACC by cyanobacteria, we may have overlooked a part of the bacterial
734 diversity able to control intracellular biomineralization of CaCO_3 . Recent field studies have
735 observed non-identified organisms forming intracellular CaCO_3 [163]. Exploring further this
736 diversity may help to better understand the molecular mechanisms involved in this
737 biomineralization process.

738



739

740 Figure 5: Transmission electron microscopy images in the bright field mode of ACC-forming
741 cyanobacteria: (a) *Cyanotheca* sp. PCC 7425 cells showing ACC inclusions (darkest inclusion)
742 scattered throughout the cells; (b) *Synechococcus lividus* PCC 6716 cells showing ACC
743 inclusions (darkest inclusions) located at the septum and the poles of the cells [38]. Some
744 brighter inclusions are also visible in both strains and correspond to polyphosphate granules.

745

746

747 **Conclusion**

748 A large diversity of mechanisms is involved in the biomineralization of carbonates by bacteria.
749 Biological mediation may involve molecules favoring mineral nucleation by changing the
750 interfacial energy between the extracellular solution and a nascent nucleus (influenced
751 mineralization). Another mode of mediation, compatible with the first one, involves some
752 bacterial metabolic activities. These activities impact the pH and/or the concentrations of
753 bicarbonate and/or Ca^{2+} ions of the extracellular solution where cells thrive. Last, controlled
754 biomineralization follows similar molecular processes but is distinguished based on the fact
755 that it involves dedicated genes.

33

756 In this review, we focused on the diversity of mechanisms involved in bacterial CaCO₃
757 biomineralization. An alternative and yet related question is that of the biological function of
758 this process. The existence of a function in the case of induced and influenced mineralization
759 has been debated. Simkiss [164] proposed that the intracellular precipitation of Ca-rich mineral
760 phases might be a way to detoxify cells from Ca and contribute to the maintenance of low
761 intracellular Ca contents. Following this line, Anderson et al. [165] postulated that extracellular
762 formation of CaCO₃ might similarly have a role in cell Ca homeostasis by detoxifying
763 extracellular Ca excess. The idea that the bacterial mediation of extracellular CaCO₃
764 precipitation may serve the Ca homeostasis of cells and protect them in Ca-rich environments
765 was repeatedly reaffirmed, including by, e.g. Banks et al. [143]. The way this may be
766 understood is that cells, by lowering the apparent solubility of CaCO₃ either by heterogeneous
767 nucleation and/or shifting pH and/or [HCO₃⁻] may lower the activity of Ca²⁺. However, the
768 statement by Simkiss [164] that these precipitates are 'highly insoluble deposits' should be put
769 in perspective. Ca²⁺ activity never becomes null because of the formation of these precipitates
770 but equal to a value imposed by the equilibrium between the solution and the precipitated Ca-
771 mineral phase. For example, in the case of iACC biomineralization by cyanobacteria, the
772 expected value of Ca²⁺ concentration at equilibrium with ACC when pH is 7.9 and [HCO₃⁻] is
773 30 mM would be 441 μM, i.e. much higher than the necessary 100 nM regulated by cell
774 homeostasis. This questions the role of these biominerals in this process. Obst et al. [166] did
775 not suggest a real advantage provided to the cells by CaCO₃ precipitation but instead postulated
776 that the stabilization of ACC was a protective mechanism against the formation of unwanted
777 crystalline CaCO₃. Schulze-Lam et al. [67] proposed that the localization of CaCO₃
778 precipitation on protein S-layers that can later on be shed, may serve as a mechanism against
779 cell encrustation. Overall, we note that there may be no function at all for the cell in the case of
780 induced or influenced mineralization. Looking systematically for one function results from an

781 adaptationist (or Panglossian) view. While we acknowledge that selection is a fundamental
782 process, the mineralization of CaCO₃ may be a secondary byproduct of other processes, the
783 latter being the ones that are selected for any other reason.
784 For controlled mineralization, several functions have been suggested: for cyanobacteria it has
785 been proposed that (i) iACC alters the buoyant density of cells and may serve as a ballast [14];
786 (ii) iACC may serve as a storage of inorganic C for photosynthesis and/or to maintain relatively
787 constant C/N ratios within the cells [106]; (iii) alternatively, carbonate precipitation may act as
788 pH buffer during photosynthesis [152]. Similar hypotheses have been formulated for
789 *Achromatium*, including a role of pH buffer during redox reactions affecting the different sulfur
790 species. Controlled mineralization of carbonates has often been described in eukaryotes. Only
791 a future detailed understanding of the molecular processes and actors involved in bacterial
792 biomineralization will help to infer whether some of them might be shared between prokaryotes
793 and eukaryotes and how they evolved throughout life history.

794

795

796 **List of abbreviations**

797

798 ACC: amorphous calcium carbonate

799 CA: carbonic anhydrase

800 CEMOVIS: cryo-electron microscopy of vitreous section

801 EPS: Extracellular polymeric substances

802 iACC: intracellular amorphous Ca-carbonate

803

804 **Funding**

805 This work was supported by the French National Research Agency (HARLEY: ANR-19-CE44-
806 0017) and the Action Transversale du Muséum (ATM, MNHN). Sigrid Görden's PhD was
807 supported by the program Interfaces pour le vivant from Sorbonne University.

808

809 **Authors' contributions**

810 Conceptualization: KB, SG, FSP, FC, CCC
811 - Writing original draft preparation: SG, KB, CCC
812 - Writing—review and editing: SG, KB, CCC, FSP, FC, MG
813 - Figures: SG, CCC, KB
814 - Funding acquisition: KB
815 All authors have read and agreed to the published version of the manuscript
816
817

818 **References**

819

- 820 1. Gadd GM. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation.
821 *Microbiology*. 2010;156:609–43.
- 822 2. Kenward PA, Goldstein RH, González LA, Roberts JA. Precipitation of low-temperature
823 dolomite from an anaerobic microbial consortium: the role of methanogenic Archaea.
824 *Geobiology*. 2009;7:556–65.
- 825 3. Ehrenberg CG. Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen: ein Blick in das tiefere
826 organische Leben der Natur: nebst einem Atlas von vierundsechzig colorirten Kupfertafeln,
827 gezeichnet vom Verfasser. Leipzig: Voss; 1838. doi:10.3931/e-rara-12412.
- 828 4. Schewiakoff W. Über einen neuen bakteriennähnlichen organismus des Süßwassers.
829 Habilitationsschrift. Heidelberg; 1893.
- 830 5. Nadson G. Microorganisms as geological agents (Russian). Works Investig Slavian Miner
831 Waters St Petersburg. 1903.
- 832 6. Drew GH. The action of some denitrifying bacteria in tropical and temperate seas, and the
833 bacterial precipitation of calcium carbonate in the sea. *J Mar Biol Assoc U K*. 1911;9:142–55.
- 834 7. Kalkowsky E. Oolith und Stromatolith im norddeutschen Buntsandstein. *Z Dtsch Geol Ges*.
835 1908;68–125.
- 836 8. Saghai A, Zivanovic Y, Moreira D, Benzerara K, Bertolino P, Ragon M, et al. Comparative
837 metagenomics unveils functions and genome features of microbialite-associated communities
838 along a depth gradient: Comparative metagenomics of microbialites from Lake Alchichica.
839 *Environ Microbiol*. 2016;18:4990–5004.
- 840 9. Boquet E. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general
841 phenomenon. *Nature*. 1973;246:527–9.
- 842 10. Han, Wang, Zhao, Tucker, Zhao, Wu, et al. Mechanism of biomineralization induced by
843 *Bacillus subtilis* J2 and characteristics of the biominerals. *Minerals*. 2019;9:218.
- 844 11. Rodriguez-Navarro C, Jimenez-Lopez C, Rodriguez-Navarro A, Gonzalez-Muñoz MT,
845 Rodriguez-Gallego M. Bacterially mediated mineralization of vaterite. *Geochim Cosmochim*

- 846 Acta. 2007;71:1197–213.
- 847 12. Bundeleva IA, Shirokova LS, Bénézech P, Pokrovsky OS, Kompantseva EI, Balor S.
848 Calcium carbonate precipitation by anoxygenic phototrophic bacteria. Chem Geol.
849 2012;291:116–31.
- 850 13. Pan J, Zhao H, Tucker ME, Zhou J, Jiang M, Wang Y, et al. Biomineralization of
851 monohydrocalcite induced by the halophile *Halomonas smyrnensis* WMS-3. Minerals.
852 2019;9:632.
- 853 14. Li J, Margaret Oliver I, Cam N, Boudier T, Blondeau M, Leroy E, et al. Biomineralization
854 patterns of intracellular carbonatogenesis in cyanobacteria: molecular hypotheses. Minerals.
855 2016;6:10.
- 856 15. Mehta N. Sequestration of radionuclides Radium-226 and Strontium-90 by cyanobacteria
857 forming intracellular calcium carbonates. Environ Sci Technol. 2019;53:12639–47.
- 858 16. Warthmann R, Lith Y van, Vasconcelos C, McKenzie JA, Karpoff AM. Bacterially induced
859 dolomite precipitation in anoxic culture experiments. Geology. 2000;28:1091–4.
- 860 17. Lamérand C, Shirokova LS, Bénézech P, Rols J-L, Pokrovsky OS. Olivine dissolution and
861 hydrous Mg carbonate and silicate precipitation in the presence of microbial consortium of
862 photo-autotrophic and heterotrophic bacteria. Geochim Cosmochim Acta. 2020;268:123–41.
- 863 18. Sánchez-Román M, Fernández-Remolar D, Amils R, Sánchez-Navas A, Schmid T, Martin-
864 Uriz PS, et al. Microbial mediated formation of Fe-carbonate minerals under extreme acidic
865 conditions. Sci Rep. 2015;4:4767.
- 866 19. Zavarzin GA. Microbial geochemical calcium cycle. Microbiology. 2002;71:1–17.
- 867 20. Riding R. Cyanobacterial calcification, carbon dioxide concentrating mechanisms, and
868 Proterozoic-Cambrian changes in atmospheric composition. Geobiology. 2006;4:299–316.
- 869 21. Altermann W, Kazmierczak J, Oren A, Wright DT. Cyanobacterial calcification and its
870 rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history. Geobiology. 2006;4:147–66.
- 871 22. Li J, Benzerara K, Bernard S, Beyssac O. The link between biomineralization and
872 fossilization of bacteria: Insights from field and experimental studies. Chem Geol.
873 2013;359:49–69.
- 874 23. Benzerara K, Menguy N. Looking for traces of life in minerals. Comptes Rendus Palevol.
875 2009;8:617–28.
- 876 24. Summons RE, Amend JP, Bish D, Buick R, Cody GD, Des Marais DJ, et al. Preservation
877 of Martian organic and environmental records: final report of the Mars biosignature working
878 group. Astrobiology. 2011;11:157–81.
- 879 25. Wacey D. Earliest evidence for life on Earth: an Australian perspective. Aust J Earth Sci.
880 2012;59:153–66.
- 881 26. Grotzinger JP, Knoll AH. Stromatolites in Precambrian carbonates: Evolutionary mileposts
882 or environmental dipsticks? Annu Rev Earth Planet Sci. 1999;27:313–58.
- 883 27. Hofmann HJ, Grey K, Hickman AH, Thorpe RI. Origin of 3.45 Ga coniform stromatolites
884 in Warrawoona Group, Western Australia. GSA Bull. 1999;111:1256–62.
- 885 28. Warren LA, Maurice PA, Parmar N, Ferris FG. Microbially mediated calcium carbonate
886 precipitation: implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of
887 inorganic contaminants. Geomicrobiol J. 2001;18:93–115.
- 888 29. McCutcheon J, Power IM, Harrison AL, Dipple GM, Southam G. A greenhouse-scale
889 photosynthetic microbial bioreactor for carbon sequestration in magnesium carbonate minerals.
890 Environ Sci Technol. 2014;48:9142–51.
- 891 30. Zhu T, Dittrich M. Carbonate precipitation through microbial activities in natural
892 environment, and their potential in biotechnology: a review. Front Bioeng Biotechnol. 2016;4.
893 doi:10.3389/fbioe.2016.00004.
- 894 31. Al-Thawadi SM. Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of
895 strength enhancement of sand. 2011;:18.

- 896 32. Whiffin VS. Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique.
897 Geomicrobiol J. 2007;24:417–23.
- 898 33. Castanier S. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis — the microbiogeologist
899 point of view. Sediment Geol. 1999;126:9–23.
- 900 34. De Yoreo JJ, Vekilov PG. Principles of crystal nucleation and growth. Rev Mineral
901 Geochem. 2003;54:57–93.
- 902 35. Giuffrè AJ, Hamm LM, Han N, De Yoreo JJ, Dove PM. Polysaccharide chemistry regulates
903 kinetics of calcite nucleation through competition of interfacial energies. Proc Natl Acad Sci.
904 2013;110:9261–6.
- 905 36. Dupraz C, Reid RP, Braissant O, Decho AW, Norman RS, Visscher PT. Processes of
906 carbonate precipitation in modern microbial mats. Earth-Sci Rev. 2009;96:141–62.
- 907 37. Gray ND. The unique role of intracellular calcification in the genus *Achromatium*. In:
908 Shively JM, editor. Inclusions in Prokaryotes. Berlin, Heidelberg: Springer; 2006. p. 299–309.
909 doi:10.1007/3-540-33774-1_11.
- 910 38. Benzerara K, Skouri-Panet F, Li J, Férard C, Gugger M, Laurent T, et al. Intracellular Ca-
911 carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci.
912 2014;111:10933–8.
- 913 39. Mendes Monteiro J, Vogwill R, Bischoff K, Gleeson DB. Comparative metagenomics of
914 microbial mats from hypersaline lakes at Rottneest Island (WA, Australia), advancing our
915 understanding of the effect of mat community and functional genes on microbialite accretion.
916 Limnol Oceanogr. 2020;65. doi:10.1002/lno.11323.
- 917 40. Liu Z, Sun Y, Zhang Y, Qin S, Sun Y, Mao H, et al. Desert soil sequesters atmospheric CO₂
918 by microbial mineral formation. Geoderma. 2020;361:114104.
- 919 41. DeFarge C, Trichet J, Jaunet A-M, Robert M, Tribble J, Sansone FJ. Texture of microbial
920 sediments revealed by cryo-scanning electron microscopy. J Sediment Res. 1996;66:935–47.
- 921 42. Marin F, Bundeleva I, Takeuchi T, Immel F, Medakovic D. Organic matrices in metazoan
922 calcium carbonate skeletons: Composition, functions, evolution. J Struct Biol. 2016;196:98–
923 106.
- 924 43. Warren LA, Ferris FG. Continuum between sorption and precipitation of Fe(III) on
925 microbial surfaces. Environ Sci Technol. 1998;32:2331–7.
- 926 44. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. 2010;8:623–33.
- 927 45. Sheng G-P, Yu H-Q, Li X-Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial
928 aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. Biotechnol Adv.
929 2010;28:882–94.
- 930 46. Dupraz C, Visscher PT, Baumgartner LK, Reid RP. Microbe–mineral interactions: early
931 carbonate precipitation in a hypersaline lake (Eleuthera Island, Bahamas). Sedimentology.
932 2004;51:745–65.
- 933 47. Benzerara K, Menguy N, López-García P, Yoon T-H, Kazmierczak J, Tyliczszak T, et al.
934 Nanoscale detection of organic signatures in carbonate microbialites. Proc Natl Acad Sci.
935 2006;103:9440–5.
- 936 48. Costa OYA, Raaijmakers JM, Kuramae EE. Microbial extracellular polymeric substances:
937 ecological function and impact on soil aggregation. Front Microbiol. 2018;9.
938 doi:10.3389/fmicb.2018.01636.
- 939 49. Rühmann B, Schmid J, Sieber V. Methods to identify the unexplored diversity of microbial
940 exopolysaccharides. Front Microbiol. 2015;6. doi:10.3389/fmicb.2015.00565.
- 941 50. Couradeau E, Benzerara K, Moreira D, Gérard E, Kazmierczak J, Tavera R, et al.
942 Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the
943 alkaline lake Alchichica (Mexico). PLoS ONE. 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0028767.
- 944 51. Arp G, Thiel V, Reimer A, Michaelis W, Reitner J. Biofilm exopolymers control
945 microbialite formation at thermal springs discharging into the alkaline Pyramid Lake, Nevada,

- 946 USA. *Sediment Geol.* 1999;126:159–76.
- 947 52. Kawaguchi T, Decho AW. A laboratory investigation of cyanobacterial extracellular
948 polymeric secretions (EPS) in influencing CaCO₃ polymorphism. *J Cryst Growth.*
949 2002;240:230–5.
- 950 53. Arp G, Reimer A, Reitner J. Calcification in cyanobacterial biofilms of alkaline salt lakes.
951 *Eur J Phycol.* 1999;34:393–403.
- 952 54. Luo J, Kong F, Ma X. Role of aspartic acid in the synthesis of spherical vaterite by the
953 Ca(OH)₂–CO₂ reaction. *Cryst Growth Des.* 2016;16:728–36.
- 954 55. Braissant O. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial
955 environments: the role of exopolysaccharides and amino acids. *J Sediment Res.* 2003;73:485–
956 90.
- 957 56. Borah BM, Singh AK, Ramesh A, Das G. Lactic acid bacterial extract as a biogenic mineral
958 growth modifier. *J Cryst Growth.* 2009;311:2664–72.
- 959 57. Jittawuttipoka T, Planchon M, Spalla O, Benzerara K, Guyot F, Cassier-Chauvat C, et al.
960 Multidisciplinary evidences that *Synechocystis* PCC 6803 exopolysaccharides operate in cell
961 sedimentation and protection against salt and metal stresses. *PLoS ONE.* 2013;8.
962 doi:10.1371/journal.pone.0055564.
- 963 58. González-Muñoz MT, Omar NB, Martínez-Cañamero M, Rodríguez-Gallego M, Galindo
964 AL, Arias J. Struvite and calcite crystallization induced by cellular membranes of *Myxococcus*
965 *xanthus*. *J Cryst Growth.* 1996;163:434–9.
- 966 59. Chekroun KB. Precipitation and growth morphology of calcium carbonate induced by
967 *Myxococcus xanthus*: implications for recognition of bacterial carbonates. *J Sediment Res.*
968 2004;74:868–76.
- 969 60. Perito B, Marvasi M, Barabesi C, Mastromei G, Bracci S, Vendrell M, et al. A *Bacillus*
970 *subtilis* cell fraction (BCF) inducing calcium carbonate precipitation: Biotechnological
971 perspectives for monumental stone reinforcement. *J Cult Herit.* 2014;15:345–51.
- 972 61. Yee N, Fein J. Cd adsorption onto bacterial surfaces: A universal adsorption edge? *Geochim*
973 *Cosmochim Acta.* 2001;65:2037–42.
- 974 62. Obst M, Wehrli B, Dittrich M. CaCO₃ nucleation by cyanobacteria: laboratory evidence for
975 a passive, surface-induced mechanism. *Geobiology.* 2009;7:324–47.
- 976 63. Dittrich M, Sibling S. Cell surface groups of two picocyanobacteria strains studied by zeta
977 potential investigations, potentiometric titration, and infrared spectroscopy. *J Colloid Interface*
978 *Sci.* 2005;286:487–95.
- 979 64. Beveridge TJ, Murray RG. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J*
980 *Bacteriol.* 1980;141:876–87.
- 981 65. Markai S, Andrès Y, Montavon G, Grambow B. Study of the interaction between europium
982 (III) and *Bacillus subtilis*: fixation sites, biosorption modeling and reversibility. *J Colloid*
983 *Interface Sci.* 2003;262:351–61.
- 984 66. Martínez RE, Gardés E, Pokrovsky OS, Schott J, Oelkers EH. Do photosynthetic bacteria
985 have a protective mechanism against carbonate precipitation at their surfaces? *Geochim*
986 *Cosmochim Acta.* 2010;74:1329–37.
- 987 67. Schultze-Lam S, Harauz G, Beveridge TJ. Participation of a cyanobacterial S layer in fine-
988 grain mineral formation. *J Bacteriol.* 1992;174:7971–81.
- 989 68. Schultze-Lam S, Beveridge TJ. Physicochemical characteristics of the mineral-forming S-
990 layer from the cyanobacterium *Synechococcus* strain GL24. *Can J Microbiol.* 1994;40:216–23.
- 991 69. Marvasi M. Involvement of *etfA* gene during CaCO₃ precipitation in *Bacillus subtilis*
992 biofilm. *Geomicrobiol J.* 2017;34:722–8.
- 993 70. Hintze PE, Nicholson WL. Single-spore elemental analyses indicate that dipicolinic acid-
994 deficient *Bacillus subtilis* spores fail to accumulate calcium. *Arch Microbiol.* 2010;192:493–7.
- 995 71. Sánchez-Román, Rivadeneyra MA, Vasconcelos C, McKenzie JA. Biomineralization of

996 carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria: Mineral precipitation by halophilic
997 bacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 2007;61:273–84.

998 72. Shiraki R, Brantley SL. Kinetics of near-equilibrium calcite precipitation at 100°C: An
999 evaluation of elementary reaction-based and affinity-based rate laws. *Geochim Cosmochim*
1000 *Acta.* 1995;59:1457–71.

1001 73. Morse JW, Arvidson RS, Lüttge A. Calcium carbonate formation and dissolution. *Chem*
1002 *Rev.* 2007;107:342–81.

1003 74. van der Weijden CH, van der Weijden RD. Calcite growth: Rate dependence on saturation,
1004 on ratios of dissolved calcium and (bi)carbonate and on their complexes. *J Cryst Growth.*
1005 2014;394:137–44.

1006 75. White RAI, Chan AM, Gavelis GS, Leander BS, Brady AL, Slater GF, et al. Metagenomic
1007 analysis suggests modern freshwater microbialites harbor a distinct core microbial community.
1008 *Front Microbiol.* 2016;6. doi:10.3389/fmicb.2015.01531.

1009 76. Verrecchia EP, Freytet P, Verrecchia KE, Dumont J-L. Spherulites in calcrete laminar
1010 crusts; biogenic CaCO₃ precipitation as a major contributor to crust formation. *J Sediment Res.*
1011 1995;65:690–700.

1012 77. Badger MR, Hanson D, Price GD. Evolution and diversity of CO₂ concentrating
1013 mechanisms in cyanobacteria. *Funct Plant Biol.* 2002;29:161.

1014 78. Price GD, Badger MR, Woodger FJ, Long BM. Advances in understanding the
1015 cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters,
1016 diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. *J Exp Bot.*
1017 2008;59:1441–61.

1018 79. Klanchui A, Cheevadhanarak S, Prommeenate P, Meechai A. Exploring Components of the
1019 CO₂-concentrating mechanism in alkaliphilic cyanobacteria through genome-based analysis.
1020 *Comput Struct Biotechnol J.* 2017;15:340–50.

1021 80. Waditee R, Hossain GS, Tanaka Y, Nakamura T, Shikata M, Takano J, et al. Isolation and
1022 functional characterization of Ca²⁺/H⁺ antiporters from cyanobacteria. *J Biol Chem.*
1023 2004;279:4330–8.

1024 81. Jiang H-B, Cheng H-M, Gao K-S, Qiu B-S. Inactivation of Ca²⁺/H⁺ exchanger in
1025 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 promotes cyanobacterial calcification by upregulating CO₂-
1026 concentrating mechanisms. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79:4048–55.

1027 82. Bose H, Satyanarayana T. Microbial carbonic anhydrases in biomimetic carbon
1028 sequestration for mitigating global warming: prospects and perspectives. *Front Microbiol.*
1029 2017;8. doi:10.3389/fmicb.2017.01615.

1030 83. Effendi SSW, Ng I-S. The prospective and potential of carbonic anhydrase for carbon
1031 dioxide sequestration: A critical review. *Process Biochem.* 2019;87:55–65.

1032 84. Le Roy N, Jackson DJ, Marie B, Ramos-Silva P, Marin F. The evolution of metazoan α-
1033 carbonic anhydrases and their roles in calcium carbonate biomineralization. *Front Zool.*
1034 2014;11:75.

1035 85. Achal V, Pan X. Characterization of urease and carbonic anhydrase producing bacteria and
1036 their role in calcite precipitation. *Curr Microbiol.* 2011;62:894–902.

1037 86. Smith KS, Ferry JG. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24:335–
1038 66.

1039 87. Capasso C, Supuran CT. An overview of the alpha-, beta- and gamma-carbonic anhydrases
1040 from Bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria? *J*
1041 *Enzyme Inhib Med Chem.* 2015;30:325–32.

1042 88. Supuran CT, Capasso C. New light on bacterial carbonic anhydrases phylogeny based on
1043 the analysis of signal peptide sequences. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31:1254–60.

1044 89. Srivastava S, Bharti RK, Verma PK, Thakur I shekhar. Cloning and expression of gamma
1045 carbonic anhydrase from *Serratia* sp. ISTD04 for sequestration of carbon dioxide and formation

1046 of calcite. *Bioresour Technol.* 2015;188:209–13.

1047 90. Prabhu C, Wanjari S, Puri A, Bhattacharya A, Pujari R, Yadav R, et al. Region-specific
1048 bacterial carbonic anhydrase for biomimetic sequestration of carbon dioxide. *Energy Fuels.*
1049 2011;25:1327–32.

1050 91. Castro-Alonso MJ, Montañez-Hernandez LE, Sanchez-Muñoz MA, Macias Franco MR,
1051 Narayanasamy R, Balagurusamy N. Microbially Induced calcium carbonate precipitation
1052 (micp) and its potential in bioconcrete: microbiological and molecular concepts. *Front Mater.*
1053 2019;6:126.

1054 92. Martinez RE, Weber S, Grimm C. Effects of freshwater *Synechococcus* sp. cyanobacteria
1055 pH buffering on CaCO₃ precipitation: Implications for CO₂ sequestration. *Appl Geochem.*
1056 2016;75:76–89.

1057 93. Merz MUE. The biology of carbonate precipitation by cyanobacteria. *Facies.* 1992;26:81–
1058 101.

1059 94. Garcia-Pichel F, Ramirez-Reinat E, Gao Q. Microbial excavation of solid carbonates
1060 powered by P-type ATPase-mediated transcellular Ca²⁺ transport. *Proc Natl Acad Sci.*
1061 2010;107:21749–54.

1062 95. Zhu Y, Ma N, Jin W, Wu S, Sun C. Genomic and transcriptomic insights into calcium
1063 carbonate biomineralization by marine *Actinobacterium brevibacterium* line BS258. *Front*
1064 *Microbiol.* 2017;8. doi:10.3389/fmicb.2017.00602.

1065 96. Berg IA. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation
1066 pathways. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:1925–36.

1067 97. Bosak T, Greene SE, Newman DK. A likely role for anoxygenic photosynthetic microbes
1068 in the formation of ancient stromatolites. *Geobiology.* 2007;5:119–26.

1069 98. Michaelis W, Seifert R, Nauhaus K, Treude T, Thiel V, Blumenberg M, et al. Microbial
1070 reefs in the black sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science.* 2002;297:1013–5.

1071 99. Krause S, Aloisi G, Engel A, Liebetrau V, Treude T. Enhanced calcite dissolution in the
1072 presence of the aerobic methanotroph *Methylosinus trichosporium*. *Geomicrobiol J.*
1073 2014;31:325–37.

1074 100. Wittkop C, Swanner ED, Grengs A, Lambrecht N, Fakhrae M, Myrbo A, et al. Evaluating
1075 a primary carbonate pathway for manganese enrichments in reducing environments. *Earth*
1076 *Planet Sci Lett.* 2020;538:116201.

1077 101. Smith GJ, Wrighton KC. Metagenomic approaches unearth methanotroph phylogenetic
1078 and metabolic diversity. in: methylotrophs and methylotroph communities. Caister Academic
1079 Press; 2019. doi:10.21775/9781912530045.03.

1080 102. Perito B. Bacterial genes involved in calcite crystal precipitation. In: Of microbes and art:
1081 the role of microbial communities in the degradation and protection of cultural heritage. Boston,
1082 MA: Springer US; 2000. p. 219–30. doi:10.1007/978-1-4615-4239-1_15.

1083 103. Barabesi C. *Bacillus subtilis* Gene cluster involved in calcium carbonate
1084 biomineralization. *J Bacteriol.* 2007;189:228–35.

1085 104. Marvasi M. Physiological requirements for carbonate precipitation during biofilm
1086 development of *Bacillus subtilis etfA* mutant. *FEMS Microbiol Ecol.* 2010;71:341–50.

1087 105. Stocks-Fischer S, Galinat JK, Bang SS. Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biol*
1088 *Biochem.* 1999;31:1563–71.

1089 106. Veaudor T, Cassier-Chauvat C, Chauvat F. Genomics of urea transport and catabolism in
1090 cyanobacteria: biotechnological implications. *Front Microbiol.* 2019;10.
1091 doi:10.3389/fmicb.2019.02052.

1092 107. Hammes F, Boon N, de Villiers J, Verstraete W, Siciliano SD. Strain-specific ureolytic
1093 microbial calcium carbonate precipitation. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:4901–9.

1094 108. Bachmeier KL, Williams AE, Warmingtong JR, Bang SS. Urease activity in
1095 microbiologically-induced calcite precipitation. *J Biotechnol.* 2002;93:171–81.

- 1096 109. Achal V, Mukherjee A, Basu PC, Reddy MS. Strain improvement of *Sporosarcina*
1097 *pasteurii* for enhanced urease and calcite production. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009;36:981–
1098 8.
- 1099 110. Oshiki M, Araki M, Hirakata Y, Hatamoto M, Yamaguchi T, Araki N. Ureolytic
1100 prokaryotes in soil: community abundance and diversity. *Microbes Environ*. 2018;33:230–3.
- 1101 111. Harder Nielsen T, Bonde TA, Sørensen J. Significance of microbial urea turnover in N
1102 cycling of three Danish agricultural soils. *FEMS Microbiol Ecol*. 1998;25:147–57.
- 1103 112. Krajewska B. Ureasases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J Mol Catal*
1104 *B Enzym*. 2009;59:9–21.
- 1105 113. Mitchell A, Espinosa-Ortiz EJ, Parks SL, Phillips AJ, Cunningham AB, Gerlach R.
1106 Kinetics of calcite precipitation by ureolytic bacteria under aerobic and anaerobic conditions.
1107 *Biogeosciences*. 2019;16:2147–61.
- 1108 114. Zhao X. Study on the remediation of Cd pollution by the biomineralization of urease-
1109 producing bacteria. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16:268.
- 1110 115. Fisher KA, Yarwood SA, James BR. Soil urease activity and bacterial ureC gene copy
1111 numbers: effect of pH. *Geoderma*. 2017;285:1–8.
- 1112 116. van Paassen LA, Daza CM, Staal M, Sorokin DY, van der Zon W, van Loosdrecht
1113 MarkCM. Potential soil reinforcement by biological denitrification. *Ecol Eng*. 2010;36:168–
1114 75.
- 1115 117. Pham VP, van Paassen LA, van der Star WRL, Heimovaara TJ. Evaluating strategies to
1116 improve process efficiency of denitrification-based MICP. *J Geotech Geoenvironmental Eng*.
1117 2018;144:04018049.
- 1118 118. Drew GH. On the precipitation of calcium carbonate in the sea by marine bacteria, and on
1119 the action of denitrifying bacteria in tropical and temperate seas. *J Mar Biol Assoc U K*.
1120 1913;9:479–524.
- 1121 119. Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev*.
1122 1997;61:533–616.
- 1123 120. Potter L, Angove H, Richardson D, Cole J. Nitrate reduction in the periplasm of gram-
1124 negative bacteria. In: *Advances in microbial physiology*. Academic Press; 2001. p. 51–112.
1125 doi:10.1016/S0065-2911(01)45002-8.
- 1126 121. van Spanning RJM, Richardson DJ, Ferguson SJ. Chapter 1 - Introduction to the
1127 biochemistry and molecular biology of denitrification. In: Bothe H, Ferguson SJ, Newton WE,
1128 editors. *Biology of the nitrogen cycle*. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 3–20. doi:10.1016/B978-
1129 044452857-5.50002-3.
- 1130 122. Di Capua F, Pirozzi F, Lens PNL, Esposito G. Electron donors for autotrophic
1131 denitrification. *Chem Eng J*. 2019;362:922–37.
- 1132 123. Boyd ES, Lange RK, Mitchell AC, Havig JR, Hamilton TL, Lafrenière MJ, et al. Diversity,
1133 abundance, and potential activity of nitrifying and nitrate-reducing microbial assemblages in a
1134 subglacial ecosystem. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:4778–87.
- 1135 124. Mlewski EC, Pisapia C, Gomez F, Lecourt L, Soto Rueda E, Benzerara K, et al.
1136 Characterization of pustular mats and related *Rivularia*-rich laminations in oncoids from the
1137 Laguna Negra Lake (Argentina). *Front Microbiol*. 2018;9. doi:10.3389/fmicb.2018.00996.
- 1138 125. Zhu X, Wang J, De Belie N, Boon N. Complementing urea hydrolysis and nitrate reduction
1139 for improved microbially induced calcium carbonate precipitation. *Appl Microbiol Biotechnol*.
1140 2019;103:8825–38.
- 1141 126. Hamdan N. Carbonate mineral precipitation for soil improvement through microbial
1142 denitrification. *Geomicrobiol J*. 2017;34:139–46.
- 1143 127. Lee K-C. Effects of pH and precipitation on autohydrogenotrophic denitrification using
1144 the hollow-fiber membrane-biofilm reactor. *Water Res*. 2003;37:1551–6.
- 1145 128. Karatas I. Microbiological improvement of the physical properties of soils - ProQuest.

- 1146 2008. [https://search.proquest.com/openview/e911bbd4881768c073e54a82df893526/1?pq-](https://search.proquest.com/openview/e911bbd4881768c073e54a82df893526/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y)
1147 [origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y](https://search.proquest.com/openview/e911bbd4881768c073e54a82df893526/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y).
- 1148 129. Erşan. Microbially induced CaCO₃ precipitation through denitrification: An optimization
1149 study in minimal nutrient environment. *Biochem Eng J.* 2015;101:108–18.
- 1150 130. Rheinheimer G. Stickstoffkreislauf im wasser: stickstoffumsetzungen in natürlichen
1151 gewässern, in der abwasserreinigung und wasserversorgung; mit 42 Tabellen. München u.a.:
1152 Oldenbourg; 1988. <https://oceanrep.geomar.de/24552/>. Accessed 16 May 2020.
- 1153 131. Reyes C, Schneider D, Lipka M, Thürmer A, Böttcher ME, Friedrich MW. Nitrogen
1154 metabolism genes from temperate marine sediments. *Mar Biotechnol.* 2017;19:175–90.
- 1155 132. Krause S. Marine ammonification and carbonic anhydrase activity induce rapid calcium
1156 carbonate precipitation. *Geochim Cosmochim Acta.* 2018;243:116–32.
- 1157 133. Rodriguez-Navarro C. Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced
1158 carbonate biomineralization. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:2182–93.
- 1159 134. Braissant O, Decho AW, Dupraz C, Glunk C, Przekop KM, Visscher PT. Exopolymeric
1160 substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and
1161 implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology.* 2007;5:401–11.
- 1162 135. Gallagher KL, Dupraz C, Visscher PT. Two opposing effects of sulfate reduction on
1163 carbonate precipitation in normal marine, hypersaline, and alkaline environments:
1164 COMMENT. *Geology.* 2014;42:e313–4.
- 1165 136. Aloisi G. The calcium carbonate saturation state in cyanobacterial mats throughout Earth’s
1166 history. *Geochim Cosmochim Acta.* 2008;72:6037–60.
- 1167 137. Visscher PT, Reid RP, Bebout BM, Hoefft SE, Jr JAT. Formation of lithified micritic
1168 laminae in modern marine stromatolites (Bahamas): The role of sulfur cycling. *American*
1169 *Mineralogist.* 1998;83:1482–93.
- 1170 138. Himmler T, Smrzka D, Zwicker J, Kasten S, Shapiro RS, Bohrmann G, et al. Stromatolites
1171 below the photic zone in the northern Arabian Sea formed by calcifying chemotrophic microbial
1172 mats. *Geology.* 2018;46:339–42.
- 1173 139. Domínguez DC. Calcium Signaling in Prokaryotes. In: Buchholz JN, Behringer EJ,
1174 editors. Calcium and signal transduction. InTech; 2018. doi:10.5772/intechopen.78546.
- 1175 140. Norris V, Grant S, Freestone P, Canvin J, Sheikh FN, Toth I, et al. Calcium signalling in
1176 bacteria. *J Bacteriol.* 1996;178:3677–82.
- 1177 141. Hammes F, Verstraete W. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate
1178 precipitation. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 2002;1:3–7.
- 1179 142. McConnaughey TA, Whelan JF. Calcification generates protons for nutrient and
1180 bicarbonate uptake. *Earth-Sci Rev.* 1997;42:95–117.
- 1181 143. Banks ED, Taylor NM, Gulley J, Lubbers BR, Giarrizzo JG, Bullen HA, et al. Bacterial
1182 calcium carbonate precipitation in cave environments: a function of calcium homeostasis.
1183 *Geomicrobiol J.* 2010;27:444–54.
- 1184 144. Lisle JT, Robbins LL. Viral lysis of photosynthesizing microbes as a mechanism for
1185 calcium carbonate nucleation in seawater. *Front Microbiol.* 2016;7.
1186 doi:10.3389/fmicb.2016.01958.
- 1187 145. Xu H, Peng X, Bai S, Ta K, Yang S, Liu S, et al. Precipitation of calcium carbonate mineral
1188 induced by viral lysis of cyanobacteria: evidence from laboratory experiments. *Biogeosciences.*
1189 2019;16:949–60.
- 1190 146. Gray N, Head I. The family Achromatiaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S,
1191 Stackebrandt E, Thompson F, editors. *The Prokaryotes.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin
1192 Heidelberg; 2014. p. 1–14. doi:10.1007/978-3-642-38922-1_406.
- 1193 147. Head IM, Gray ND, Howarth R, Pickup RW, Clarke KJ, Jones JG. *Achromatium*
1194 *oxaliferum* understanding the unmistakable. In: Schink B, editor. *Advances in Microbial*
1195 *ecology.* Boston, MA: Springer US; 2000. p. 1–40. doi:10.1007/978-1-4615-4187-5_1.

- 1196 148. Salman V. Calcite-accumulating large sulfur bacteria of the genus *Achromatium* in
1197 Sippewissett Salt Marsh. ISME J. 2015;9:2503–14.
- 1198 149. Schorn S, Salman-Carvalho V, Littmann S, Ionescu D, Grossart H-P, Cypionka H. Cell
1199 architecture of the giant sulfur bacterium *Achromatium oxaliferum*: extra-cytoplasmic
1200 localization of calcium carbonate bodies. FEMS Microbiol Ecol. 2020;96:fiz200.
- 1201 150. Mansor M, Hamilton TL, Fantle MS, Macalady J. Metabolic diversity and ecological
1202 niches of *Achromatium* populations revealed with single-cell genomic sequencing. Front
1203 Microbiol. 2015;6. doi:10.3389/fmicb.2015.00822.
- 1204 151. Yang T, Teske A, Ambrose W, Salman-Carvalho V, Bagnell R, Nielsen LP. Intracellular
1205 calcite and sulfur dynamics of *Achromatium* cells observed in a lab-based enrichment and
1206 aerobic incubation experiment. Antonie Van Leeuwenhoek. 2019;112:263–74.
- 1207 152. Couradeau E. An early-branching microbialite cyanobacterium forms intracellular
1208 carbonates. Science. 2012;336:459–62.
- 1209 153. Moreira D, Tavera R, Benzerara K, Skouri-Panet F, Couradeau E, Gérard E, et al.
1210 Description of *Gloeomargarita lithophora* gen. nov., sp. nov., a thylakoid-bearing basal-
1211 branching cyanobacterium with intracellular carbonates, and proposal for Gloeomargaritales
1212 ord. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2017;67:653–8.
- 1213 154. Ponce-Toledo RI, Deschamps P, López-García P, Zivanovic Y, Benzerara K, Moreira D.
1214 An early-branching freshwater cyanobacterium at the origin of plastids. Curr Biol.
1215 2017;27:386–91.
- 1216 155. De Wever A, Benzerara K, Coutaud M, Caumes G, Poinot M, Skouri-Panet F, et al.
1217 Evidence of high Ca uptake by cyanobacteria forming intracellular CaCO₃ and impact on their
1218 growth. Geobiology. 2019;17:676–90.
- 1219 156. Ragon M, Benzerara K, Moreira D, Tavera R, Lopez-Garcia P. 16S rDNA-based analysis
1220 reveals cosmopolitan occurrence but limited diversity of two cyanobacterial lineages with
1221 contrasted patterns of intracellular carbonate mineralization. Front Microbiol. 2014;5.
1222 doi:10.3389/fmicb.2014.00331.
- 1223 157. Blondeau M, Sachse M, Boulogne C, Gillet C, Guigner J-M, Skouri-Panet F, et al.
1224 Amorphous calcium carbonate granules form within an intracellular compartment in calcifying
1225 cyanobacteria. Front Microbiol. 2018;9:1768.
- 1226 158. Stephens CJ, Ladden SF, Meldrum FC, Christenson HK. Amorphous calcium carbonate
1227 is stabilized in confinement. Adv Funct Mater. 2010;20:2108–15.
- 1228 159. Cam N, Georgelin T, Jaber M, Lambert J-F, Benzerara K. In vitro synthesis of amorphous
1229 Mg-, Ca-, Sr- and Ba-carbonates: What do we learn about intracellular calcification by
1230 cyanobacteria? Geochim Cosmochim Acta. 2015;161:36–49.
- 1231 160. Cam N, Benzerara K, Georgelin T, Jaber M, Lambert J-F, Poinot M, et al. Cyanobacterial
1232 formation of intracellular Ca-carbonates in undersaturated solutions. Geobiology. 2018;16:49–
1233 61.
- 1234 161. Cam N, Benzerara K, Georgelin T, Jaber M, Lambert J-F, Poinot M, et al. Selective
1235 uptake of alkaline earth metals by cyanobacteria forming intracellular carbonates. Environ Sci
1236 Technol. 2016;50:11654–62.
- 1237 162. Blondeau M, Benzerara K, Ferard C, Guigner J-M, Poinot M, Coutaud M, et al. Impact
1238 of the cyanobacterium *Gloeomargarita lithophora* on the geochemical cycles of Sr and Ba.
1239 Chem Geol. 2018;483:88–97.
- 1240 163. Miot J, Jézéquel D, Benzerara K, Cordier L, Rivas-Lamelo S, Skouri-Panet F, et al.
1241 Mineralogical diversity in Lake Pavin: connections with water column chemistry and
1242 biomineralization processes. Minerals. 2016;6:24.
- 1243 164. Simkiss K. Biomineralization and detoxification. Calcif Tissue Res. 1977;24:199–200.
- 1244 165. Anderson S. A novel role for calcite in calcium homeostasis. FEBS Lett. 1992;308:94–6.
- 1245 166. Obst M, Dynes JJ, Lawrence JR, Swerhone GDW, Benzerara K, Karunakaran C, et al.

1246 Precipitation of amorphous CaCO₃ (aragonite-like) by cyanobacteria: A STXM study of the
1247 influence of EPS on the nucleation process. *Geochim Cosmochim Acta*. 2009;73:4180–98.
1248 167. Pronina NA, Kupriyanova EV, Igamberdiev AU. Photosynthetic Carbon metabolism and
1249 CO₂-concentrating mechanism of cyanobacteria. In: Hallenbeck PC, editor. *Modern Topics in*
1250 *the phototrophic prokaryotes: metabolism, bioenergetics, and omics*. Cham: Springer
1251 International Publishing; 2017. p. 271–303. doi:10.1007/978-3-319-51365-2_8.
1252

1253

1254 **Captions**

1255

1256 Figure 1: Classification of the CaCO₃ biomineralization processes found in bacteria: a)
1257 biologically influenced mineralization; b) biologically induced mineralization; c) biologically
1258 controlled mineralization. The grey hexagons represent CaCO₃ precipitates. Ca²⁺ cations can be
1259 replaced by, e.g. other alkaline earth elements such as Mg²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺.

1260

1261 Figure 2: Some diversity of the molecules involved in biologically influenced mineralization
1262 of CaCO₃: a) extracellular polymeric substances, comprising polysaccharides and proteins; b)
1263 surface layers; c) cell walls comprising teichoic and/or dipicolinic acid functions and/or
1264 proteoglycans and glycoproteins.

1265

1266 Figure 3: Simplified model of CCM-dependent biologically induced mineralization of CaCO₃.
1267 Carbon concentrating mechanism CCM involves the uptake of HCO₃⁻. Carbonic anhydrase
1268 (CA) converts CO₂ into HCO₃⁻ in the cytoplasm and HCO₃⁻ into CO₂ in the carboxysome. CO₂
1269 is fixed by RubisCO and used by the Calvin-Benson-Bassham Cycle (CBBC). Conversion of
1270 HCO₃⁻ into CO₂ releases OH⁻. To buffer intracellular pH, specific transporters such as Ca²⁺/H⁺
1271 antiporters import H⁺ and export Ca²⁺. The import of H⁺ inside the cell lead to an increase of
1272 the extracellular pH, which together with export of Ca²⁺ favors the precipitation of extracellular
1273 CaCO₃. [20, 30, 167].

1274

1275 Figure 4: Intracellular CaCO₃ precipitation and the dissolution within *Achromatium* cells.
1276 Protons are consumed when sulfides (H₂S) are oxidized to elemental sulfur under anoxic
1277 conditions. This leads to an increase of pH and precipitation of CaCO₃ (grey ellipsoid). Protons
1278 are released when elemental sulfur (S) is oxidized to sulfates (SO₄²⁻) under oxic conditions.
1279 This results in the decrease of pH and dissolution of CaCO₃. Some debate exists about the
1280 localization of CaCO₃ precipitation: Head et al. [144] and Gray and Head [143] suggested that
1281 intracellular CaCO₃ are enclosed within an intracellular compartment delimited by a lipid
1282 bilayer (black line). In contrast, Schorn et al. [146] suggested that CaCO₃ forms within an
1283 invagination of the cytoplasmic membrane (blue line), open to the periplasm.

1284

1285 Figure 5: Transmission electron microscopy images in the bright field mode of ACC-forming
1286 cyanobacteria: (a) *Cyanothece* sp. PCC 7425 cells showing ACC inclusions (darkest inclusion)
1287 scattered throughout the cells; (b) *Synechococcus lividus* PCC 6716 cells showing ACC
1288 inclusions (darkest inclusions) located at the septum and the poles of the cells [38]. Some
1289 brighter inclusions are also visible in both strains and correspond to polyphosphate granules.

1290

1291

Tableau 1

Bacterially controlled CaCO ₃ mineralization					
Organism and environment of origin	Biomaterialized phase	Phenotypic observation	Techniques used	Molecular mechanisms and genes involved Evidence or Hypotheses	Refs
Proteobacteria					
<i>Achromatium</i> sp. Freshwater, brackish or marine water	Calcite or ACC?	Calcium carbonate bodies (5-6 mm) are located inside the cells within membrane-enclosed compartments. They may fill up more than 70% of cell volume. Alternative view: CaCO ₃ bodies are located in the periplasm, in pockets formed by the invagination of the cytoplasmic membrane. There are opposite conclusions between early studies suggesting that CaCO ₃ consists of ACC; more recent studies suggest instead that it is calcite	CLSM; SEM; TEM; XRD; Raman; single-cell genomics	No cultivated <i>Achromatium</i> strain is available but some assumptions have been drawn from metagenomics: Existence of a specific active mechanism for concentrating calcium from the environment. Genes encoding proteins involved in calcium transport: PMCA-like Ca ²⁺ -ATPase, a Na/H ⁺ -Ca exchanger (yrbG), pyrophosphatases and vacuolar(V)-type ATPases. Presence of CCM in some species "Intracellular" CaCO₃ inclusions accumulate upon oxidation of S²⁻ to S⁰, a process consuming H⁺ under anoxic conditions whereas they dissolve upon oxidation of S⁰ to SO₄²⁻ releasing H⁺ under oxic conditions. Role in pH buffering	Head et al. (2000); Salman et al. (2015); Schorn et al. (2020); Gray and Head (2014); Yang et al. (2019)
<i>Chromohalobacter israelensis</i> Halophilic	ACC?	CaCO ₃ >10 nm can be formed at some intracellular sites	TEM; ultramicrotomy	Membranes of intracellular vesicles might serve as nucleation sites. It would be necessary to examine these minerals and confirm they are CaCO ₃ by TEM with EDS and SAED analyses.	Han et al. (2017)

Bacillus

<p><i>Bacillus licheniformis</i> SRB2 Sludge sample of Moshui River, Qingdao, China</p>	ACC (?)	<p>SRB2 has been shown to precipitate extracellular carbonates, the nature of which depends on the dissolved Ca/Mg in the extracellular solution. It has also been suggested that they precipitate some intracellular (Ca,Mg)CO₃ based on TEM-EDX analyses and the measurement of a high Ca²⁺ cell content by Fluo-3M, a fluorescent probe sensitive to Ca²⁺ concentration. However, the TEM-EDX spectrum shown in Figure 8f does not show Ca or Mg but U and Os. This questions that there are CaCO₃ intracellular precipitates in the cells</p>	<p>16S sequencing; Cultivation SEM; EDS; XRD ultra-thin slices</p>	NA	<p>Zhao et al. (2019)</p>
--	---------	---	--	----	-------------------------------

Cyanobacteria					
<i>Chroococcidiopsis thermalis</i> PCC 7203 Soil near Greifswald, Germany	ACC	8-20 iACC (few cells) scattered throughout the cell cytoplasm (380-870 nm) Incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX; ICP-AES	Genes encoding proteins involved in the calcium transport: 2 P-type Ca ²⁺ -ATPases, 5 apnhaP Ca ²⁺ /H ⁺ antiporter at alkaline pH, 2 Ca ²⁺ /H ⁺ antiporter, 3 putative Ca ²⁺ /cation antiporters, 2 Ca ²⁺ /Na ⁺ antiporter, 1 small-conductance mechanosensitive channels, 1 mechanosensitive ion channels, 1 hBI -1 (pH sensitive channel), 1 Pit (CaHPO ₄ /H ⁺ symport). iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C _i available to the cells upon C-limited periods. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.	Benzerara et al. (2014); Blondeau et al. (2018a); De Wever et al. (2019)
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 7432 Water spring near Santa Fé, Isla de Pinos, Cuba	ACC	iACC scattered throughout the cells Incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX; ICP-AES	iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C _i available to the cells upon C-limited periods. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary	De Wever et al. (2019)
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 7433 Soil, dried pool, Pinar del Rio, Cuba	ACC	iACC scattered throughout the cells Incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX; ICP-AES	iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C _i available to the cells upon C-limited periods. . Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary	De Wever et al. (2019)
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 7434 Water pool Botanical garden, Havana, Cuba	ACC	iACC scattered throughout the cells Incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX; ICP-AES	iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C _i available to the cells upon C-limited periods. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.	De Wever et al. (2019)
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 7439 Sand beach, near Mamaia, Romania	ACC	iACC scattered throughout the cells Incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX; ICP-AES	iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C _i available to the cells upon C-limited periods. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.	De Wever et al. (2019)
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 9819 NA	ACC	iACC scattered throughout the cells Incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX; ICP-AES	iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C _i available to the cells upon C-limited periods. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.	De Wever et al. (2019)

<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425 Soil, rice field, Senegal	ACC	2-20 iACC scattered throughout the cell cytoplasm (130-700 nm) Presence of a thin layer around ACC inclusions Incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX; CEMOVIS; ICP-AES	Genes encoding proteins involved in the calcium transport: 1 P-type Ca^{2+} -ATPase, 4 apnhaP $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter at alkaline pH, 2 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter, 3 putative Ca^{2+} /cation antiporters, 2 $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ antiporters, 5 mechanosensitive ion channels, 1 hBI -1 (pH sensitive channel), 1 Pit ($\text{CaHPO}_4/\text{H}^{+}$ symport). Vesicle-based process is involved in the formation of Ca-carbonates. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.	Benzerara et al. (2014); Li et al. (2016); Cam et al. (2017); Blondeau et al. (2018a); De Wever et al. (2019)
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8303 Water, drinking fountain (10 - 11°C), Martigny-Les-Bains (thermal resort), Vosges, France	ACC	iACC scattered throughout the cells Incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX ICP-AES	iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C_i available to the cells upon C-limited periods. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.	De Wever et al. (2019)
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8955 J.-B. Bokassa's swimming pool Central African Republic	ACC	iACC scattered throughout the cells Incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX ICP-AES	iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C_i available to the cells upon C-limited periods. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.	De Wever et al. (2019)
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 9308 NA	ACC	iACC scattered throughout the cells Incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX ICP-AES	iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C_i available to the cells upon C-limited periods. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.	De Wever et al. (2019)

<p><i>Gloeomargarita lithophora</i> C7/D10 Alkaline Lake Alchichica, Mexico and numerous other localities</p>	ACC	<p>Mg-Ca-Sr-Ba carbonate iACC within the cell cytoplasm 3-19 iACC scattered throughout the cell cytoplasm (60-380 nm) Some iACC appeared to be aligned to one or several chains iACC are enclosed within a compartment delimited by a thin envelope Incorporating significantly more calcium than strains not forming iACC Higher demand of Ca for growth Preference for higher atomic number alkaline earth elements (Ra=Ba>Sr>Ca>Mg)</p>	<p>Laboratory cultures; SEM- EDXS; STXM- XANES; STEM- HAADF-EDX; Tomography; STEM; CEMOVIS; ICP-AES</p>	<p>Genes encoding proteins involved in the calcium transport: 1 apnhaP Ca²⁺/H⁺ antiporter at alkaline pH, 1 Ca²⁺/H⁺ antiporter; 2 putative Ca²⁺/cation antiporter, 1 Ca²⁺/Na⁺ antiporter, 1 small-conductance mechanosensitive, 4 mechanosensitive ion channel. Vesicle-based process is involved in the formation of Ca-carbonates. Carboxysomes act as nucleation points for at least some iACC that look similar to the faceted shape of carboxysomes. This suggests that at least these carbonate inclusions may result from nucleation of Ca-carbonates at the surface of carboxysomes. The reason why some cells contain aligned inclusions (as it is observed for carboxysome in some species) and how this may be linked with the cytoskeleton remains uncertain and will require further studies (using genome and transcriptome analyses, or genetics....). Function of iACC: may serve as ballasts for the cells as an adaptation to a benthic form of life</p>	<p>Couradeau et al. (2012); Benzerara et al. (2014); Ragon et al. (2014); Li et al. (2016); Cam et al. (2016); Cam et al. (2017); Blondeau et al. (2018a); Blondeau et al. (2018b); De Wever et al. (2019)</p>
<p><i>Synechococcus calcipolaris</i> G9 Alkaline Lake Alchichica, Mexico and numerous other localities</p>	ACC	<p>5-40 iACC clustered at the cell poles (90-300 nm) iACC with little amount of Mg (In BG11 cultures) iACC appeared as distorted disks at cell poles</p>	<p>Laboratory cultures; STEM- HAADF-EDX</p>	<p>ACC formation is related with cell division. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.</p>	<p>Benzerara et al. (2014); Li et al. (2016); Ragon et al. (2014)</p>
<p><i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312 Freshwater California USA</p>	ACC	<p>5-40 iACC clustered at the cell poles (90-300 nm) and septum (50-150 nm) Presence of a thin layer around ACC inclusions Incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC Higher demand of Ca for growth</p>	<p>Laboratory cultures; STEM- HAADF-EDX; CEMOVIS; ICP-AES</p>	<p>Genes encoding proteins involved in the calcium transport: 3 apnhaP Ca²⁺/H⁺ antiporters at alkaline pH, 1 Ca²⁺/H⁺ antiporter, 3 putative Ca²⁺/cation antiporters, 1 small-conductance mechanosensitive, 3 mechanosensitive ion channels, 1 hBI-1 (pH sensitive channel). ACC formation is related with cell division. Division proteins act as nucleation sites for iACC formation. For example FtsZ, which require relatively high Ca²⁺ for polymerization in this strain.</p>	<p>Li et al. (2016); De Wever et al. (2019)</p>

<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6603 Water pond, California USA	ACC	iACC clustered at the cell poles Incorporating significantly more calcium than strains not forming iACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX; ICP-AES	iACC formation is related with cell division. iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C_i available to the cells upon C-limited periods. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.	De Wever et al. (2019)
<i>Synechococcus lividus</i> PCC 6715 Hot spring, Yellowstone National Park, USA	ACC	iACC clustered at the cell poles Incorporating significantly more calcium than strains not forming iACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX; ICP-AES	Genes encoding proteins involved in the calcium transport: 1 apnhaP Ca^{2+}/H^+ antiporter at alkaline pH, 1 Ca^{2+}/H^+ antiporter; 2 putative $Ca^{2+}/cation$ antiporters, 1 Ca^{2+}/Na^+ antiporter, 2 mechanosensitive ion channels, 1 hBI-1pH-sensitive channel, 1 Pit ($CaHPO_4/H^+$ symport). iACC formation is related with cell division. iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C_i available to the cells upon C-limited periods. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.	De Wever et al. (2019)
<i>Synechococcus lividus</i> PCC 6716 Water, Hunter's Hot Spring (53 °C, pH c. 8.5)	ACC	5-40 iACC clustered at the cell poles (90-300 nm) Incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX; ICP-AES	Genes encoding proteins involved in the calcium transport: 1 apnhaP Ca^{2+}/H^+ antiporter at alkaline pH, 1 Ca^{2+}/H^+ antiporter, 1 putative $Ca^{2+}/cation$ antiporter, 3 mechanosensitive ion channels, 1 hBI-1pH-sensitive channel, 1 Pit ($CaHPO_4/H^+$ symport). iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C_i available to the cells upon C-limited periods. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.	Benzerara et al. (2014); Li et al. (2016); De Wever et al. (2019)
<i>Synechococcus lividus</i> PCC 6717 Hot spring Waterh, hot Fairy Springs (Lower Geyser B., 52 °C)	ACC	5-40 iACC clustered at the cell poles (90-300 nm) Incorporating significantly more calcium than strains not forming ACC	Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX; ICP-AES	Genes encoding proteins involved in the calcium transport: 1 apnhaP Ca^{2+}/H^+ antiporter at alkaline pH, 1 Ca^{2+}/H^+ antiporter, 1 putative $Ca^{2+}/cation$ antiporters, 1 Ca^{2+}/Na^+ antiporter, 2 mechanosensitive ion channels, 1 hBI -1 (pH sensitive channel), 1 Pit ($CaHPO_4/H^+$ symport). iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C_i available to the cells upon C-limited periods. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.	Benzerara et al. (2014); De Wever et al. (2019)

<p><i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP1 Hot spring, Beppu hot springs, Japan.</p>	<p>ACC</p>	<p>5-40 iACC clustered at the cell poles (90-300 nm) Incorporating significantly more calcium than strains not forming iACC</p>	<p>Laboratory cultures; STEM-HAADF-EDX; ICP-AES</p>	<p>iACC formation is related with cell division. iACC may buffer intracellular pH or serve as a storage form of C_i available to the cells upon C-limited periods. Genetics studies providing mutants impeded in their capability to form iACC are necessary.</p>	<p>Benzerara et al. (2014); Cam et al. (2017); De Wever et al. (2019)</p>
---	------------	---	---	---	---

II. Le gène *ccyA*, un gène orphelin, marqueur de la biominéralisation intracellulaire chez les cyanobactéries ?

Comme détaillé dans l'article de synthèse, plusieurs bactéries, dont les cyanobactéries, ont la capacité de biominéraliser intracellulairement des carbonates de calcium.

A ce jour 16 souches formant les inclusions d'iACC (intracellular amorphous calcium carbonate) ont été publiées (Benzerara et al. 2014; De Wever et al. 2019). Deux phénotypes peuvent être observés parmi les souches formant les iACC, celles qui les répartissent aux pôles et au septum (Figure 5) et celles qui les répartissent partout dans le cytoplasme (Figure 5). Les souches formant les iACC aux pôles et au septum constituent un groupe bien distinct (Figure 7), avec la souche *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (Benzerara et al. 2014). Ce clade montre que la localisation aux pôles et au septum est une caractéristique héritable et est liée à la phylogénie. Cette localisation des iACC aux pôles et au septum soulève la question de l'implication de protéines de divisions dans la nucléation des iACC (Li et al. 2016).

Trois autres souches formant les iACC réparties dans le cytoplasme sont phylogénétiquement éloignées les unes des autres (Figure 7). La présence d'iACC dans une espèce ancienne, *Gloeomargarita lithophora*, suggère que cette capacité est ancienne, et pose ainsi la question de savoir si la capacité de biominéralisation du CaCO_3 à l'intérieur de la cellule est antérieure à la capacité de biominéralisation du CaCO_3 à l'extérieur de la cellule. En effet, il est important de comprendre quel type de traces fossiles ces micro-organismes peuvent laisser (Cam et al. 2018; Riding 2006). Cette souche est aussi la parente actuelle la plus proche des plastes chez les Eucaryotes (Ponce-Toledo et al. 2017). Cette distribution dans l'arbre phylogénétique des souches formant les iACC suggère que (1) cette capacité est très ancienne chez les cyanobactéries et qu'elle a été perdue ou (2) qu'elle a évolué indépendamment dans plusieurs lignées (Benzerara et al. 2014).

Les cyanobactéries formant les iACC ne sont pas majoritaires (Figure 7) mais cette capacité n'est pas rare et est présente dans des souches phylogénétiquement éloignées et provenant de milieux écologiques diversifiés (sources chaudes, lac alcalin, sol) (Benzerara et al. 2014; De Wever et al. 2019) qui sont thermodynamiquement non favorables pour la formation d'iACC (Cam et al. 2018). Chez les cyanobactéries comme chez d'autres organismes, l'homéostasie du calcium est finement régulée. La concentration du calcium dans le cytoplasme de la cyanobactérie ne formant pas d'iACC (e.g., *Anabaena* sp. PCC 7120) varie entre 100 et 200 nM (Torrecilla et al. 2000). Aucune donnée n'existe concernant la concentration dans le cytoplasme des souches formant les iACC, mais on peut supposer que la concentration y est aussi faible et finement régulée que dans les souches ne formant pas les iACC. En effet, trop de calcium libre dans le cytoplasme pourrait précipiter notamment avec le phosphate des acides nucléiques (Verkhatsky et Parpura 2014). Cependant les souches formant les iACC incorporent des concentrations en Ca bien plus élevées que les souches ne formant pas d'iACC (Cam et al. 2018; De Wever et al. 2019), suggérant que l'homéostasie du calcium dans les souches formant les iACC est différente de l'homéostasie du calcium dans les souches ne formant pas les iACC. Cela implique donc une importation active du Ca dans le cytosol vers les inclusions afin de réguler l'homéostasie du calcium (Cam et al. 2018). Enfin, la concentration en calcium dans le milieu peut impacter fortement la croissance de certaines

souches comme *Gloeomargarita lithophora* et *Cyanothece* sp. PCC 7425 (De Wever et al. 2019). Ces données montrent donc que les souches dépensent beaucoup d'énergie pour former les iACC (Cam et al. 2018) et que ce phénomène est physiologiquement important.

De plus, il a été observé que ces inclusions d'iACC sont entourées d'une membrane de protéine ou d'une monocouche lipidique (Figure 6) (Blondeau et al. 2018). Toutes les souches formant les iACC incorporent de fortes concentrations en Ca (De Wever et al. 2019) mais seule *Gloeomargarita lithophora* est capable d'incorporer préférentiellement le baryum, le strontium et le radium (Cam et al. 2016; Mehta 2019).

Enfin, plusieurs hypothèses ont été émises concernant la fonction de ces inclusions de CaCO_3 intracellulaires ; (1) les inclusions pourraient servir de « poids » augmentant la densité cellulaire et favoriseraient un mode de vie benthique (Couradeau et al. 2012), ou (2) elles pourraient ne pas avoir de fonction biologique et pourraient juste être un produit secondaire de la photosynthèse dans des souches qui ne réguleraient pas bien le pH intracellulaire et/ou la concentration en calcium (Cam et al. 2018).

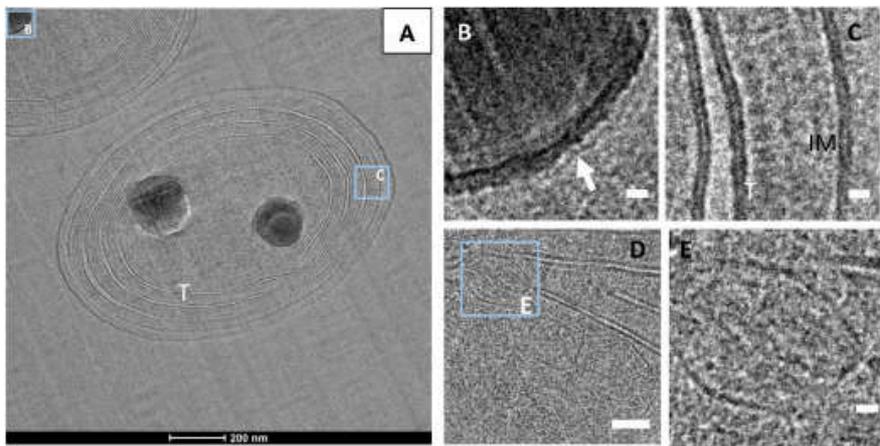


Figure 6 : **Image de cryo-electron microscopy of vitreous section.** (A) cellules de *Gloeomargarita lithophora*, (B) image de l'inclusion d'ACC, montrant une membrane entourant l'inclusion, (C) image montrant la bicouche lipidique des thylakoïdes et la membrane cytoplasmique. (D) carboxysomes proches des thylakoïdes. (E) image montrant la membrane protéique entourant les carboxysomes (Blondeau et al. 2018).

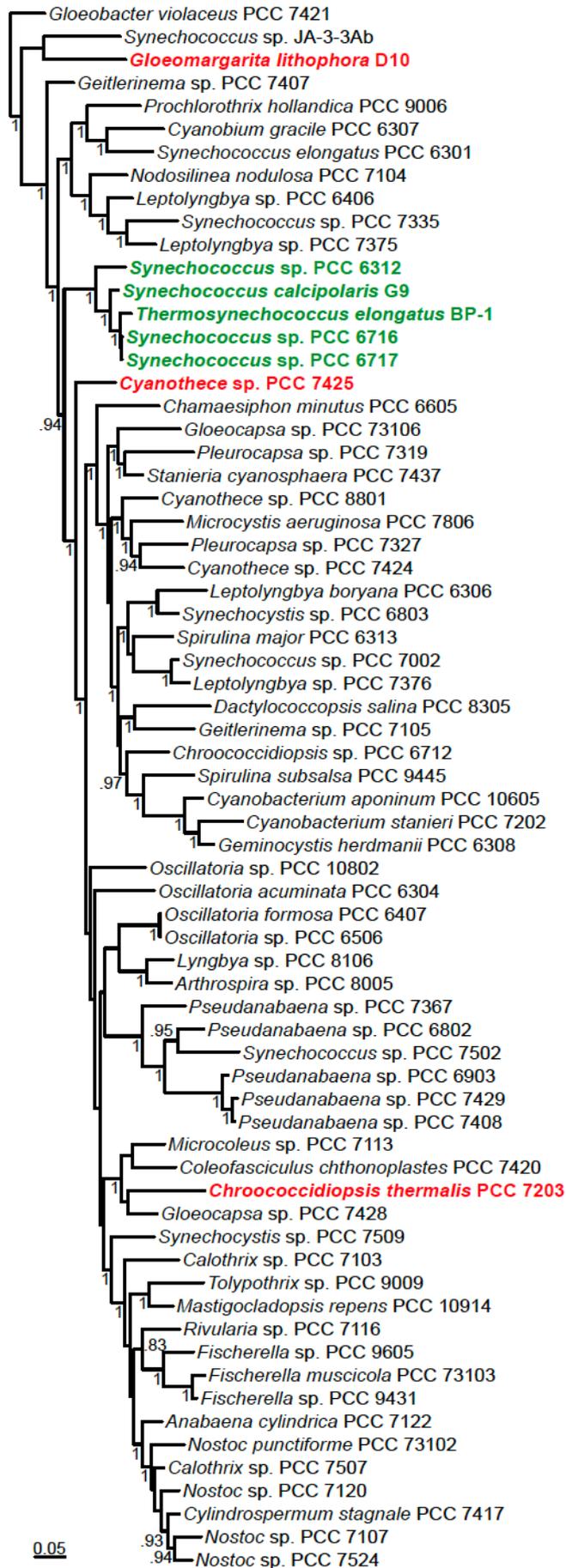


Figure 7 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène ARN16S. Les souches formant les iACC sont colorées (en rouge pour celles formant les iACC réparties dans le cytoplasme et en vert pour celles les formant aux pôles et au septum) (Benzerara et al. 2014).

Les études précédentes portant sur les mécanismes de formation du CaCO₃ intracellulaire chez les cyanobactéries ont principalement utilisé de la culture cellulaire et de la microscopie mais jusque-là jamais une approche de génétique (Tableaux 1 et 2). Auparavant, il était indispensable d'identifier un ou des gènes candidats susceptibles d'intervenir dans ce mécanisme afin d'en étudier ensuite leur fonction.

A. Découverte d'un gène candidat : *ccyA*

Deux phénotypes sont partagés par certaines cyanobactéries : (1) la formation des inclusions de CaCO₃ intracellulaires (Benzerara et al. 2014) et (2) une forte incorporation de Ca (Cam et al. 2018; De Wever et al. 2019).

Pour savoir si un mécanisme moléculaire commun et donc des gènes communs étaient partagés par ces souches de cyanobactéries formant les iACC, une étude comparant leurs protéomes a été réalisée (Issa Diop 2016; Isabelle Callebaut et al. 2020). Les protéomes de 6 cyanobactéries identifiées par Benzerara et al. (2014) (*Synechococcus calcipolaris* PCC 11701, *Synechococcus* sp. PCC 6312, *Thermosynechococcus elongatus* BP1, *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Chroococciopsis thermalis* PCC 7203 et *Gloeomargarita lithophora*) ont été comparés à ceux de 105 cyanobactéries connues pour ne pas faire d'inclusions de CaCO₃ intracellulaires (Issa Diop 2016). De cette étude, 3 types de clusters de séquences protéiques ont été identifiés : (1) des clusters dits "conservés" c'est-à-dire qu'au moins une séquence protéique est retrouvée dans toutes les espèces étudiées formant ou ne formant pas d'iACC, appelés aussi « *core genome* » ; (2) des clusters dits « spécifiques » contenant des séquences protéiques qui ne sont retrouvées que dans une seule espèce de cyanobactérie et enfin (3) des clusters dits "intermédiaires" contenant donc des séquences protéiques trouvées dans certaines espèces mais non dans toutes. La recherche de séquences protéiques, marqueurs de la biominéralisation de CaCO₃, s'est donc portée sur les clusters "intermédiaires". Plusieurs clusters partagés uniquement par les six cyanobactéries formant les inclusions ont été détectés mais un seul cluster représentant donc une séquence protéique est partagé par les 6 souches de cyanobactéries formant les CaCO₃ (Figure 8), et uniquement chez elles.

Cette découverte montre au moins un gène commun partagé par les cyanobactéries formant les inclusions aux pôles ou réparties dans le cytoplasme. Le gène détecté a été appelé *ccyA* et la protéine codée Calcyanine (Issa Diop 2016; Callebaut et al. 2020).

Espèces	Clusters				
	14	18	7	1	1
Carbonates de calcium aux poles cellulaires					
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312					
<i>Synechococcus calcipolaris</i> PCC 11701					
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP1					
Carbonates de calcium répartis dans le cytoplasme					
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425					
<i>Chroococciopsis thermalis</i> PCC 7203					
<i>Gloeomargarita lithophora</i>					

Figure 8. Clusters “intermédiaires” obtenus après comparaison des protéomes de 6 cyanobactéries formant des carbonates de calcium intracellulaires (inspiré du Rapport de Master 2 de Issa Diop, 2016). Cette figure montre uniquement les clusters partagés par au minimum 3 espèces de cyanobactéries formant les CaCO₃. Les espèces écrites en vert forment les carbonates aux pôles des cellules, tandis que celles écrites en rouge forment des carbonates répartis dans le cytoplasme. Quatorze clusters, (séquences protéiques), sont répartis entre les 3 cyanobactéries formant les carbonates aux pôles des cellules, ; 18 clusters entre 3 cyanobactéries “vertes” et *Cyanothece* sp. PCC 7425 ; 7 clusters sont répartis entre *Synechococcus* sp. PCC 6312, *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 et *Cyanothece* sp. PCC 7425 ; 1 cluster est réparti entre *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701, *Thermosynechococcus elongatus* BP1 et *Cyanothece* sp. PCC 7425 ; enfin 1 seul cluster est partagé par les 6 cyanobactéries.

B. Prédictions bio-informatiques de la protéine Calcyanine

Aucun homologue de cette séquence protéique de fonction connue n’a été détecté dans les bases de données, indiquant donc que *ccyA* est un gène orphelin de fonction inconnue (Issa Diop 2016).

Des prédictions structurales, des délimitations de domaines mais aussi la détection de duplications de domaines, à partir de la séquence protéique, ont été réalisées au moyen de la méthode HCA (hydrophobic cluster analysis) (Callebaut et al. 1997). Cette méthode a permis de montrer que la Calcyanine codée par *ccyA* est composée de deux domaines comme le montrent les séquences de la Calcyanine de *Gloeomargarita lithophora* et de *Chroococciopsis thermalis* PCC 7203 illustrées dans la Figure 9.

Les deux domaines N-ter possèdent des régions hydrophobes courtes, typiques de structures secondaires rencontrées dans les domaines globulaires (hélices alpha et brins beta). Les deux domaines N-ter diffèrent par leur structure : chez *G. lithophora*, ce domaine forme principalement des structures alpha alors que pour le domaine N-ter de la Calcyanine de *C. thermalis* PCC 7203 des amas alpha et bêta sont prédits. Ainsi les séquences ne peuvent s’aligner (Issa Diop 2016). L’assemblage des amas en hélices alpha et brins bêta sont typiques des domaines globulaires (Rebehmed et al. 2016).

La protéine appelée Calcyanine

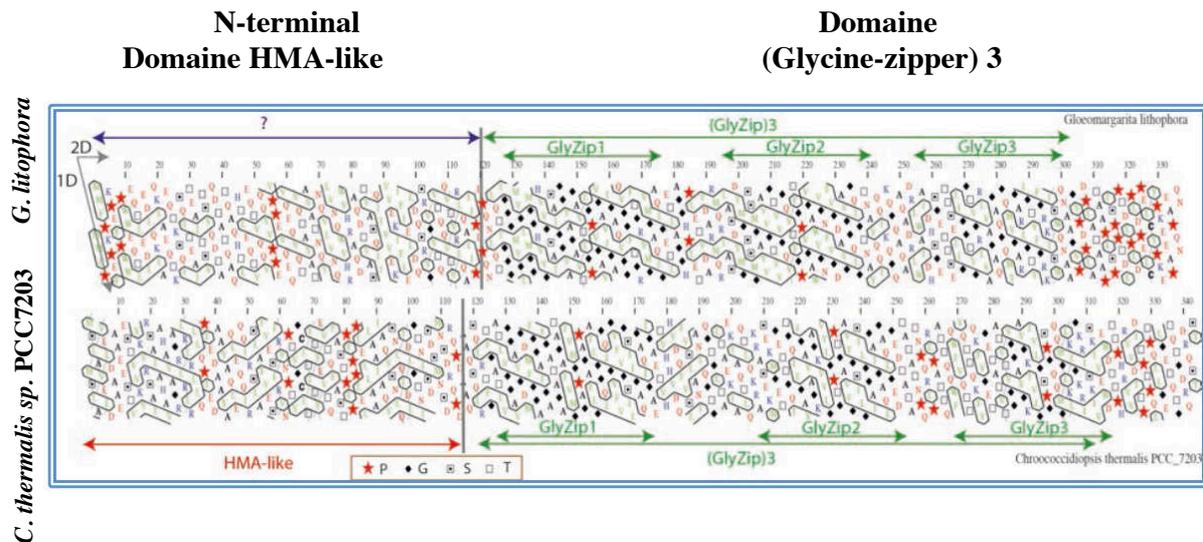


Figure 9. Représentation en 2D des séquences de la Calcyanine de *Gloeomargarita lithophora* et de *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 par la méthode HCA. La séquence est inscrite sur un support alpha-hélicoïdal dupliqué, sur lequel les acides aminés hydrophobes forts (en vert, V I L F M Y W) sont entourés. Les acides aminés basiques et acides sont respectivement représentés en bleu et rouge, tandis que 4 symboles sont utilisés pour représenter quatre acides aminés possédant des propriétés structurales particulières. Les acides aminés entourés représentent des clusters. Les clusters horizontaux dans le domaine C-ter montrent une répétition de glycine et d'acides aminés hydrophobes tandis que la région N-ter est constituée d'amas hydrophobes plus courts. Le domaine C-ter est constitué du domaine (GlyZip)3 dans les deux séquences. Par contre les deux domaines N-ter sont différents : c'est un domaine HMA-like dans la séquence de la Calcyanine de *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 tandis que c'est un domaine encore inconnu appelé X dans celle de *Gloeomargarita lithophora* (Issa Diop 2016).

La délimitation des domaines N-ter et C-ter a ensuite permis de comparer les domaines séparément dans les bases de données. La comparaison du domaine N-ter de la séquence protéique de *G. lithophora* n'a détecté aucun homologue connu dans les banques de données. A l'inverse, la comparaison des domaines N-ter des séquences protéiques des 5 autres souches (*S. calcipolaris* PCC 11701, *Synechococcus* sp. PCC 6312, *Thermosynechococcus elongatus* BP1, *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203) a permis de détecter un domaine homologue appelé: HMA (heavy metal associated-domain) également nommé MBD (metal binding domain) (Issa Diop 2016) présent dans la partie N-ter ou C-ter d'ATPases (Tong et al. 2002; Smith et al. 2015).

Le domaine N-ter des 5 souches présente deux hélices alpha et quatre brins bêta typiques des domaines HMA. Cependant, le domaine N-ter de la Calcyanine a été appelé HMA-like ; il y a des homologies de séquences avec les domaines HMA et des ressemblances structurales mais le domaine HMA-like semble former une autre famille de domaine (Callebaut et al. 2020). Les domaines HMA possèdent un motif consensus CxxC responsable des liaisons avec des ions divalents (Smith et al. 2015). Cependant, il existe une diversité de domaine HMA où les cystéines (C) peuvent être suivies par des motifs riches en histidine permettant la liaison des ions monovalents (Cu^+ et Ag^+) et des ions divalents (Zn^{2+} et Cd^{2+}) (Tong et al. 2002) ou permettant de lier les ions (Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}) via un motif différent de CxxC (Smith et al. 2015).

Ces domaines ont pour fonction principale le transport des ions à travers la membrane pour maintenir l'homéostasie intracellulaire des métaux (Smith et al. 2014). Ils sont solubles mais liés à un domaine transmembranaire ATPase (Tong et al. 2002). Dans le domaine N-ter de la Calcyanine, les cystéines du motif CxxC sont remplacées par les acides aminés acide aspartique et tyrosine. Cette sous-famille de domaine HMA pourrait être impliquée dans le transport d'ions encore non identifiés (Issa Diop 2016). De plus, toujours d'après ces prédictions, un élément de structure secondaire est présent dans le domaine HMA-like mais absent dans les domaines HMA canoniques. Cet élément se trouve à proximité d'une histidine hautement conservée. Ces différences suggèrent que ce domaine a évolué vers une fonction spécifique (Issa Diop 2016). De récentes recherches ont montré qu'il existe une diversité de domaines N-ter parmi les souches de cyanobactéries formant les iACC (Callebaut et al. 2020 *in prep*).

Le second domaine en C-ter de la Calcyanine est composé de trois motifs riches en glycine GxxxG et de régions hydrophobes (Figure 9) et est appelé (glycine-zipper)₃. Ce domaine C-ter est bien conservé parmi les souches de cyanobactéries possédant la Calcyanine. Les motifs GxxxG sont bien caractérisés dans la littérature, mais le motif (glycine-zipper)₃ n'a encore été ni identifié, ni caractérisé structurellement ou fonctionnellement.

Les domaines glycine-zipper sont très conservés dans les protéines transmembranaires. Ils influencent fortement la formation des structures en hélices et les interactions entre ces hélices et donc favorisent l'oligomérisation de ces protéines (Kim et al. 2004; Senes et al. 2000; Senes et al. 2004; Russ et Engelman 2000). Ainsi, les motifs GxxxG jouent un rôle essentiel dans la formation de canaux dans les protéines transmembranaires (Kim et al. 2004; McClain et al. 2003; De Marothy et Elofsson 2015). Cependant, un motif glycine-zipper GxxxG suivi de motifs tyrosine-zipper (YxxxY) et sérine-zipper (SxxxS) a été retrouvé dans des assemblages d'oligomères solubles (Martin et al. 2012), montrant qu'il existe une diversité de ces domaines glycine-zipper associés à une diversité de fonctions.

Cette protéine Calcyanine est un marqueur de la biominéralisation de CaCO₃ intracellulaire chez les cyanobactéries (Callebaut et al. 2020), toutefois son rôle reste inconnu. Ces cyanobactéries contrôlent la nucléation du minéral, sa localisation, sa croissance, sa composition, sa morphologie mais aussi l'import et le transport des ions (Ca²⁺, CO₃²⁻, Mg²⁺, Sr²⁺ et Ba²⁺). La protéine Calcyanine pourrait donc intervenir dans l'une de ces étapes directement ou indirectement, en agissant comme régulateur (Figure 10) ; (1) elle pourrait agir comme transporteur au niveau de la membrane et incorporer le bicarbonate (HCO₃⁻) ou (2) le calcium ou (3) incorporer un des deux éléments au niveau des carbonates, (4) elle pourrait s'assembler et former une « membrane » protéique permettant de délimiter un compartiment, ou encore (5) elle pourrait agir comme un tampon (Shemarova et Nesterov 2014), en immobilisant le calcium dans le cytoplasme et/ou l'amener dans les inclusions d'iACC et enfin, (6) elle pourrait avoir un rôle de signalisation du Ca, ou (7) encore elle pourrait agir comme site de nucléation.

Au final, nous avons donc une prédiction théorique du gène *ccyA* qui est compatible avec une fonction potentiellement liée à l'homéostasie du calcium et à la biominéralisation du carbonate de calcium intracellulaire, comme le suggère aussi la corrélation observée entre présence de ce gène et phénotype de biominéralisation intracellulaire. Il reste cependant à confirmer cette prédiction par une approche expérimentale et à préciser un certain nombre de points sur la localisation et la fonction de cette protéine.

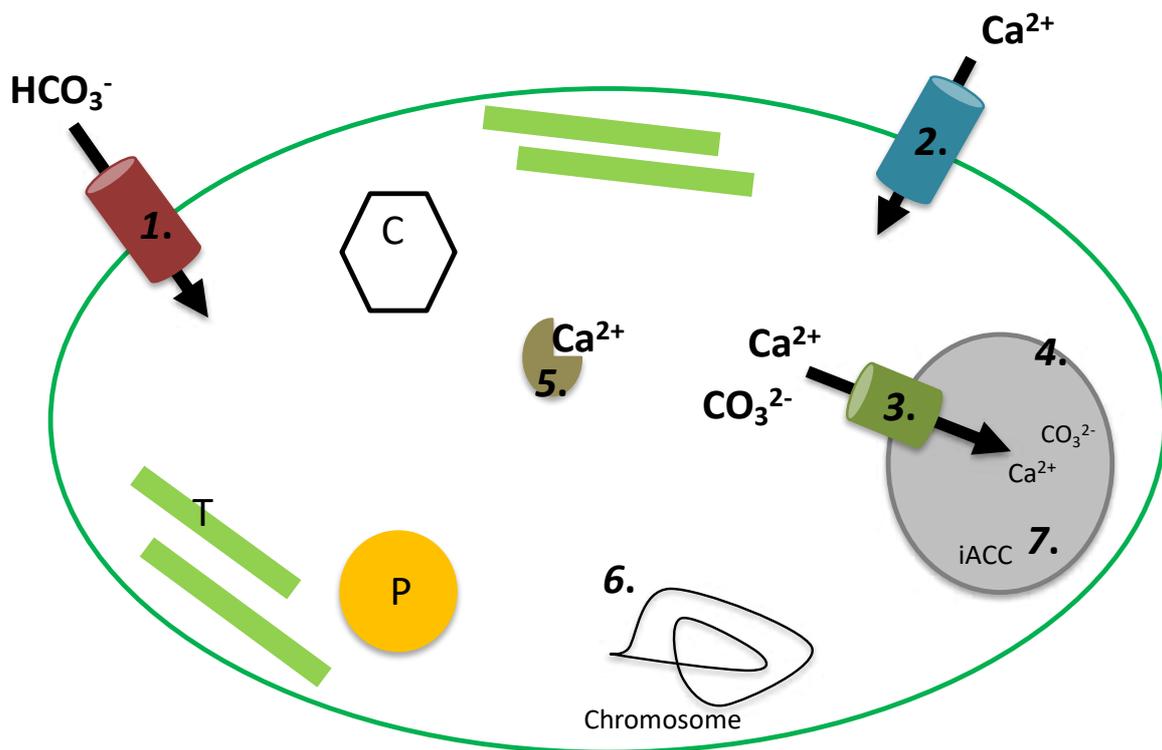


Figure 10 : Représentation schématique des diverses fonctions possibles de la protéine Calcyanine chez les cyanobactéries formant les iACC. C : carboxysome ; T : thylakoïdes, P : polyphosphate. Les numéros correspondent aux fonctions/localisations possibles de la protéine Calcyanine.

C. Approche biochimique : expression hétérologue de *ccyA* chez *E. coli*

Une approche biochimique est actuellement mise en place, dans l'équipe BIOMIN de l'IMPMC, afin d'étudier la structure de différentes protéines Calcyanine et les domaines associés. Les protéines entières ou les domaines N-ter et C-ter seuls sont produits chez *E. coli*, et sont purifiés pour analyser leurs structures ainsi que leurs propriétés biochimiques. Les premiers résultats montrent que la protéine Calcyanine de *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 produite est soluble chez *E. coli* donc présente dans le cytoplasme, tandis que celle de *Gloeomargarita lithophora* dont la séquence diffère dans le domaine N-ter est associée aux membranes chez *E. coli* (Görger 2017). La protéine de *G. lithophora* forme des oligomères (Targowla 2019). Concernant les domaines produits séparément chez *E. coli*, le domaine (Glycine-zipper)₃ de *G. lithophora* forme des oligomères solubles, tandis que le domaine X (N-ter) de *G. lithophora* est associé aux membranes. En revanche, le domaine HMA-like de *S. calcipolaris* PCC 11701 est lui partiellement soluble (Targowla 2019).

Les différences observées entre la localisation des protéines entières de *G. lithophora* et de *S. calcipolaris* PCC 11701 et celle des domaines N-ter HMA-like et X, ainsi que les différences avec les prédictions bio-informatiques peuvent être le résultat de mauvais repliement (notamment pour les domaines produits seuls) ou de mauvais adressage dans les cellules car tous sont produits chez *E. coli* qui n'est pas l'hôte naturel de ces protéines. Ainsi,

il pourrait manquer des protéines partenaires de la Calcyanine ou des protéines chaperones d'assemblage. Pour l'instant, seul le domaine (Glycine-zipper)³ de *G. lithophora*, trouvé soluble, a été étudié. Il serait intéressant de savoir si ce domaine (Glycine-zipper)³ de la Calcyanine de *S. calcipolaris* PCC 11701 possède les mêmes propriétés biochimiques lorsqu'il est exprimé chez *E. coli*.

Enfin, la conformation de la Calcyanine de *Gloeomargarita lithophora* et de son domaine N-ter en présence de calcium a été analysée par spectroscopie de fluorescence. Les résultats suggèrent que la Calcyanine et le domaine X de *G. lithophora* possèdent une affinité pour le calcium (Targowla 2019).

Cette étude biochimique a permis d'acquérir des connaissances sur les caractéristiques de la Calcyanine (oligomérisation, localisation, liaison avec le calcium) mais ne permet pas de déterminer sa localisation et sa fonction dans les souches de cyanobactéries formant les iACC.

Une approche *in vivo* permettrait de connaître la fonction de cette protéine. Cette approche nécessiterait de réaliser des modifications génétiques sur certaines souches de cyanobactéries. Cependant, les modifications génétiques sur les cyanobactéries restent de nos jours un challenge.

III. Approches génétiques sur les cyanobactéries

A. Les mécanismes de transfert latéral de gènes

Le transfert latéral de gènes (LTG) permet aux bactéries d'acquérir dans leur génome de nouvelles séquences d'ADN influençant leur diversité (Flores 2008). Ce transfert se fait par trois mécanismes naturels différents applicables en laboratoire : la transformation naturelle, la conjugaison ou encore la transduction (Flores 2008; Soucy et al. 2015). La première transformation naturelle chez les cyanobactéries a été réalisée sur la souche *S. elongatus* PCC 7942 (anciennement appelée *Anacystis nidulans* R2) en 1970 (Shestakov et Khyen 1970), et la première conjugaison d'une souche *E. coli* vers *Anabaena/Nostoc* sp. a été réalisée en 1984 (Wolk et al. 1984). Depuis ces deux techniques ont été adaptées pour d'autres souches de cyanobactéries (Tableau 3).

La transformation naturelle, l'électroporation et la conjugaison permettent de faire rentrer des plasmides intégratifs (Chauvat et al. 1986) ou réplcatifs (Stucken et al. 2012).

1. La transformation naturelle

En laboratoire, la transformation naturelle consiste à mettre en contact la souche de cyanobactérie à transformer et le plasmide d'intérêt circulaire ou linéarisé ou bien le fragment d'ADN à intégrer dans le génome (Figure 11) (Stucken et al. 2012; Labarre et al. 1989). Les cellules doivent être dans un état physiologique particulier dit de compétence. Si par simple

contact l'ADN rentre dans la cellule, sans qu'elle n'ait dû subir de traitement chimique alors on dit que la souche est naturellement compétente.

La première étape consiste à préparer des cellules "compétentes" en les cultivant et en les repiquant plusieurs fois en présence de lumière avec agitation dans du milieu minéral.

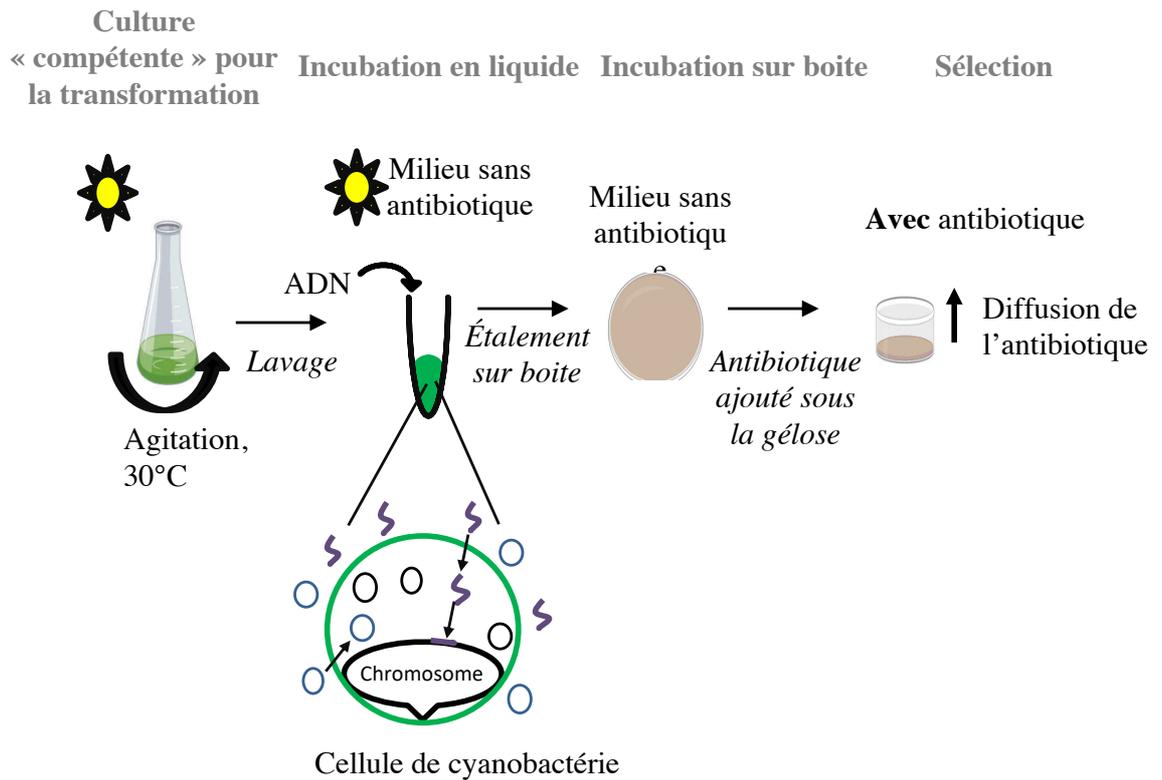
La seconde étape est la mise en contact des cellules avec l'ADN.

La troisième étape consiste à étaler les cellules sur du milieu solide (milieu minéral avec agar) sans antibiotique.

La dernière étape est celle de la sélection avec un antibiotique adéquat.

A l'inverse, si la souche n'est pas naturellement compétente (donc l'ADN ne rentre pas naturellement dans la cellule), alors la transformation peut être induite par un choc électrique appelé électroporation (Stucken et al. 2012). Après l'étape de culture, les cellules et l'ADN sont lavés dans un tampon adéquat (dépendant de l'électroporateur). Dans la seconde étape, les cellules et l'ADN sont mélangés et un choc électrique est appliqué sur les cellules. Ce choc casse en partie les membranes des cellules, permettant à l'ADN circulaire et à l'ADN linéaire de rentrer dans la cellule. Puis une étape de régénération cellulaire dans du milieu de culture sans antibiotique est nécessaire. Enfin, la sélection peut se faire en étalant les cellules sur boîte de Pétri contenant l'antibiotique, ou par un étalement sur boîte de Pétri sans antibiotique, lequel est ensuite ajouté.

a. Transformation Naturelle



b. Transformation par Electroporation

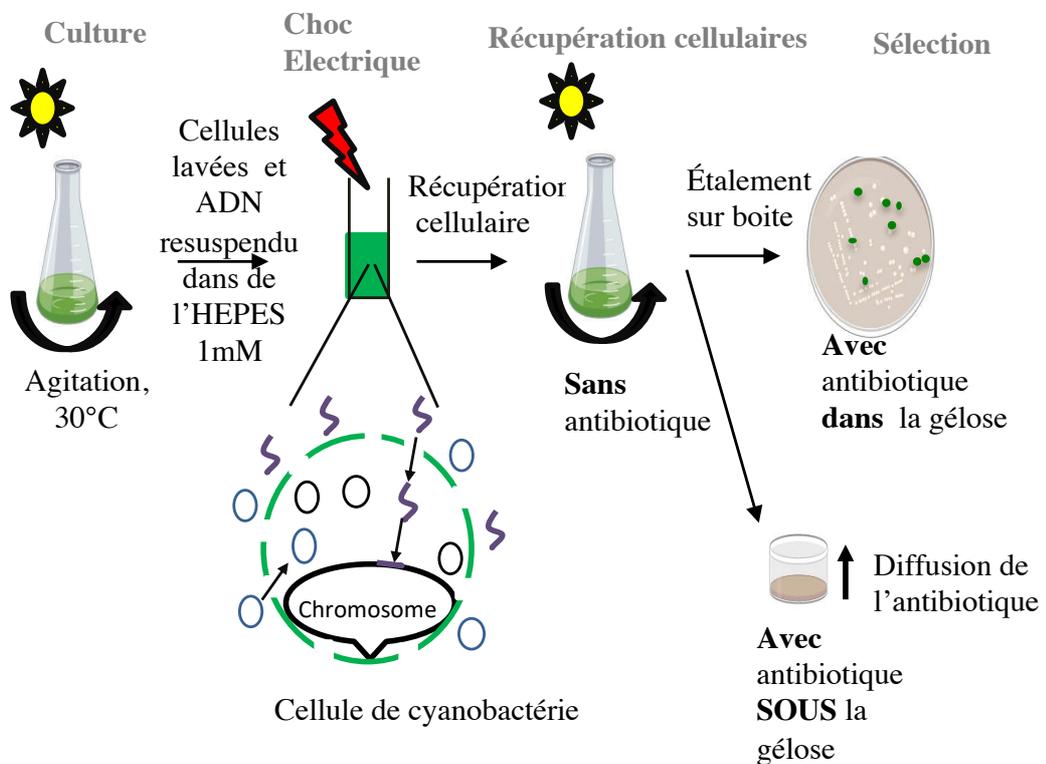


Figure 11 : Schéma représentant l'incorporation d'ADN par transformation naturelle et par électroporation dans une cyanobactérie. **a.** Transformation naturelle d'une souche de cyanobactérie représentée en vert. En **b.** Transformation par électroporation d'une souche de cyanobactérie. Les cercles noirs représentent les plasmides naturels endogènes ; les cercles bleus représentent des plasmides circulaires exogènes et les traits en orange représentent des plasmides linéaires ou des fragments d'ADN exogènes.

Concernant la transformation naturelle, le mécanisme d'internalisation de l'ADN a été identifié. Chez les cyanobactéries, la transformation naturelle est permise grâce à la présence de pili de type IV (Wendt et Pakrasi 2019) (Figure 12). Le pilus est un appendice rétractable composé de monomère PilA (Bhaya et al. 2000) qui, avant la polymérisation, est clivé par la protéine PilD (Bhaya et al. 2000). Les protéines PilB et PilT étendent et rétractent l'appendice selon la polymérisation et la dépolymérisation de la protéine PilA (Wendt et Pakrasi 2019). Le pore au niveau de la membrane externe par lequel l'appendice s'étend est composé du monomère PilQ et l'ancrage du pilus dans la membrane interne est composé des protéines PilC, PilM, PilN et pilQ (Bhaya et al. 2000; Wendt et Pakrasi 2019). La protéine PilQ permet l'acheminement de l'ADN de la membrane externe au périplasma pour qu'ensuite l'ADN passe au travers du complexe formé par les protéines ComA, ComE et ComF. Ce complexe dégrade un des brins d'ADN et facilite l'entrée du second brin d'ADN vers le cytoplasme (Nakasugi et al. 2006; Wendt et Pakrasi 2019) (Figure 12). Il existe encore d'autres protéines impliquées dans le processus de transformation naturelle mais leurs rôles restent encore incertains (Wendt et Pakrasi 2019).

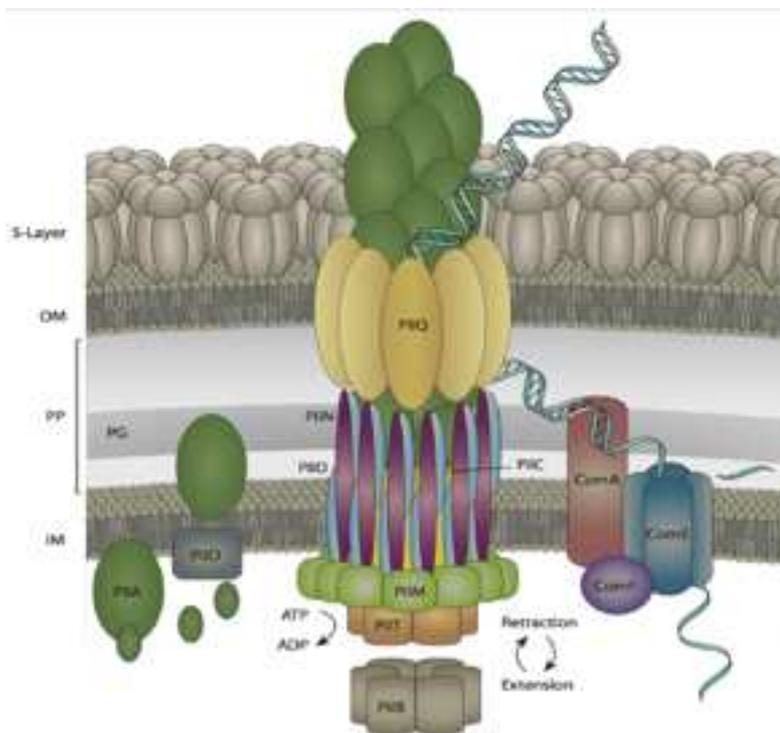


Figure 12. Représentation schématique du mécanisme d'incorporation d'ADN dans *Synechocystis* sp. PCC 6803. L'ADN entre dans le périplasma à travers la sous-unité PilQ dans la membrane externe. L'ADN double brin est converti en ADN simple brin en traversant les pores ComE de la membrane interne. OM signifie membrane externe, IM signifie membrane interne, PP pour périplasma, PG pour peptidoglycane, OM pour membrane externe (Wendt et Pakrasi 2019).

Après l'entrée dans le cytoplasme, l'ADN peut s'intégrer dans le génome de la cyanobactérie grâce à des mécanismes de recombinaison homologue (Labarre et al. 1989; Domain et al. 2004).

Cette capacité naturelle est utilisée dans les laboratoires pour déléter un gène (Poncelet et al. 1998), introduire des mutations ponctuelles (Thiel 1994), remplacer un promoteur par un autre (Ortega-Ramos et al. 2014), introduire un gène hétérologue dans un site neutre dans certaines souches de cyanobactéries comme par exemple *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Ng, Berla, et Pakrasi 2015), *S. elongatus* PCC 7942 (Cao et al. 2017) et *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Wang et al. 2019).

En laboratoire, pour réaliser la délétion de gène, l'introduction de mutations ponctuelles ou de gènes hétérologues, on utilise le mécanisme naturel qu'est la recombinaison homologue (RH). La recombinaison homologue permet l'échange entre deux séquences nucléotidiques, par exemple dans le cas d'une délétion de gène, le gène ciblé est échangé avec un gène choisi qui confère la résistance à un antibiotique (kanamycine, spectinomycine, streptomycine ect....) (Labarre et al. 1989; Vermaas 1996) (Figure 13). Cet échange est réalisé grâce à des séquences identiques en amont et en aval du gène à supprimer, appelées régions d'homologie. Ces régions sont de tailles variables et choisies, (allant de 300 nucléotides à 1500 nucléotides (Labarre et al. 1989; Zang et al. 2007) selon les auteurs et les espèces manipulées. Plus concrètement, dans le cas d'une délétion de gène, des séquences entourant le gène (régions d'homologie) sont amplifiées par PCR (polymerase chain reaction) à partir du génome de la souche (ou de manière synthétique par des entreprises spécialisées, comme Eurofins, Genecust ou Twist, auxquelles nous commandons des séquences au laboratoire) et clonées dans un vecteur de clonage. Entre ces deux régions d'homologie, un gène codant pour un antibiotique est cloné et remplace le gène à déléter créant ainsi la cassette de délétion. Le plasmide portant la cassette de délétion est ensuite introduit par transformation naturelle ou électroporation (sous forme linéaire ou circulaire) dans la souche de cyanobactérie (Vermaas 1996; Kammerscheit et al. 2019). Dans le cytoplasme, les régions d'homologie s'apparient à leurs homologues dans le génome et recombinent, permettant au gène conférant la résistance à un antibiotique de remplacer le gène ciblé. La sélection des mutants se fait donc sur le critère de résistance à l'antibiotique. Les cellules qui n'ont pas incorporé le gène conférant la résistance à un antibiotique meurent (Figure 13).

Les cyanobactéries sont polyploïdes (Labarre et al. 1989; Griese et al. 2011) (Figure 11), c'est-à-dire qu'elles possèdent plusieurs copies identiques de leur chromosome donc plusieurs copies du gène ciblé. L'évènement de recombinaison a lieu dans une copie. Pour supprimer toutes les copies du gène ciblé, il faut plusieurs générations. Un moyen d'accélérer la ségrégation de tous les chromosomes est d'augmenter la concentration en antibiotique pour sélectionner des souches possédant plus de copies mutantes. Deux cas de figures peuvent ensuite être observés : si le gène est essentiel à la viabilité cellulaire alors il restera une ou/plusieurs copies de ce gène dans le chromosome et la ségrégation sera incomplète ; à l'inverse, si le gène n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire alors la ségrégation sera complète et il ne restera aucune copie sauvage de ce gène dans le chromosome (Figure 13). Des PCR permettent de déterminer si la ségrégation est complète ou non (Kammerscheit et al. 2019).

I inactivation d'un gène par recombinaison homologue

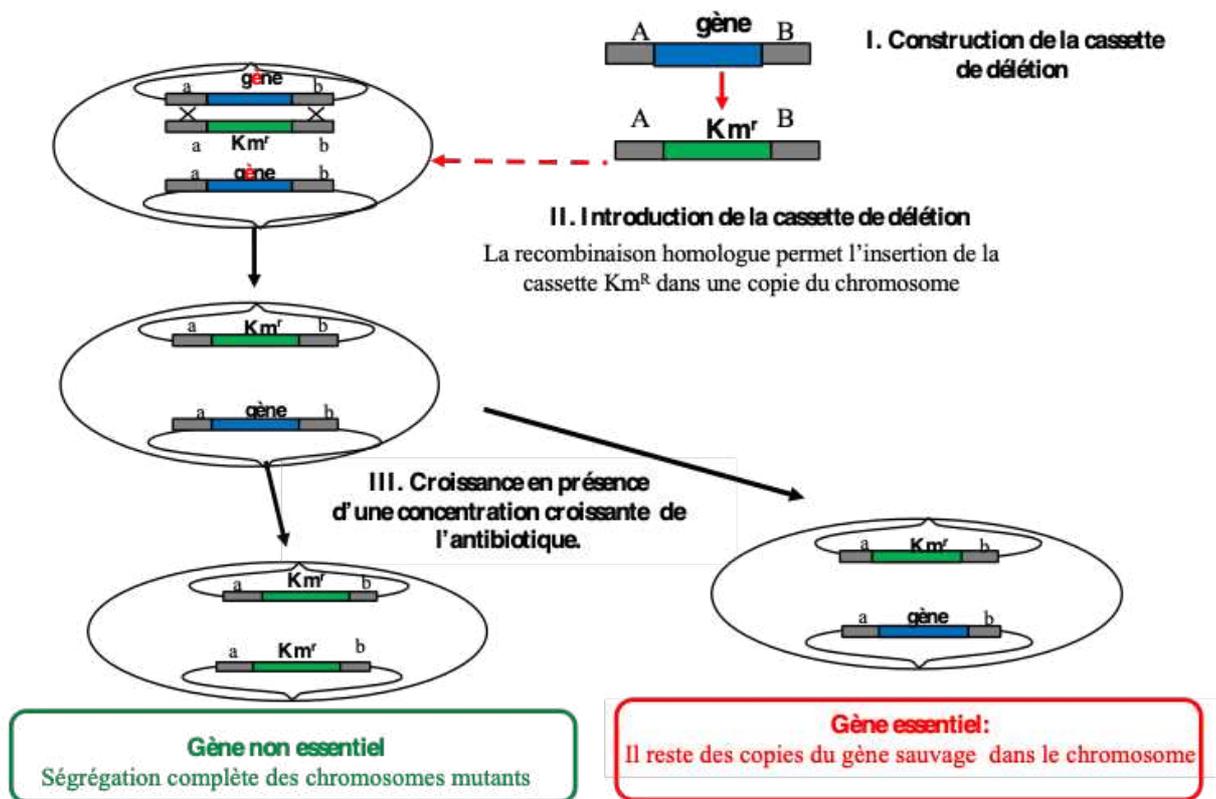


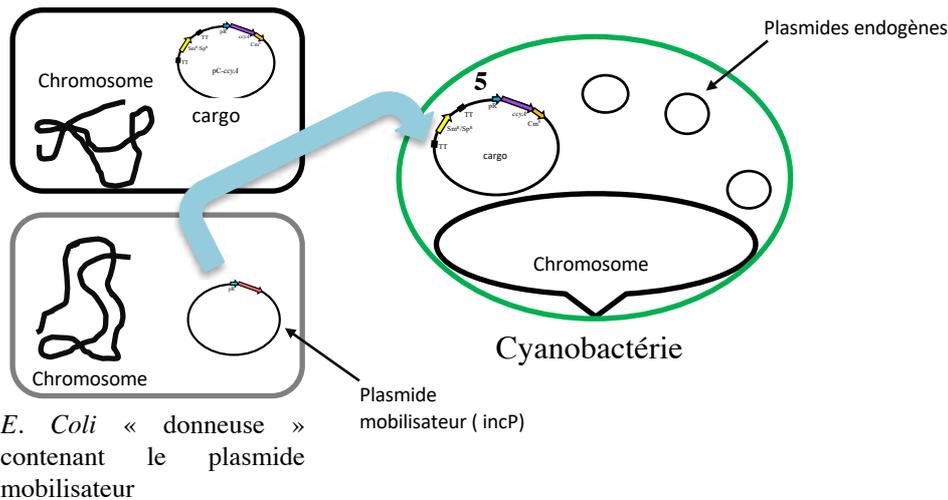
Figure 13 : Procédure d'inactivation d'un gène chez les cyanobactéries. Deux copies du chromosome sont représentées dans les cellules car les cyanobactéries sont polyploïdes. Les régions a et b représentent les régions en amont et en aval utilisées pour faire la recombinaison homologue et supprimer le gène.

2. La conjugaison

Le second mécanisme de transfert de gène latéral est la conjugaison. Le transfert d'ADN se fait par contact entre les cellules (Thiel 1994). La conjugaison permet d'introduire des plasmides réplcatifs (Mermet-Bouvier et Chauvat 1994) ou intégratifs (Thiel 1994). A l'heure actuelle, aucun plasmide conjugatif provenant de cyanobactérie n'est connu. Le plasmide d'intérêt (plasmide cargo) est introduit dans la cyanobactérie (souche receveuse) via une souche *E. coli* (souche donneuse). Ce plasmide cargo est capable de se répliquer dans les cyanobactéries mais il n'est pas issu d'un plasmide endogène. Ce plasmide cargo est un dérivé du plasmide RSF1010, capable de se répliquer dans plusieurs souches de cyanobactéries (Mermet-Bouvier et Chauvat 1994; Mermet-Bouvier et al. 1993). Cette conjugaison peut être tri-partite. Elle nécessite donc trois souches : la souche *E. coli* portant le plasmide mobilisateur, capable d'autoréplication et de transfert d'une souche à une autre, la souche *E. coli* portant le plasmide d'intérêt (cargo) et la cyanobactérie. Le contact s'établit entre la cellule *E. coli* 1 donneuse portant le plasmide mobilisateur et la cellule *E. coli* 2 receveuse (portant le plasmide

cargo). Le plasmide mobilisateur passe dans la cellule *E. coli* receveuse. Un second contact s'établit entre la cellule *E. coli* 2 et la cellule de la cyanobactérie, par lequel le plasmide cargo va s'introduire dans la cellule de la cyanobactérie (Figure 14). Dans la cyanobactérie, la réplication du plasmide cargo est autonome, par contre le plasmide mobilisateur ne s'y réplique pas.

E. coli « receveuse » contenant le plasmide cargo (incQ)



Figures 14 : **Schéma représentant le mécanisme de conjugaison tri-partite.**

La souche *E. coli* (souche donneuse) porte le plasmide mobilisateur. Par la formation d'un pilus, le plasmide mobilisateur s'introduit dans la souche *E. coli* (souche receveuse). La souche *E. coli* receveuse, (portant le plasmide cargo) devient souche donneuse pour la cyanobactérie. Un contact est formé entre la souche *E. coli* nouvellement donneuse et la cyanobactérie (souche receveuse). Le plasmide d'intérêt (cargo) pénètre ainsi dans la cyanobactérie grâce aux fonctions codées en trans par le plasmide mobilisateur.

Le troisième mécanisme naturel est la transduction, c'est-à-dire l'incorporation d'ADN suite à l'infection de la cyanobactérie par un phage. Ce mécanisme n'a pas été utilisé, à ma connaissance, pour introduire de l'ADN dans les cyanobactéries (Flores 2008), et n'a pas été utilisé lors de ma thèse sachant qu'aucun phage infectant les cyanobactéries calcifiantes que j'ai manipulées n'est connu.

B. Les cyanobactéries génétiquement manipulables

Actuellement le nombre d'espèces de Cyanobactéries identifiées est de 2 698 espèces (Nabout et al. 2013). Cependant, une grande majorité d'espèces est encore inconnue et le nombre total d'espèces est encore incertain et controversé. Certains estiment ce nombre à 8000 espèces (Guiry 2012).

Tableau 3 : Liste non exhaustive de souches de cyanobactéries génétiquement modifiées par transformation naturelle, électroporation ou conjugaison.

Souches	Unicellulaire / filamenteuse	Délétion de gène/intégration de gène dans le génome	Intégration plasmide réplicatif
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7118	Filamenteuse		Conjugaison (Wolk et al. 1984)
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7210	Filamenteuse		Conjugaison (Wolk et al. 1984)
<i>Anabaena</i> M131	Filamenteuse		Conjugaison, électroporation (Wolk et al. 1984; Thiel 1994)
<i>Anabaena</i> 90	Filamenteuse	Electroporation (Rouhiainen et al. 2000)	
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (PCC 7937)	Filamenteuse		Conjugaison (Murry et Wolk 1991)
<i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 6912	Filamenteuse		Conjugaison, biolistique Transformation (Stucken et al. 2012; Springstein et al. 2020)
<i>Chlorogloeopsis fritschii</i> PCC 9212	Filamenteuse	Conjugaison (Zhao et al. 2015)	
<i>Chroococciopsis thermalis</i> PCC 7203	Unicellulaire	Conjugaison (Zhao et al. 2015)	
<i>Chroococciopsis</i> 029	Unicellulaire		Conjugaison, électroporation (Billi et al. 2001)
<i>Chroococciopsis</i> 057	Unicellulaire		Conjugaison (Billi et al. 2001)
<i>Chroococciopsis</i> 123	Unicellulaire		Conjugaison, électroporation (Billi et al. 2001)
<i>Cyanothece</i> ATCC 51142	Unicellulaire	Conjugaison (Liberton et al. 2019)	

<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822	Unicellulaire	Electroporation (Min et Sherman 2010)	
<i>Fischerella muscicola</i> PCC 7414	Filamenteuse		Conjugaison, électroporation, biolistique (Stucken et al. 2012)
<i>Fischerella</i> UTEX 1829	Filamenteuse		Conjugaison (Flores et Wolk 1985)
<i>Fremyella</i> sp. PCC 7601	Filamenteuse		Conjugaison (Cobley et al. 1993)
<i>Leptolyngbya boryana</i>		Electroporation (Tsujiimoto et al. 2015)	
<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC 7806	Unicellulaire	Transformation (Dittmann et al. 1997)	
<i>Nostoc</i> sp. PCC 6301	Filamenteuse		Conjugaison, (Flores et Wolk 1985)
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7107	Filamenteuse		Conjugaison, (Flores et Wolk 1985)
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	Filamenteuse		Conjugaison (Wolk et al. 1984)
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7121	Filamenteuse		
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 (ATCC 29133)	Filamenteuse	Conjugaison (Lindberg et al. 2002)	Transformation, électroporation conjugaison (Moser et al. 1993)
<i>Phormidium lacuna</i>	Filamenteuse	Transformation, électroporation (Nies et al. 2019)	
<i>Plectonema</i> UTEX 596	Filamenteuse		Conjugaison (Vachhani et al. 1993)
<i>Plectonema</i> IAM-M101	Filamenteuse	Electroporation (Fujita et al. 1992)	
<i>Pseudonabaena</i> NKBG040605C	Filamenteuse		Conjugaison (Sode et al. 1992)

<i>Spirulina platensis</i>	Filamenteuse		Electroporation (Toyomizu et al. 2001)
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6301	Unicellulaire		Conjugaison (Tsinoremas et al. 1994; Marraccini et al. 1993; Mermet-Bouvier et al. 1993)
<i>S. elongatus</i> PCC 7942	Unicellulaire	Transformation (Mühlenhoff et Chauvat 1996)	Conjugaison (Tsinoremas et al. 1994; Marraccini et al. 1993; Mermet-Bouvier et al. 1993)
<i>S. elongatus</i> PCC 11801	Unicellulaire	Transformation (Jaiswal et al. 2018)	
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	Unicellulaire	Transformation (Balasubramanian et al. 2006; Ruffing et al. 2016)	
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335	Unicellulaire		Conjugaison (Sode et al. 1992)
<i>Synechococcus</i> R2	Unicellulaire		Conjugaison (Wolk et al. 1984) Transformation, électroporation (Matsunaga et al. 1990)
<i>Synechococcus</i> WH7803	Unicellulaire		Conjugaison (Brahamsha 1996)
<i>Synechococcus</i> WH8102	Unicellulaire		Conjugaison (Brahamsha 1996)
<i>Synechococcus</i> WH8103	Unicellulaire		Conjugaison (Brahamsha 1996)
<i>Synechococcus</i> NKBG15041c	Unicellulaire		Conjugaison (Sode et al. 1992)

<i>Synechococcus</i> NKBG042902	Unicellulaire		Transformation, électroporation (Matsunaga et al. 1990)
<i>Synechococcus</i> NKBG15031C	Unicellulaire		Conjugaison (Sode et al. 1992)
<i>Synechococcus</i> NKBG15031a	Unicellulaire		Conjugaison (Sode et al. 1992)
<i>Synechococcus</i> NKBG040606B	Unicellulaire		Conjugaison (Sode et al. 1992)
<i>Synechococcus</i> NKBG040607	Unicellulaire		Conjugaison (Sode et al. 1992)
<i>Synechocystis</i> 7a	Unicellulaire		Conjugaison (Sode et al. 1992; Sode et al. 1992)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6714	Unicellulaire	Electroporation (Ludwig et al. 2008)	Conjugaison (Marraccini et al. 1993; 1993) Electroporation (Ludwig et al. 2008)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Unicellulaire	Transformation (Zang et al. 2007; Wang et al. 2015)	Conjugaison (Kreps et al. 1990; Marraccini et al. 1993)
<i>Thermosynechococcus</i> <i>elongatus</i> BP-1	Unicellulaire	Transformation (Iwai et al. 2004; Onai et al. 2004)	

Les informations ont été majoritairement trouvées à partir de (Heidorn et al. 2011; Koksharova et Wolk 2002).

Ce tableau semble montrer que la génétique est bien développée chez les cyanobactéries mais en réalité seules quatre souches sont des modèles de génétique (*Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 7002 et *Thermosynechococcus elongatus* BP-1). Notamment pour les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *S. elongatus* PCC 7942 des centaines de mutants ont été créés mais pour les autres souches, il n'existe qu'un seul article décrivant un seul mutant. Très peu d'espèces de

cyanobactéries sont génétiquement manipulables par la transformation naturelle, l'électroporation ou encore la conjugaison. Et pour beaucoup d'entre elles, seuls des plasmides réplicatifs, dont la réplication est autonome dans les cellules, ont pu être majoritairement introduits par la conjugaison.

IV. Problématiques de mon travail de thèse

Un gène orphelin que nous avons appelé *ccyA*, apparaît comme être un gène marqueur de la formation de CaCO₃ intracellulaire chez des cyanobactéries. Les premières expériences de l'étude biochimique *in vitro* de la protéine produite chez *E. coli* ont donné des résultats intéressants concernant la "fonction" du gène *ccyA* en rapport avec la formation d'iACC chez les cyanobactéries (liaison avec le calcium, oligomérisation et localisation).

Mais seule une approche génétique pour analyser la fonction *in vivo* du gène *ccyA* permettra de déterminer si la protéine que ce gène code est impliquée ou non dans la formation des iACC.

Je déroulerai le plan de ce manuscrit de thèse ainsi : dans le chapitre 1, je présenterai la première stratégie utilisée pour étudier la fonction du *ccyA*. Tout d'abord j'aborderai la sélection des souches formant les iACC pour une approche de génétique de délétion du gène *ccyA*, puis j'aborderai la délétion de ce gène dans les souches sélectionnées.

Dans le chapitre 2, je présenterai la seconde stratégie pour étudier le gène, qui consiste à l'exprimer dans deux souches de cyanobactéries ne formant pas d'iACC.

Dans le chapitre 3 enfin, je présenterai la troisième stratégie, qui consiste à connaître la localisation de la protéine Calcyanine dans les souches formant les iACC.

Chapitre 1 : Délétion du gène *ccyA* chez des souches formant des inclusions de carbonate intracellulaires

I. Introduction

La première étape, pour l'approche de délétion du gène *ccyA*, a consisté à sélectionner les souches de cyanobactéries pour une approche de génétique. Au début de ma thèse, 25 souches de cyanobactéries étaient connues pour former des iACC :

- 16 souches formant des iACC dont la liste est publiée (Benzerara et al. 2014 ; De Wever et al. 2019; voir aussi le tableau S2 de la revue Görden et al. soumise)
- 9 souches formant des iACC non publiées.

Ces souches ne faisant partie ni des cyanobactéries modèles cultivées de manière routinière dans un laboratoire, ni de celles manipulées génétiquement, il était donc indispensable de choisir deux/trois souches candidates pour commencer.

II. Sélection des souches pour la génétique

A. Présélection de 7 souches à partir de critères généraux

Le tableau 4, ci-dessous, regroupe une liste non exhaustive de cyanobactéries candidates pour une approche génétique. Nous détaillons ci-après les critères de tri de cette première étape. Le premier critère indispensable pour créer des mutations ciblées (délétions ou mutations ponctuelles) de *ccyA* était de connaître la séquence du génome de la souche à manipuler. De ce fait, plusieurs souches dont le génome n'était pas connu au début de ma thèse ont d'emblée été éliminées. Parmi celles dont le génome était séquencé, d'autres caractéristiques ont été recherchées et comparées, comme :

- La facilité d'observation des inclusions : il est important que toutes ou presque toutes les cellules présentent des iACC et que les cellules comportent un assez grand nombre d'iACC observables systématiquement si on veut pouvoir identifier une différence quantifiable entre la souche sauvage et le mutant $\Delta ccyA$ que l'on souhaite
- La facilité de cultiver les souches en laboratoire : les cyanobactéries marines et désertiques sont parfois difficiles à cultiver en laboratoire et sont de ce fait exclues.

Celles qui sont gardées poussent toutes dans le milieu BG11, milieu classique couramment utilisé pour la culture de cyanobactéries (Rippka et al. 1979).

- Nous avons tenu compte de la morphologie des cellules dans ce premier tri en privilégiant les souches unicellulaires. En effet, les manipulations génétiques sont plus simples dans les souches unicellulaires. Dans les souches filamenteuses, donc composées de plusieurs cellules, l'isolement de mutant est rendu plus difficile et de ce fait peu de souches filamenteuses ont été manipulées génétiquement (Tableau 3, en introduction).
- La souche a-t-elle déjà été manipulée génétiquement ?
- La variabilité du domaine N-ter de la Calcyanine codée et la localisation des carbonates dans les cellules (aux pôles ou dispersées) ont aussi été comparées pour sélectionner des souches présentant un phénotype et une protéine Calcyanine différente, afin d'étudier la diversité de ce phénotype.

Tableau 4 : Liste non exhaustive de souches candidates à sélectionner pour une approche de génétique

Souches candidates	Observation facile des iACC	Position des iACC	Lieu d'isolement et environnement	Morphologie	Génétique réalisée	Variabilité du domaine N-ter de Calcyanine *	Conditions de croissance connues
<i>Chroococidiopsis thermalis</i> PCC 7203	Non, peu d'iACC dans peu de cellules **	Dispersées	Sol, Greifswald, Germany (C. Zhao et al. 2015)	Unicellulaire	Suppression de gènes par Conjugaison (C. Zhao et al. 2015)	HMA	90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Billi et al. 2001)
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	Très facile **	Dispersées	Sol, Rizière Sénégal **	Unicellulaire	Non	HMA	Agitation, lumière continue, 30°C, 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Bandyopadhyay et al. 2013); alternance jour/nuit (Houssen et al. 2012)
<i>Gloeomargarita lithophora</i>	Très facile **	Dispersées	Lac alcalin Alchichica, Mexique (Couradeau et al. 2012)	Unicellulaire	Non	X	22°C**
<i>Neosynechococcus sphagnicola</i> sy1 *	Oui	Dispersées	Mousse de tourbe, Slovaquie (Dvořák et al. 2014)	Unicellulaire	Non	HMA	Jour/nuit, 22°C, 20 $\text{mmol.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$ (Dvořák et al. 2014)

<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312	Oui **	Pôles et milieu cellulaire	Eau douce, Californie **	Unicellulaire	Non	HMA	22°C, **
<i>Synechococcus calcipolaris</i> PCC 11701	Oui **	Pôles et milieu cellulaire	Lac alcalin Alchichica, Mexique (Couradeau et al. 2012)	Unicellulaire	Non	HMA	22°C, **
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6716	Oui **	Pôles et milieu cellulaire	Sources chaudes (53 °C, pH c. 8.5) USA **	Unicellulaire	Non	HMA	37°C ** ; 37°C, 50 uE.m ⁻² .s ⁻¹ , jour/nuit (Roberts et al. 2003)
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6717	Oui **	Pôles et milieu cellulaire	Sources chaudes, USA (Lower Geysers B, 52 °C) **	Unicellulaire	Non	HMA	37°C ** ; 37°C, 50 uE.m ⁻² .s ⁻¹ , jour/nuit (Robertson et al. 2001)
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP1	Oui **	Pôles et milieu cellulaire	Sources chaudes, Japon **	Unicellulaire	Transformation naturelle (Iwai et al. 2004)	HMA	45°C, 50 μmol photons m ⁻² s ⁻¹ (Nowaczyk et al. 2012)

Lignes vertes : cyanobactéries sélectionnées pour l'étude de la croissance en milieux liquide et solide et pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques

Lignes rouges : cyanobactéries non sélectionnées

*Souches formant des iACC non publiées et gène non publié.

** (Benzerara et al. 2014)

Certaines cyanobactéries pourtant génétiquement manipulables en laboratoire n'ont pas été retenues pour ma thèse, comme *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 et *Thermosynechococcus elongatus* BP1.

En effet, *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 forme naturellement peu d'iACC. Il serait donc difficile de comparer le mutant de délétion du gène *ccyA* avec la souche sauvage présentant naturellement peu de carbonate.

Quant à la cyanobactérie *Thermosynechococcus elongatus* BP1, elle aurait pu être la meilleure candidate pour des manipulations génétiques. Les ACC intracellulaires sont facilement visibles : Plusieurs inclusions par cellule et dans beaucoup de cellules. Elle est unicellulaire et génétiquement manipulable (Iwai et al. 2004; Onai et al. 2004). Cependant, c'est une thermophile et sa température de croissance optimale se situe autour de 57°C (Sacko et al. 2020). En laboratoire, elle est cultivée avec une température de 45°C (Nowaczyk et al. 2012), ce qui rend les manipulations génétiques plus compliquées, surtout vis-à-vis des antibiotiques dont l'efficacité est rapidement diminuée à ces températures. D'ailleurs au laboratoire, nous n'avons pas les moyens de cultiver des souches à 45°C.

Sept souches remplissant, a priori, nos critères ont ainsi été retenues pour une deuxième étape de sélection : ***Cyanothece* sp. PCC 7425, *Gloeomargarita lithophora*, *Neosynechococcus sphagnicola* sy1, *Synechococcus* sp. PCC 6312, *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701, *Synechococcus* sp. PCC 6716 et *Synechococcus* sp. PCC 6717.**

Sur ces 7 souches, très peu de publications étaient disponibles au début de ma thèse et les conditions de croissance optimale en milieu liquide ou en milieu solide ainsi que la résistance à certains antibiotiques n'étaient pas réellement connues (Tableau 4).

B. Sélection des deux souches candidates pour une approche génétique

Dans une seconde étape, j'ai étudié pour ces sept souches :

- La croissance en milieu liquide : il est important de connaître le temps de génération de la souche en phase exponentielle et de déterminer la répartition dans le temps des diverses phases de croissance. La courbe de croissance suivie par la DO_{750 nm} permet de visualiser les diverses phases comme la phase de latence, la phase exponentielle et la phase stationnaire, ainsi que les moments de transitions entre les phases.

Comme cela sera discuté dans la partie délétion, un paramètre important pour le succès d'une transformation est l'état physiologique de la souche au moment de la mise en contact avec le plasmide.

Les cyanobactéries sont photoautotrophes (Varman et al. 2013), car dépendantes de la lumière qu'elles utilisent comme source d'énergie ; leur croissance dépend donc de l'intensité et de la qualité de lumière reçue par les cellules. Durant mon travail de thèse, je n'ai pas varié la qualité de la lumière, la source de lumière étant toujours la même (néons cool white voir matériels et méthodes). Par contre, l'intensité de la lumière est un paramètre que j'ai testé.

Les cyanobactéries, utilisées lors de ma thèse, ont été cultivées dans du BG11 (Rippka et al. 1979) ou du MM (milieu minéral – pour la composition voir le matériel et méthode) qui correspond à du BG11 modifié contenant notamment 3,78 mM de Na₂CO₃ (Domain et al. 2004). J’ai ensuite essayé d’optimiser la composition du milieu et les conditions de croissance pour les souches qui poussent très lentement.

- La croissance en milieu solide : la sélection des clones mutants se fait classiquement sur milieu solide. En effet, un clone est issu d’une cellule qui a pu croître sur le milieu de sélection. J’ai donc testé si les souches candidates étaient capables de former des colonies sur boîtes.
- Leur sensibilité aux antibiotiques : connaître la résistance aux antibiotiques permet de déterminer à quelle concentration d’antibiotique la sélection des mutants peut être réalisée.

Au laboratoire, les mutants des souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus elongatus* PCC 7942 sont classiquement sélectionnés avec 5 µg/mL de Sp/Sm ou 50 µg/mL de Km (Kammerscheit et al. 2019).

- L’amplification de *ccyA* par PCR à partir de biomasse pour pouvoir discriminer rapidement les clones mutants possédant ou non des copies de *ccyA*

J’aborderai en premier les souches qui n’ont pas été retenues pour ma thèse et je finirai par les deux souches sélectionnées.

1. *Gloeomargarita lithophora*

Croissance en milieu liquide

Pour cette souche, poussant lentement à faible luminosité (700 lux), de la vitamine B12 à 4 µg/L a été ajoutée. Dans l’environnement naturel, les cyanobactéries vivent en association avec d’autres micro-organismes qui leur fournissent des nutriments mais aussi des vitamines (Tandon et al. 2017) et ces vitamines jouent un rôle essentiel dans le développement des souches et la croissance peut être augmentée avec l’ajout de vitamine B12 (cobalamine) mais aussi de B7 (biotine) ou de B1 (Thiamine) (Tandon et al. 2017). Seule la vitamine B12 a été ajoutée mais d’autres vitamines, voire des associations de différentes vitamines, seraient à tester.

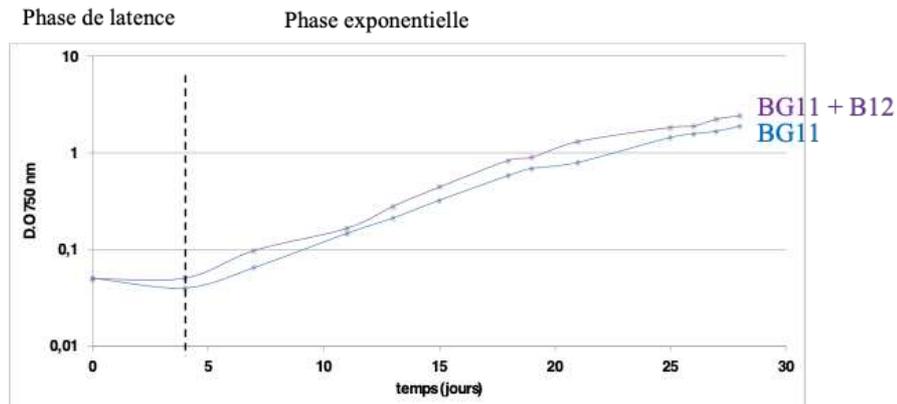


Figure 15 : **Courbes de croissance de *Gloeomargarita lithophora* en milieu liquide** dans du BG11 seul et du BG11 additionné de 4 µg/L à 30°C, 700 lux. N = 1.

L'ajout de vitamine n'augmente pas son temps de génération, qui est d'environ 85 heures pour les deux conditions de cultures testées. Et en fin de croissance, des valeurs de D.O similaires sont obtenues dans les deux conditions (2 de D.O dans la culture avec du BG11 seul et 2,4 de D.O dans la culture avec du BG11 + de la B12).

L'ajout d'autres vitamines ou des associations de différentes vitamines pourraient être testés. L'ajout de calcium ou carbone n'a pas été essayé sur cette souche, mais pourrait augmenter son temps de génération.

Son temps de génération est très lent pour une approche de génétique.

Croissance en milieu solide

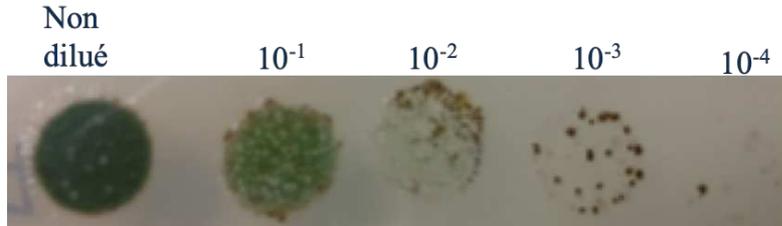


Figure 16 : **Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance en milieu solide de *Gloeomargarita lithophora***. Des spots de 10 µl d'une culture de *Gloeomargarita lithophora* à D.O 0,4 sur du MM + 10 g/L d'agar sont maintenus à 700 lux à 30°C. Les photographies des boîtes ont été prises après 1 mois de culture.

Cette souche est capable de pousser sur milieu solide à 30°C sous une faible luminosité (700 lux) mais il faut environ 2 semaines avant de voir apparaître des cellules. Elle ne forme pas de colonies isolées et est très contaminée.

Sensibilité aux antibiotiques

Des résultats similaires ont été observés sur des cultures en milieu solide et en milieu liquide : *Gloeomargarita lithophora* ne pousse ni en présence de 12,5 µg/mL de kanamycine, ni en présence de 12,5 µg/mL de chloramphénicol et ni en présence de 5 µg/mL de spectinomycine/streptomycine. Mais les contaminants de cette culture poussent à ces concentrations en antibiotique.

2. *Neosynechococcus sphagnicola* Sy1

Croissance en milieu liquide

Il a été démontré que la croissance de certaines souches de cyanobactéries formant les iACC était impactée par la concentration en CaCl_2 dans le milieu (Jinhua Li et al. 2016; De Wever et al. 2019). Nous avons donc testé si l'ajout de cinq fois plus de calcium ou dix fois plus de calcium amélioreraient la croissance de cette souche. Comme chez *Gloeomargarita lithophora* l'ajout de vitamine B12 a aussi été ajoutée.

Cette souche donc a été cultivée dans quatre milieux : du BG11, du BG11 auquel a été ajoutée de la vitamine B12 à $4 \mu\text{g/L}$, du BG11 contenant cinq fois plus de calcium ($1,25 \text{ mM}$ de CaCl_2) et du BG11 comportant 10 fois plus de calcium ($2,5 \text{ mM}$ de CaCl_2) et de la vitamine B12. Toutes les cultures ont été réalisées sous un éclairage de 700 lux.

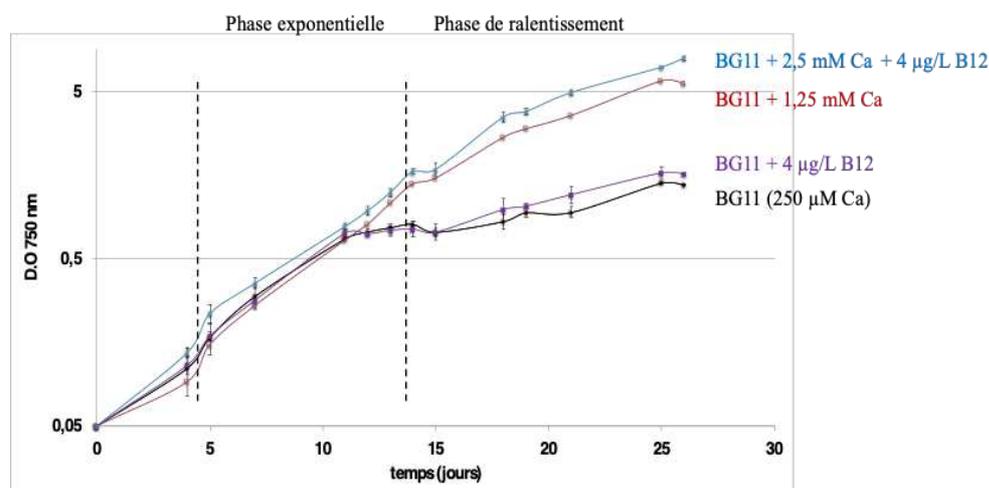


Figure 17 : Effets du calcium et de la vitamine B12 sur la croissance *Neosynechococcus sphagnicola* sy1. Courbes de croissance de *Neosynechococcus sphagnicola* sy1 cultivée dans du BG11 ($250 \mu\text{M}$ CaCl_2) ; du BG11 + $4 \mu\text{g/L}$ B12 ; du BG11 + $1,25 \text{ mM}$ Ca ; du BG11 + $2,5 \text{ mM}$ Ca + $4 \mu\text{g/L}$ B12, cultivée à 30°C , 500 lux, pendant 25 jours. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type en fonction de la variation entre les duplicats.

Lorsque *Neosynechococcus sphagnicola* Sy1 est cultivée en BG11 ou en BG11 + B12 ou en BG11 + $1,25 \text{ mM}$ de Ca, son temps de génération est d'environ 82 heures, alors que, lorsqu'elle est cultivée avec $2,5 \text{ mM}$ de Ca + de la B12, son temps de génération est de 75h. Seul l'ajout de 10 fois plus de calcium ($2,5 \text{ mM}$) + B12 permet d'augmenter son temps de génération. Après 11 jours de culture, une différence significative est observée. Les cultures contenant 5 et 10 fois plus de calcium continuent à pousser, alors que les deux cultures cultivées dans du BG11 seul ou du BG11 + B12 atteignent la phase de ralentissement plus vite. Après 25 jours de croissance, les cultures contenant 5 et 10 fois plus de calcium atteignent des D.O. de 5 et 6, alors que les deux autres cultures (BG11 ou BG11 + B12) atteignent 3 de D.O. Il semble que le calcium soit limitant pour la croissance de cette souche.

Elle est cultivée à faible luminosité (500 lux) et à 30°C .

30°C est une température peut-être trop haute pour cette souche, qui provient de mousse de tourbe en Slovaquie et qui, dans d'autres laboratoires, est cultivée à 22°C (Dvořák et al. 2014). La diminution de la température pourrait accélérer son temps de génération.

Pour une approche de génétique, sa croissance est lente.

Croissance en milieu solide

Cette souche n'a pas été retenue, bien qu'elle soit capable de former des colonies isolées sur du milieu contenant de l'agar. Elle n'a pas été rendue axénique pour une étude génétique. De plus, elle pousse très lentement sous un éclairage de 500 lux : les clones sont manipulables au bout d'un mois. Enfin les cellules semblent motiles et semblent se regrouper, ce qui ne faciliterait pas l'isolement de mutants.

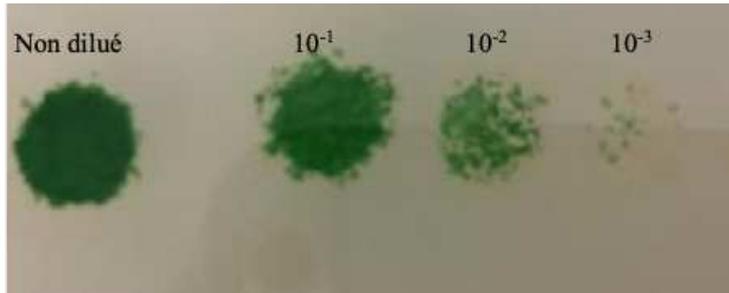


Figure 18 : Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance en milieu solide de *Neosynechococcus sphagnicola* Sy1. Des spots de 10 µl d'une culture de *Neosynechococcus sphagnicola* Sy1 à D.O 0,4 sur du BG11 + 10 g/L d'agar sont maintenus à 500 lux à 30°C. Les photographies des boîtes ont été prises après 1 mois de culture.

Sensibilité aux antibiotiques

Neosynechococcus sphagnicola sy1 présente une sensibilité en présence de 10 µg/mL de Spectinomycine/Streptomycine, de 25 µg/mL de km et de 12,5 µg/mL de chloramphénicol (Cm).

3. *Synechococcus* sp. PCC 6716

Croissance en milieu liquide

Cette souche est une thermophile et, par conséquent, elle est cultivée en milieu liquide à 39°C alors que les sources chaudes, dont la température se situe autour de 53°C (Benzerara et al. 2014) constituent son environnement naturel. Elle pourrait donc être cultivée à de plus hautes températures mais cela compromettrait la sélection avec les antibiotiques qui seraient rapidement dégradés. Elle est cultivée à 2500 lux.

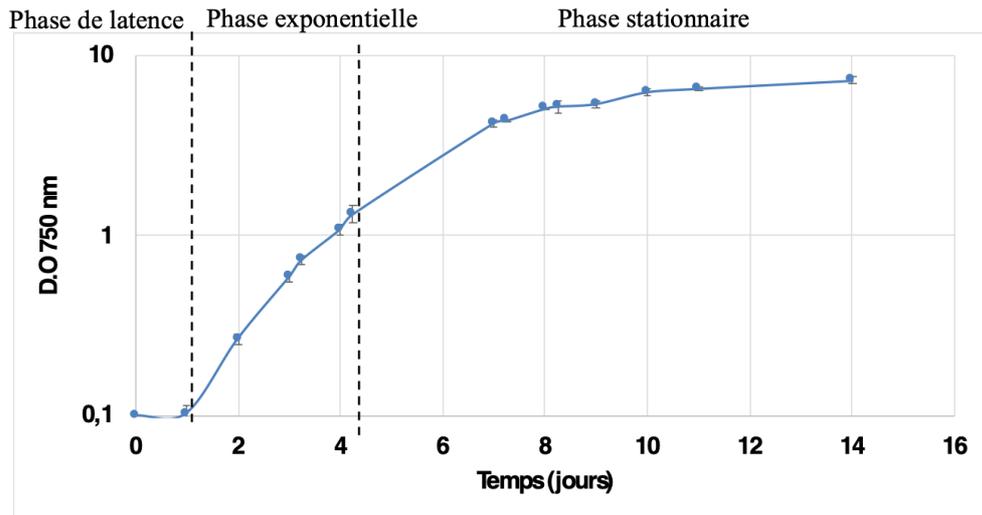


Figure 19 : Courbe de croissance de *Synechococcus* sp. PCC 6716 en milieu liquide, dans du BG11 à 39°C, 2500 lux. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type en fonction de la variation entre les triplicats.

D'après la figure, une phase de latence est observée pendant les 24 h premières heures de culture. Puis, une phase exponentielle est observée jusqu'à D.O 1,5. A 39°C, son temps de génération est de 25 heures. Ce qui est rapide pour une approche de génétique

Croissance en milieu solide



Figure 20 : Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance en milieu solide de *Synechococcus* sp. PCC 6716.

100 µl d'une culture de *Synechococcus* sp. PCC 6716 à D.O 0,8 sur du MM + 10 g/L d'agar et maintenus à 2500 lux à 30°C. Les photographies des boîtes ont été prises après 21 jours de culture.

Cette souche thermophile est cultivée en milieu solide à 30°C, ce qui explique sa couleur vert clair. Dans le laboratoire, la température de culture des souches en milieu solide se fait à 30°C. Ainsi, les cellules ont subi un choc thermique, elles étaient cultivées en milieu liquide à 39°C mais à 30°C en milieu solide. Il faudrait donc les cultiver en milieu solide aussi à 39°C.

Sensibilité aux antibiotiques

Synechococcus sp. PCC 6716 ne pousse ni en présence de 5 µg/mL de Sp/Sm, ni en présence de 12,5 µg/mL de Km, en culture liquide après 2 semaines de croissance.

4. *Synechococcus* sp. PCC 6717

Croissance en milieu liquide

Elle aussi est une thermophile ; elle est donc cultivée à 39°C, mais à faible luminosité (1000 lux).

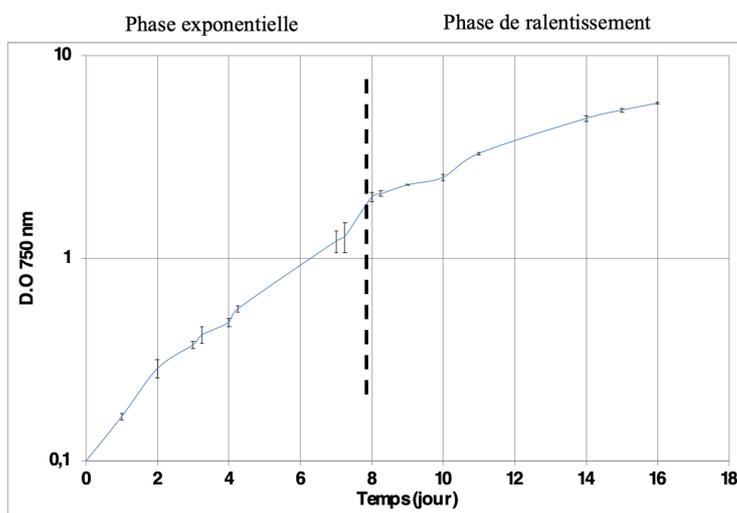


Figure 21 : **Courbe de croissance de *Synechococcus* sp. PCC 6717** dans du BG11 en milieu liquide à 39°C, 1000 lux. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type en fonction des variations de D.O. entre les triplicats.

1 de D.O est obtenu après 6 jours de culture et son temps de génération est de 40 heures, ce qui reste encore assez rapide pour une approche de génétique. Cette souche est retrouvée également dans des sources chaudes dont la température est de 52°C (Benzerara et al. 2014). Sa croissance pourrait être accélérée en la cultivant avec des températures plus hautes, mais dans ce cas cela poserait un problème de sélection avec les antibiotiques.

Croissance en milieu solide

A 30°C il est difficile d'obtenir des clones avec cette souche. Faire pousser cette souche à 39°C permettrait peut-être d'obtenir une croissance sur milieu solide.

Sensibilité aux antibiotiques

Synechococcus sp. PCC 6717 possède une résistance à la Km (croissance à Km 50 µg/mL) et pousse en présence de 5 µg/mL de Sp/Sm mais pas à 10 µg/mL.

5. *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701

Croissance en milieu liquide

L'ajout de carbonate NaHCO₃ a aussi testé, en faisant l'hypothèse que cela améliorerait, comme l'ajout de calcium, la croissance des souches formant les iACC.

La souche a été cultivée dans trois conditions de culture : dans du BG11, du BG11 + 5 fois plus de calcium (1,25 mM de CaCl₂) et du BG11 + 2,5 fois plus de NaHCO₃ (0,1 g/L).

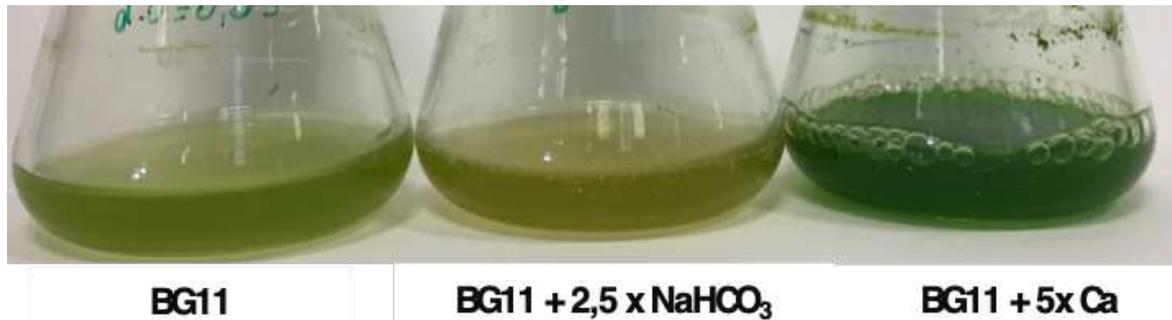


Figure 22 : Photographie de l'aspect des cultures obtenues après croissance de *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 dans du BG11 ; BG11 + 2,5x de NaHCO₃ ou BG11 + 5x de Ca, après une semaine de croissance à 30°C, 2500 lux. La D.O initiale est de 0,1. N=1

Comme on peut le voir sur la figure, l'ajout de calcium dans le milieu augmente la croissance de cette souche, mais l'ajout de NaHCO₃ ne l'augmente pas. Elle est cultivée dans les conditions standard du laboratoire. Elle pousse aussi très bien dans du MM.

Croissance en milieu solide

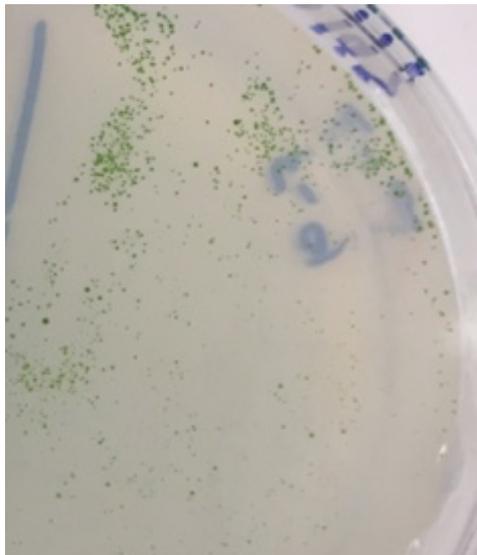


Figure 23 : Effet de l'intensité lumineuse sur la croissance en milieu solide de *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701.

100 µl d'une culture de *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 à D.O 0,4 sur du MM + 10 g/L d'agar et maintenus à 2500 lux à 30°C. les photographies des boîtes ont été prises après 14 jours de culture.

Une croissance rapide et des colonies isolées sont observées à 2500 lux.

Sensibilité aux antibiotiques

Synechococcus calcipolaris PCC 11701 ne pousse pas en présence de Sp/Sm 5 µg/mL. Cependant, je n'ai pas testé avec une concentration plus faible si une résistance était observée.

6. *Cyanothece* sp. PCC 7425

Croissance en milieu liquide

Effet de l'intensité lumineuse

J'ai commencé par varier l'intensité lumineuse de 1500 lux ($20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) à 3500 lux.

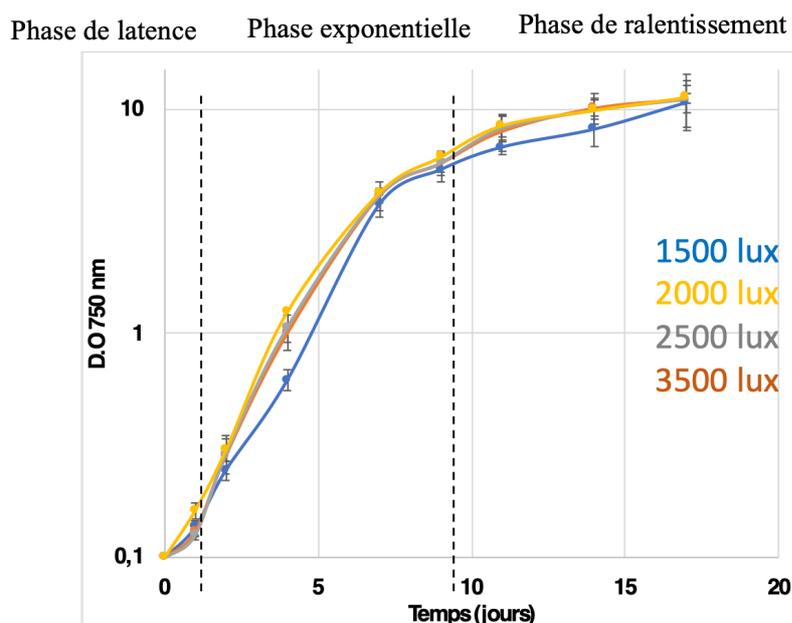


Figure 24 : **Courbes de croissance de *Cyanothece* sp. PCC 7425** cultivée 30°C dans du MM ++ liquide avec agitation sous différentes intensités lumineuses. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type en fonction des variations de D.O. entre les triplicats.

Le temps de génération de la souche cultivée à 1500 lux est de 36 heures, les souches cultivées à 2000 lux, 2500 lux, et 3500 lux ont un temps de génération de 30 heures. Aucune différence n'est observée entre 2000 et 3500 lux, mais un ralentissement est observé à 1500 lux pendant la phase exponentielle. La souche est cultivée donc dans les conditions standard du laboratoire c'est-à-dire 30°C, 2000/2500 lux, sous agitation.

Effets de la concentration en calcium et en carbone inorganique dans le milieu liquide

Nous avons testé l'ajout de calcium (CaCl_2) à une concentration dix fois plus élevée (2,25 mM) que dans le milieu MM et mais aussi l'ajout de carbonate NaHCO_3 à 0,8 g/L sur la croissance de cette souche. Le milieu obtenu est appelé MM ++.

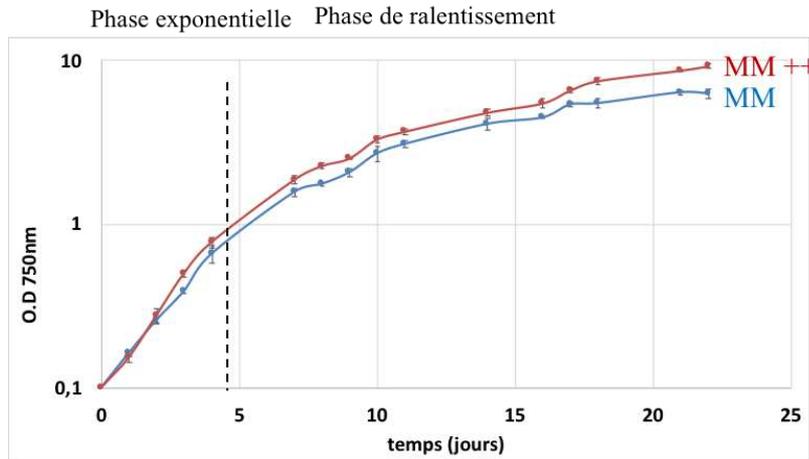


Figure 25 : **Courbes de croissance de *Cyanothecce* sp. PCC 7425** cultivée à 30°C dans du MM liquide (250 μ M Ca) ou MM++ (2,5 mM Ca et 9,523 mM NaHCO_3) avec agitation. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type en fonction des variations de D.O entre les triplicats.

Dans le milieu MM++, la croissance est augmentée (le temps de génération est de 28 heures) comparée à la croissance lorsqu'elle est cultivée dans du MM (temps de génération de 35 heures). Au bout de 2 jours de culture, une différence de D.O peut être observée entre les deux courbes. La phase exponentielle dure 96 heures.

Un temps de génération de 28h est rapide pour une approche de génétique.

Croissance en milieu solide

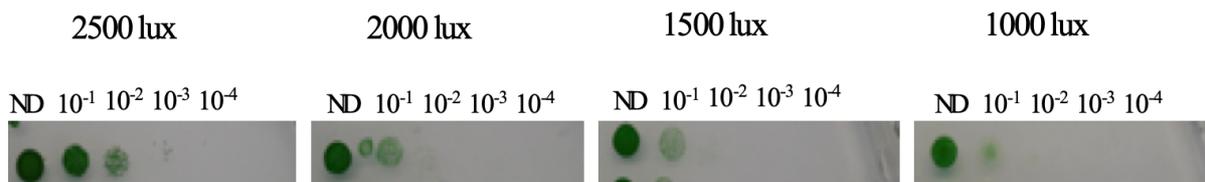


Figure 26 : **Effets de l'intensité lumineuse sur la croissance en milieu solide de *Cyanothecce* sp. PCC 7425.** Des spots de 10 μ l d'une culture de *Cyanothecce* sp. PCC 7425 à D.O 0,5 sur du MM + 10 g/L d'agar sont maintenus sous diverses intensités lumineuses à 30°C. Les photographies des boîtes ont été prises après 11 jours de culture.

Cette souche pousse plus rapidement à 2500 lux. Sa croissance est rapide en milieu solide, et elle forme des colonies isolées.

Sensibilité aux antibiotiques

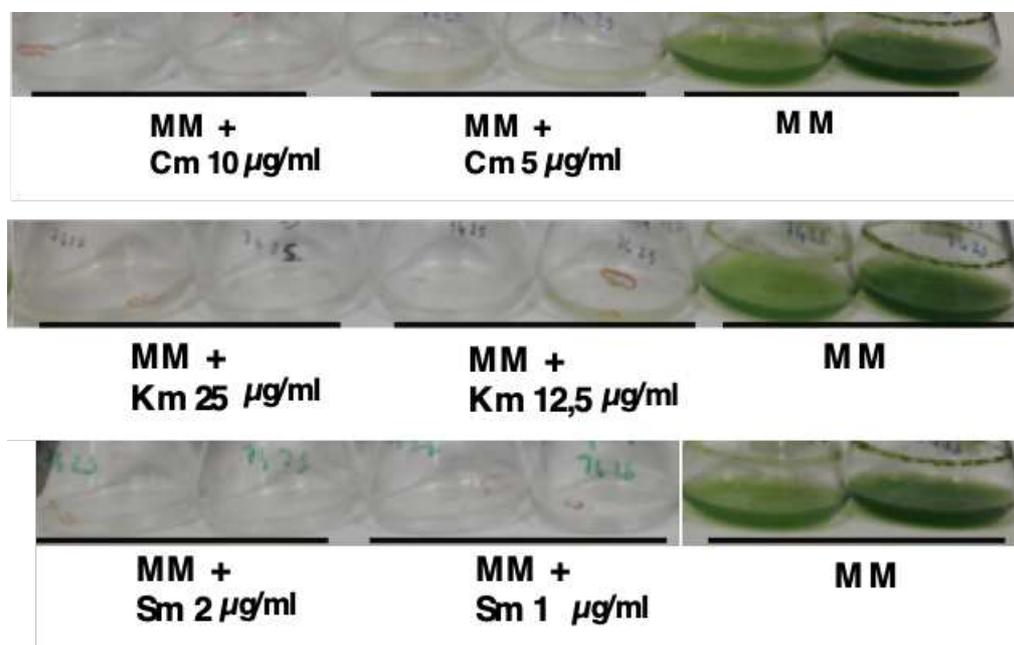


Figure 27 : Photographies de cultures de *Cyanothecce* sp. PCC 7425 cultivées 15 jours dans du MM liquide, contenant ou non des antibiotiques, à 30°C avec agitation, sous un éclairage de 2500/2000 lux. Cm : chloramphénicol ; Km : Kanamycine ; Sm : Streptomycine ; Sp : Spectinomycine

Lorsque *Cyanothecce* sp. PCC 7425 est cultivée sur le milieu MM, ou MM++ liquide ou solide (agar 10 g/L) contenant du chloramphénicol (Cm ; 10 µg/mL), de la kanamycine (Km ; 25 µg/mL et 40 µg/mL pour les boîtes MM++, de la streptomycine (Sm ; 2 µg/mL), les cultures meurent.

7. *Synechococcus* sp. PCC 6312

Croissance en milieu liquide

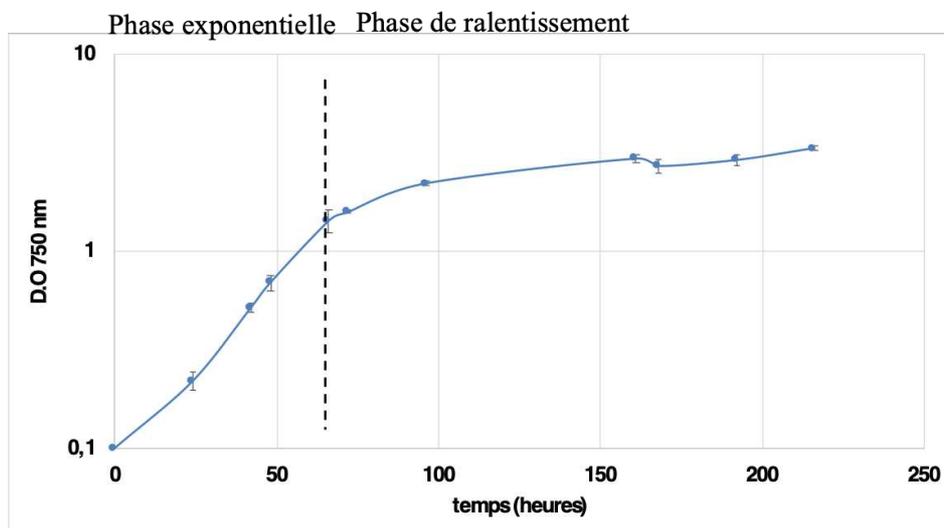


Figure 28 : **Courbe de croissance de *Synechococcus* sp. PCC 6312** cultivée dans du BG11 liquide, à 30°C sous un éclairage de 2500 lux, avec agitation. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type en fonction des variations de D.O entre les triplicats.

Cette souche pousse rapidement dans les conditions standard du laboratoire (30°C, agitation, 2000-2500 lux), et son temps de génération est de 17 heures. Aucun test n'a été réalisé pour essayer d'augmenter sa croissance. La phase exponentielle est rapide, 1 de D.O est obtenu après 60h de culture.

Sa croissance est rapide pour une approche de génétique.

Croissance en milieu solide

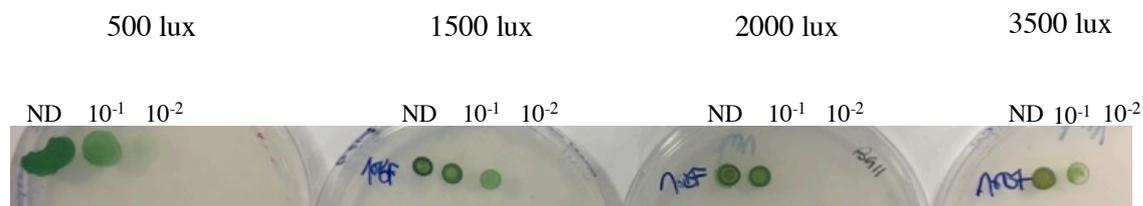


Figure 29 : **Effets de l'intensité lumineuse sur la croissance en milieu solide de *Synechococcus* sp. PCC 6312.** Des spots de 10 µl d'une culture de *Synechococcus* sp. PCC 6312 à D.O 0,1 sur du MM + 10 g/L d'agar sont maintenus sous diverses intensités lumineuses à 30°C. Les photographies des boîtes ont été prises après 8 jours de culture.

Sa croissance est rapide en milieu solide et elle forme des colonies isolées. Une croissance plus rapide est observée lorsque cette souche est cultivée à 1500 lux. Des cellules motiles sont observées.

Sensibilité aux antibiotiques

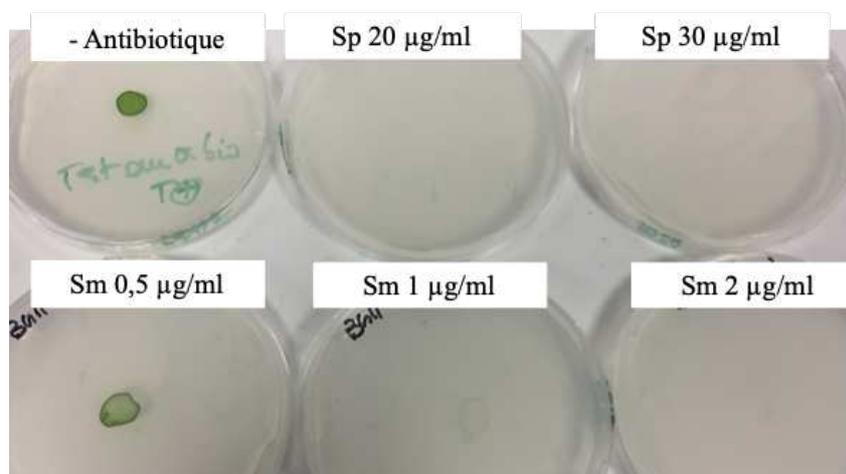


Figure 30 : **Croissance en milieu solide** sur du BG11 avec + Sp 20 µg/mL, Sp 30 µg/mL, Sm 0,5 µg/mL, Sm 1 µg/mL et Sm 2 µg/mL, après deux semaines de culture.

Cette souche n'est ni résistante à la Sp 20 ou 30 µg/mL, ni à la Sm 2 µg/mL. Je n'ai pas testé avec des concentrations plus faibles de Sp. D'autres tests seraient donc à réaliser afin de connaître précisément la concentration à laquelle cette souche est sensible avec la Sp. Avec 1 µg/mL de Sm, un faible tapis vert est observé après deux semaines de culture, montrant qu'une résistance est observée à cette concentration. Avec 0,5 µg/mL de Sm elle est résistante. Avec Sm 2 µg/mL, aucune résistance n'est observée après deux semaines de culture, ni même après trois semaines. Donc cette concentration est adaptée pour sélectionner des mutants.

8. Amplification de *ccyA* par PCR

Il est indispensable de pouvoir cribler et sélectionner rapidement les clones portant les génomes mutants, c'est-à-dire dans lesquels *ccyA* est remplacé par un marqueur de résistance à un antibiotique. Pour cela des PCR sur des colonies et/ou des échantillons avec peu de biomasse doivent pouvoir être réalisées sans passer par l'extraction d'ADN génomique, ce qui prendrait beaucoup trop de temps. Les PCR ont été réalisées sur les deux meilleures candidates. Concernant les souches *Synechococcus* sp. PCC 6716, *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 et *G. lithophora*, la visualisation du gène *ccyA* est possible sur de la biomasse cellulaire (données non montrées).

Aucun test PCR n'a été réalisé sur les souches *Synechococcus* sp. PCC 6717 et *Neosynechococcus sphagnicola* Sy1.

a) *Cyanothece* sp. PCC 7425

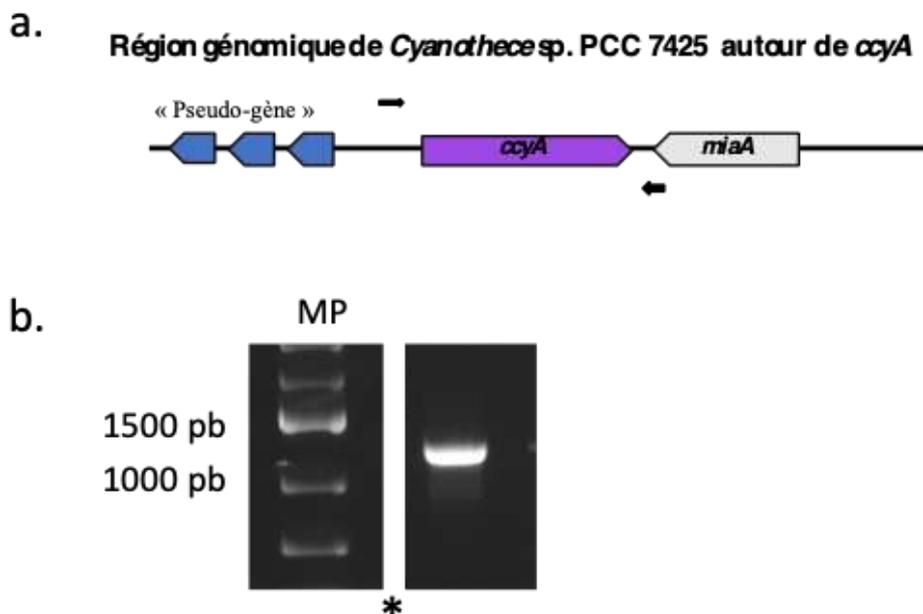


Figure 31 : Amplification et visualisation de la présence de *ccyA* par PCR chez *Cyanothece* sp. PCC 7425

a. Représentation schématique de la région génomique autour de *ccyA* chez *Cyanothece* sp. PCC 7425. Le schéma représente le fragment du gène *ccyA* dans la souche, les flèches noires représentant la position des amorces (7425 Fw et 7425 Rv) utilisées pour faire la PCR.

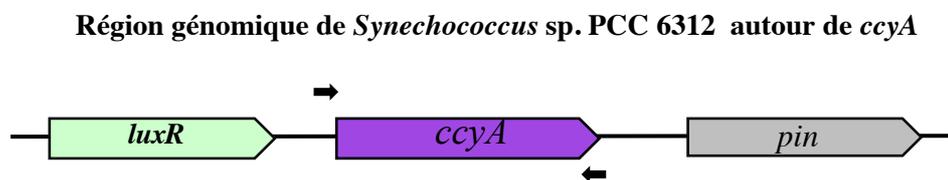
b. Gel d'électrophorèse montrant le fragment PCR sur le gène *ccyA* à partir de la biomasse de *Cyanothece* sp. PCC 7425.

Gel d'électrophorèse 1% d'agarose, visualisé grâce au BET. Le fragment d'ADN correspondant au gène a été amplifié par des amorces spécifiques à la séquence (7425 Fw/7425 Rv). La taille attendue est de 1175 pb. MP : marqueur GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific). * signifie que les deux images appartiennent au même gel.

La PCR sur de la biomasse cellulaire (donc sans passer par l'extraction d'ADN génomique) et la visualisation du gène d'intérêt sont possibles avec cette souche.

b) *Synechococcus* sp. PCC 6312

a.



b.

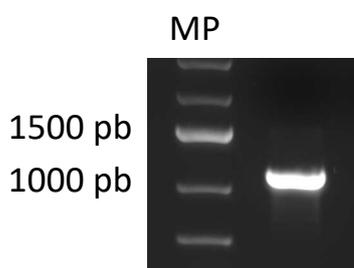


Figure 32 : Amplification et visualisation de la présence de *ccyA* par PCR chez *Synechococcus* sp. 6312.

a. Représentation schématique de la région génomique autour de *ccyA* chez *Synechococcus* sp. 6312. Le schéma représente le fragment du gène *ccyA* dans la souche, les flèches noires représentant la position des amorces (6312 Fw et 6312 Rv) utilisées pour faire la PCR.

b. Gel d'électrophorèse montrant le fragment PCR sur le gène *ccyA* à partir de la biomasse de *Synechococcus* sp. PCC 6312.

Gel d'électrophorèse 1% d'agarose, visualisé grâce au BET. Le fragment d'ADN correspondant au gène a été amplifié par des amorces spécifiques à la séquence (6312 Fw et 6312 Rv). La taille attendue est de 1175 pb. MP : marqueur GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific).

La PCR sur de la biomasse et la visualisation du gène d'intérêt sont possibles avec cette souche.

Cyanothece sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 sont les deux souches de cyanobactéries que j'ai sélectionnées pour l'approche génétique de *ccyA*. En effet :

- leur croissance en milieux liquide et solide est rapide
- elles sont capables de former des colonies isolées sur boîte
- elles présentent toutes deux une sensibilité à au moins un antibiotique comme la streptomycine
- il est possible d'amplifier des gènes par PCR directement à partir de la biomasse.

Bien que la diversité de la protéine Calcyanine ne soit pas représentée (la Calcyanine de ces deux souches est composée du domaine HMA-like en N-ter), la diversité du phénotype de localisation des iACC dans la cellule peut être étudiée. En effet, *Cyanothece* sp. PCC 7425

présente des iACC réparties dans le cytoplasme (Figure 33) alors que chez *Synechococcus* sp. PCC 6312, les inclusions sont présentes aux pôles et au septum de la cellule (Figure 35).

Toutefois, dans le futur, il est envisageable d'utiliser pour une approche génétique les souches listées ci-dessous pour les raisons suivantes :

- *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 a une croissance en milieu liquide et solide rapide qui peut être améliorée par l'ajout de calcium ; elle est sensible à la Sp/Sm et est capable de former des colonies isolées.

- *Synechococcus* sp. PCC 6716 et PCC 6717 pourraient être aussi de bonnes candidates si on peut les cultiver en laboratoire à une température proche de 40°C.

- *Neosynechococcus sphagnicola* Sy1 présente, comme *G. lithophora*, beaucoup d'iACC dans les cellules. Son temps de génération a pu être fortement augmentée avec l'ajout de calcium et de vitamine B12, et elle forme des colonies isolées sur boîte.

- *G. lithophora* est la souche la plus intéressante, de par le domaine X différent du domaine HMA-like, mais aussi par sa capacité à incorporer préférentiellement du baryum, du strontium et du radium (Mehta 2019; Cam et al. 2016) par rapport au calcium. Cependant il faudrait améliorer les conditions de culture sur boîte pour avoir des colonies isolées et éventuellement la rendre axénique.

C. Revue des connaissances sur les deux souches sélectionnées

1. *Cyanothece* sp. PCC 7425

Cyanothece sp. PCC 7425 appartient au groupe des *Cyanothece* (Komarek 1976). Elle est de forme allongée, mesurant 3-4 µm (coccoïde) et a été trouvée dans une rizière au Sénégal (Bandyopadhyay et al. 2011). Elle possède un chromosome circulaire de 5 mégabases (Mb) et 3 plasmides (les données ont été retrouvées dans NCBI).

La localisation des iACC est répartie dans le cytoplasme (Benzerara et al. 2014) et elle appartient à un clade bien distinct avec les autres souches de *Cyanothece* formant les iACC (De Wever et al. 2019).

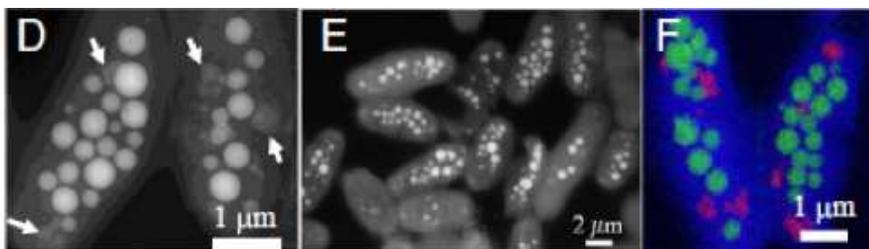


Figure 33 : Photos de *Cyanothece* PCC 7425 : les images D et E, prises au MEB, montrant les inclusions de carbonate. Ces inclusions apparaissent en forme de rond blanc et les polyphosphates en forme de rond peu brillant (flèches blanches). Les inclusions d'iACC sont réparties dans le cytoplasme. L'image F, prise au MEB-EDX, montre la composition des inclusions, vert pour le calcium et rouge pour le phosphate (Benzerara et al. 2014).

La protéine CcyA_{C.7425} (Calcyanine de *Cyanothece* sp. PCC 7425) est composée de 371 acides aminés, divisée en deux domaines : le domaine N-ter composé de 139 AA et le domaine C-ter de 232 AA (Callebaut et al. 2020).

Le gène, présent dans le chromosome, est entouré en amont par une séquence annotée comme un pseudo-gène et en aval par un gène annoté *miaA* codant pour un "tRNA (adenosine(37)-N6)-dimethylallyltransferase MiaA" (Figure 34).

Les pseudo-gènes sont considérés comme des séquences génomiques non fonctionnelles, ne codant donc pas pour une protéine (Pei et al. 2012). Mais des études ont montré que des pseudo-gènes peuvent être transcrits et l'ARN produit peut réguler l'expression de gènes (Pei et al. 2012).

Le gène *miaA* code une enzyme induisant des modifications post-traductionnelles de l'ARNt sur le résidu adénosine en position 37 (Koshla et al. 2019).

Ce gène n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire. Cependant, il a déjà été observé chez un mutant de délétion du gène *miaA* chez *Salmonella typhimurium* LT2, un ralentissement de la croissance et un allongement du taux de traduction (Ericson et Björk 1986), impactant ainsi au niveau traductionnel l'expression de gènes (Koshla et al. 2019).

Région génomique de *Cyanothece* sp. PCC 7425 autour de *ccyA*



Figure 34 : Région génomique autour du *ccyA* de *Cyanothece* sp. PCC 7425. Le gène *ccyA* de *Cyanothece* sp. PCC 7425 est entouré en amont par un « pseudo-gène » et en aval par un gène *miaA* codant pour un ARNt delta(2)-isopentenylpyrophosphate transférase. Les gènes sont représentés par des flèches colorées (bleu pour le pseudo-gène ; violet pour le *ccyA* et gris pour le gène *miaA*). Le sens des flèches indique le sens de transcription des gènes. 195 +/- 24 nucléotides (annotation selon MBGD ou NCBI) séparent le pseudo-gène du *ccyA*. 42 nucléotides séparent le *ccyA* du gène *miaA*.

2. *Synechococcus* sp. PCC 6312

Cette souche a été isolée à partir d'eau douce en Californie (Benzerara et al. 2014) ; elle est de forme allongée et mesure 1,3 µm - 1,5 µm (Herdman 2015). Elle possède un chromosome circulaire de 3 Mb et 1 plasmide (les données ont été retrouvées dans NCBI).

Les iACC sont réparties aux pôles et au septum lors de la division cellulaire (Figure 35).

Toujours d'après l'arbre phylogénétique basé sur l'ARN16S, elle forme un clade avec d'autres *Synechococcus* dont *Thermosynechococcus elongatus* BP1 dont les iACC sont réparties aux pôles (Benzerara et al. 2014).

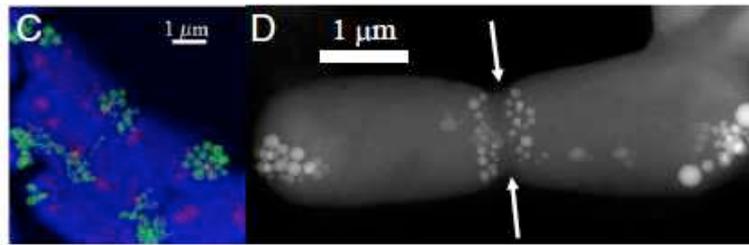


Figure 35 : **Photos de *Synechococcus* sp. PCC 6312** : l'image D, prise au MEB, montre les inclusions de carbonate apparaissant en forme de rond blanc et les polyphosphates en forme de rond peu brillant (flèches blanches). Les inclusions d'ACC sont situées au niveau des pôles et du septum lors de la division cellulaire. L'image C, prise au MEB-EDX, montre la composition des inclusions, vert pour le calcium et rouge pour le phosphate. Images tirées de (Benzerara et al. 2014).

La protéine *Ccyas*₆₃₁₂ (Calcyanine de *Synechococcus* sp. PCC 6312) est composée de 347 AA, avec un domaine N-ter de 114 AA et un domaine C-ter de 233 AA (Callebaut et al. 2020, *in prep*). Le gène *ccyA* est flanqué en amont d'un gène codant pour un régulateur transcriptionnel de la famille LuxR. Il est fort possible que ce régulateur régule l'expression du gène *ccyA*. Il est aussi possible de vérifier si ce régulateur et le *ccyA* sont co-régulés. En aval, on trouve un gène annoté *PIN* codant une protéine inconnue possédant un domaine de la famille PIN/TRAM. Les domaines TRAM se lient, de manière présumée, aux ARN (Anantharaman et al. 2001). Les domaines TRAM sont présents dans des protéines associées dans des mécanismes de traduction (Anantharaman et al. 2001). Le domaine PIN, lui, constitue une super-famille de nucléases (Matelska et al. 2017).



Figure 36 : **Région génomique de *Synechococcus* sp. PCC 6312 autour de *ccyA***. Le gène *ccyA* de *Synechococcus* sp. PCC 6312 est entouré en amont par un gène régulateur et en aval par un gène de la famille PIN/TRAM. Les gènes sont représentés par des flèches colorées (vert pour le régulateur ; violet pour le *ccyA* et gris pour le gène contenant le domaine PIN/TRAM). Le sens des flèches indique le sens de transcription des gènes.

75 nucléotides (annotation selon NCBI) séparent le régulateur *luxR* du *ccyA*. 146 nucléotides séparent le *ccyA* du gène contenant le domaine PIN/TRAM.

III. Délétion du gène *ccyA*

A. Stratégie choisie

La stratégie première pour étudier la fonction d'un gène est de le supprimer du génome de la souche afin d'observer si son absence induit un phénotype pour cette souche. Notamment, ici, le gène *ccyA* est supposé intervenir dans le mécanisme de formation des iACC chez les cyanobactéries. On s'attend donc à ce que sa délétion impacte la formation des iACC, soit au niveau de l'incorporation du calcium, soit peut-être au niveau de la formation des inclusions. Deux stratégies (la transformation naturelle et l'électroporation) ont été employées pour essayer de supprimer le gène *ccyA* de *Cyanothece* sp. PCC 7425 et de *Synechococcus* sp. PCC 6312.

B. Construction des plasmides de délétion de *ccyA*

1. Principe de l'approche

Des plasmides portant les cassettes de délétion ont été construits afin de supprimer le gène *ccyA* dans les deux souches sélectionnées précédemment : *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312. Le gène *ccyA* est remplacé par un gène conférant la résistance à un antibiotique comme la Km ou bien la Sm/Sp. La cassette de délétion s'intègre dans le chromosome cyanobactérien par recombinaison homologue (Poncelet et al. 1998) (voir Figure 13, en introduction).

La première étape de cette approche est l'annotation de la séquence nucléotidique de la région génomique portant le gène *ccyA*. Nous avons considéré une zone s'étendant sur ~1000 nucléotides (nt) en amont et 1000 nt en aval dans le but de déterminer avec précision la position des gènes adjacents (en amont et en aval). En effet, il est important d'éviter de modifier l'expression ou la traduction des gènes flanquant. La délétion d'un gène peut donc être délicate, notamment s'il y a une structure opéronique et des chevauchements de séquences entre les gènes ou si un promoteur du gène qui soit proche en aval se retrouve dans la phase codante à déléter.

La seconde étape consiste à délimiter les séquences (d'environ 300 pb) en amont et en aval qui serviront de plateformes d'homologie pour la recombinaison (Labarre et al. 1989). Lorsque c'est possible, il est préférable de supprimer la phase codante dans son intégralité c'est-à-dire du codon d'initiation (ATG) jusqu'au codon stop pour éviter notamment qu'il y ait production d'une protéine tronquée qui peut se révéler toxique. Dans de nombreuses publications les gènes ont été interrompus et délétés partiellement (Hassidim et al. 1992).

La troisième étape consiste à choisir la séquence conférant la résistance à un antibiotique remplaçant le gène dans son intégralité ou partiellement. Puis, la séquence conférant la résistance à l'antibiotique flanquée des deux régions d'homologie est clonée dans un vecteur de clonage (pEX, pUC18).

2. Construction de la cassette de délétion de *ccyA*_{C.7425}

Chez *Cyanothece* sp. PCC 7425, la séquence entière du gène n'a pas pu être supprimée. En effet, une séquence codante appelée « pseudo-gène » est présente en amont du gène *ccyA* (elle est identifiée dans toutes les bases de données mais sa localisation précise varie dans NCBI, MBGD).

Donc pour choisir en amont la région d'homologie, « une marge de sécurité » a été gardée afin d'être certain de ne pas interférer avec ce « pseudo-gène ». Pour la région en aval, il a été difficile de choisir une région d'homologie à la toute fin du gène car cette région comporte beaucoup de répétitions riches en GC, ce qui rend difficile le design d'amorces pour les PCR ou la fabrication d'un gène de synthèse. J'ai donc choisi de supprimer 928 pb du gène *ccyA*_{C.7425} sur les 1116 pb du gène (Figure 37).

Chez *Cyanothece* sp. PCC 7425, deux cassettes de délétion ont été construites, l'une portant la cassette Km^r et l'autre Sp^r/Sm^r pour diverses raisons que j'évoque ci-dessous. Les régions d'homologie **a** et **b** ont été clonées dans un plasmide de clonage pEX-A128 par la société GENECUST afin de construire le plasmide pΔ*ccyA*_{C.7425}. La cassette Km a été récupérée, à partir du plasmide pUCK4, par des amorces spécifiques, permettant d'ajouter de part et d'autre de la cassette Km les sites de restriction *HincII*. Puis la séquence a été digérée par l'enzyme *HincII*. Cette cassette Km contient, en plus du gène Km, en amont, les séquences indispensables à sa transcription et à sa traduction (le promoteur, le A initiateur de la transcription, et le site de fixation aux ribosomes...). Elle ne contient toutefois pas de terminateur de transcription afin de ne pas gêner l'expression des gènes en aval si le gène à supprimer se trouve dans un opéron. La cassette Km, digérée par l'enzyme *HincII*, et le plasmide pΔ*ccyA*_{C.7425}, digéré par l'enzyme *SmaI* ont été assemblés par ligation pour former le plasmide de délétion pΔ*ccyA*_{C.7425}::Km^r, qui est ensuite introduit par transformation dans la souche *E. coli* TOP10. Les clones Km^r obtenus, contenant donc le plasmide pΔ*ccyA*_{C.7425}::Km^r, ont été analysés par PCR puis par séquençage. En effet il est important de vérifier par séquençage qu'aucune mutation n'apparaît dans les plateformes d'homologie ou dans la cassette Km.

Pour la construction du plasmide pΔ*ccyA*_{C.7425}::Sm^r/Sp^r, la cassette Sp/Sm a été assemblée par la technique Gibson (Gibson et al. 2009). Cette technique se base sur le principe de chevauchement créé par PCR entre les séquences à assembler. Comme la cassette Km, la cassette Sp/Sm est « indépendante » vis-à-vis de la transcription et de la traduction et ne contient pas de terminateur de transcription. Après transformation dans la souche *E. coli* NEB10B, les clones ont été analysés par PCR puis séquencés.

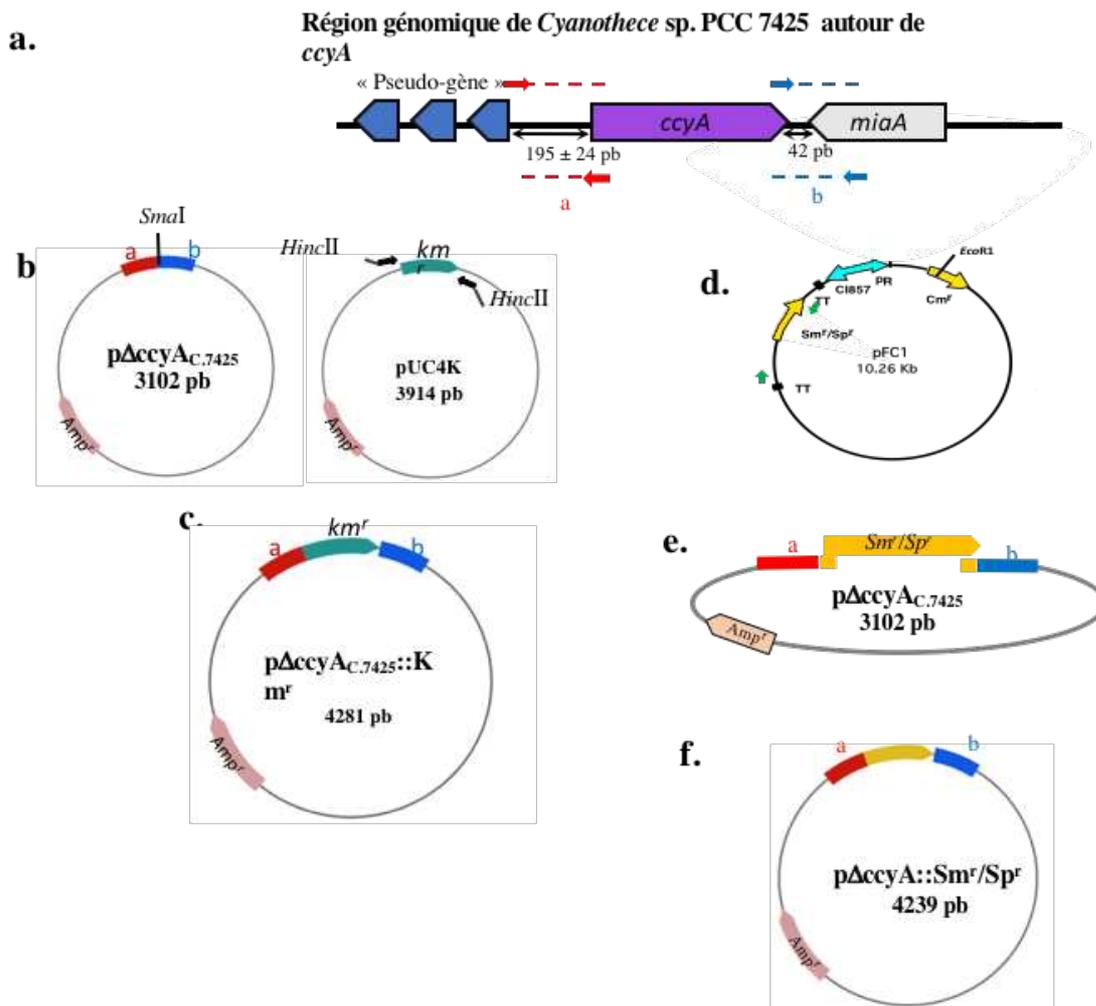


Figure 37 : construction des cassettes de délétion ciblant le *ccyA* de *Cyanotheca* sp. PCC 7425

a. Le gène *ccyA* de *Cyanotheca* sp. PCC 7425 est entouré en amont par un « pseudo-gène » et en aval par le gène *miaA*. Les gènes sont représentés par des flèches colorées (bleu pour le pseudo-gène ; violet pour *ccyA* et gris pour *miaA*). Le sens des flèches indique le sens de transcription des gènes.

195 +/- 24 nucléotides (annotation selon MBGD ou NCBI) séparent le pseudo-gène de *ccyA*.

Les flèches rouges et bleues représentent les amorces utilisées pour amplifier, par PCR, les séquences nucléotidiques (≈ 300 pb) utilisées pour la recombinaison homologue. Au final, 928 pb sur les 1116 pb de *ccyA* seront délétés. La région d'homologie en amont est annotée *a* (rectangle rouge) et la région en aval est annotée *b* (rectangle bleu)

b + c. Construction de la cassette de délétion de *ccyA* de *Cyanotheca* sp. PCC 7425 (*ccyA_{C.7425}*) dans laquelle le gène *ccyA* est remplacé par la cassette *Km^r*. Le plasmide $p\Delta ccyA_{C.7425}$ correspond au pEX-A128 dans lequel ont été clonées les régions d'homologie *a* et *b* séparées par un site de restriction *SmaI* (Eurofins). Le gène de résistance à la kanamycine, présent dans le plasmide pUCK4, a été récupéré grâce à des amorces spécifiques (flèches noires), permettant d'ajouter les sites *HincII* de part et d'autre de la cassette *Km* (traits gris associés aux flèches noires). Après digestion de la séquence par l'enzyme *HincII*, la cassette *Km* a été clonée entre les régions *a* et *b* du $p\Delta ccyA_{C.7425}$ pour générer le plasmide de délétion $p\Delta ccyA_{C.7425}::K m^r$.

d + e + f. La construction de la cassette de délétion de *ccyA* de *Cyanotheca* sp. PCC 7425 (*ccyA_{C.7425}*) dans laquelle le gène *ccyA* est remplacé par la cassette *Sm^r/Sp^r* a été réalisée par la technique Gibson (voir matériels et méthodes). La cassette *Sp^r/Sm^r* a été récupérée par des amorces spécifiques *Sp/Sm_{Fw}-Sp/Sm_{Rv}* (flèches vertes) à partir du plasmide pFC1. Des amorces spécifiques des chevauchements ont été créées pour assembler les séquences entre elles.

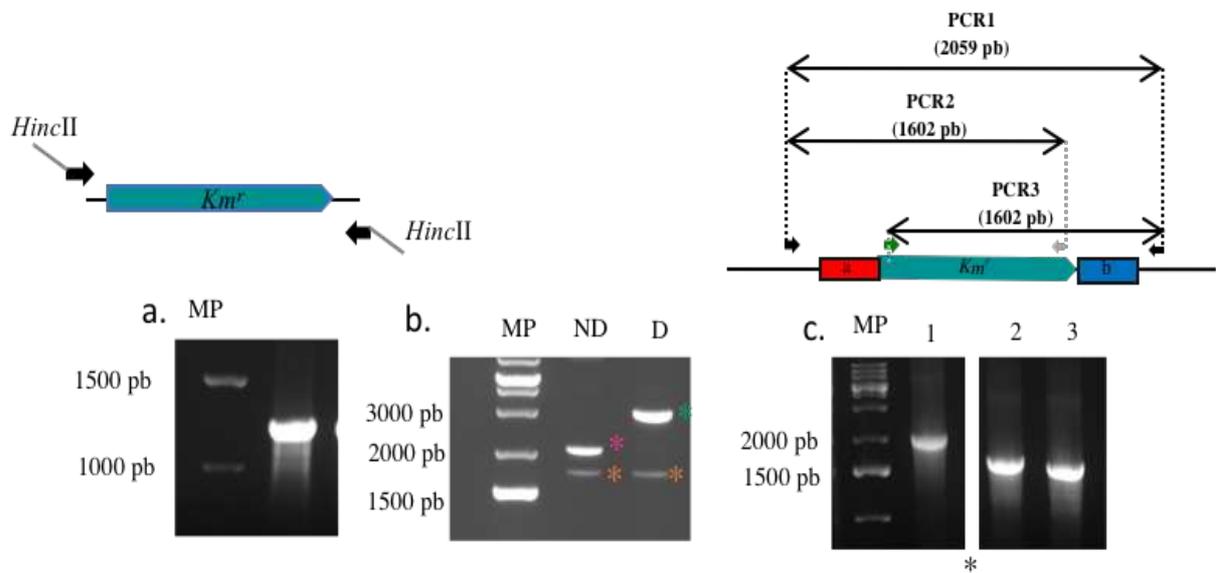


Figure 38 : **Préparation et vérification de la construction du plasmide pΔccyA_{C.7425}::Km^r.**

Les plasmides ou les produits PCR ont migré dans un gel d'agarose 0,8% et visualisés sous UV en présence de Bet

a. Récupération du gène *Km^r* à partir du plasmide pUC4K grâce à des amorces spécifiques *KmHincII-Fw* et *KmHincII-Rv*, (flèches noires), permettant d'ajouter les sites *HincII* (traits gris). La taille attendue est de 1233 pb. MP : marqueur de poids moléculaire GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific).

b. Préparation du plasmide pΔccyA_{C.7425} linéarisé par *SmaI*

ND : plasmide natif pΔccyA_{C.7425} : formes, * sur-enroulé et * circulaire ouverte.

D : digestion du plasmide pΔccyA_{C.7425} par *SmaI*. * plasmide linéarisé par *SmaI*.

MP : marqueur de poids moléculaire GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific).

c. Vérification de l'intégrité de la cassette de délétion de *ccyA* dans le pΔccyA_{C.7425}::*Km^r*. Analyses des produits de PCR sur gel d'agarose

Les puits numérotés de 1 à 3 correspondent aux PCRs schématisées au-dessus

La PCR1 est réalisée avec les amorces pEX-A For et pEX-A Rv (flèches noires).

La PCR2 est réalisée avec les amorces pEX-A For et *Km R9 Rv* (flèches noire et grise respectivement).

La PCR3 est réalisée avec les amorces pEX-A Rv et *Km A9 For* (flèches noire et verte respectivement).

MP : marqueur de poids moléculaire GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific). * Les deux images appartiennent au même gel.

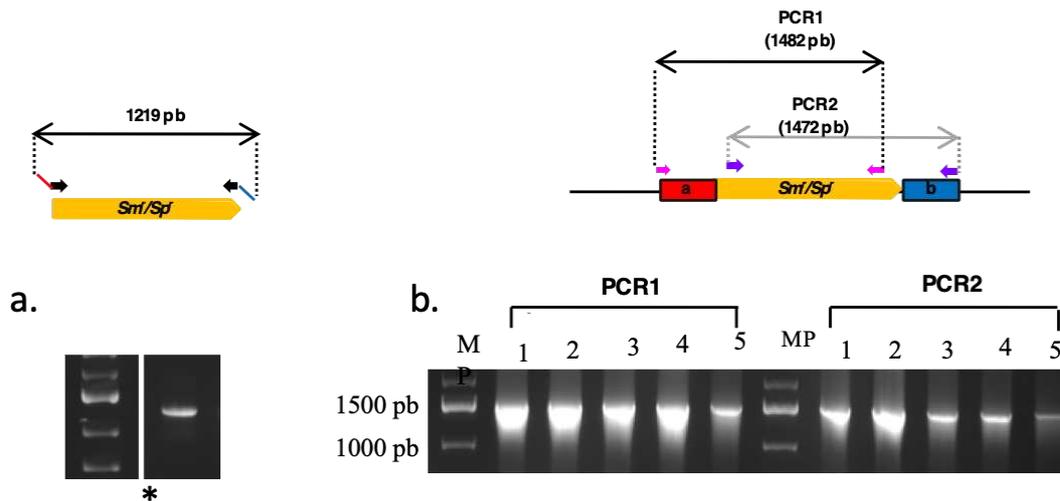


Figure 39 : **Construction et vérification par PCR de la construction du plasmide pΔccyA_{C.7425}::Sm^r/Sp^r.**

Les produits PCR ont migré dans un gel d'agarose 0,8 % et visualisés sous UV en présence de BET.

a. création de chevauchements entre les régions a et b et la cassette de résistance Sp/Sm^r grâce à des amorces spécifiques (flèches noires). Les traits rouges et bleus associés aux flèches noires représentent les chevauchements. La taille attendue est de 1219 pb. * les deux images appartiennent au même gel.

b. Visualisation des produits de PCR obtenus à partir de 5 transformants d' *E.coli* NEB10béta numérotés de 1 à 5 suite à l'assemblage par la technique Gibson.

La PCR1 a été réalisée en utilisant les amorces 7425.seq.homo.Fw et Sp/Sm Rv (flèches roses).

La PCR2 a été réalisée avec les amorces 7425.seq.homo.Rv et Sp/Sm Fw (flèches violettes)

MP : marqueur de poids moléculaire GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific).

3. Construction de la cassette de délétion de *ccyA*_{S.6312}

Comme le montre la Figure 40, aucun chevauchement entre *ccyA* et les gènes adjacents n'est observé. Le gène entier peut donc être supprimé. Le gène conférant la résistance à la Sp/Sm a été utilisé pour remplacer *ccyA* et servir de marqueur de sélection. La construction du plasmide pΔccyA_{S.6312}::Sm^r/Sp^r a été réalisée par la technique Gibson (Gibson et al. 2009).

Chez *Synechococcus* sp. PCC 6312, les régions d'homologie **c** et **d** ainsi que la cassette Sp/Sm provenant du plasmide pFC1 ont été récupérées par PCR avec des amorces spécifiques (Tableau 27) puis les séquences ont été clonées dans le plasmide pUC18, pour construire le plasmide pΔccyA_{S.6312}::Sm^r/Sp^r. Ce plasmide a ensuite été introduit par transformation dans la souche *E. coli* NEB10béta. Les clones Sm/Sp résistant obtenus, contenant donc le plasmide pΔccyA_{S.6312}::Sm^r/Sp^r, ont été analysés par PCR (Figure 41) puis par séquençage.

a.

Région génomique de *Synechococcus* PCC 6312 autour de *ccyA*

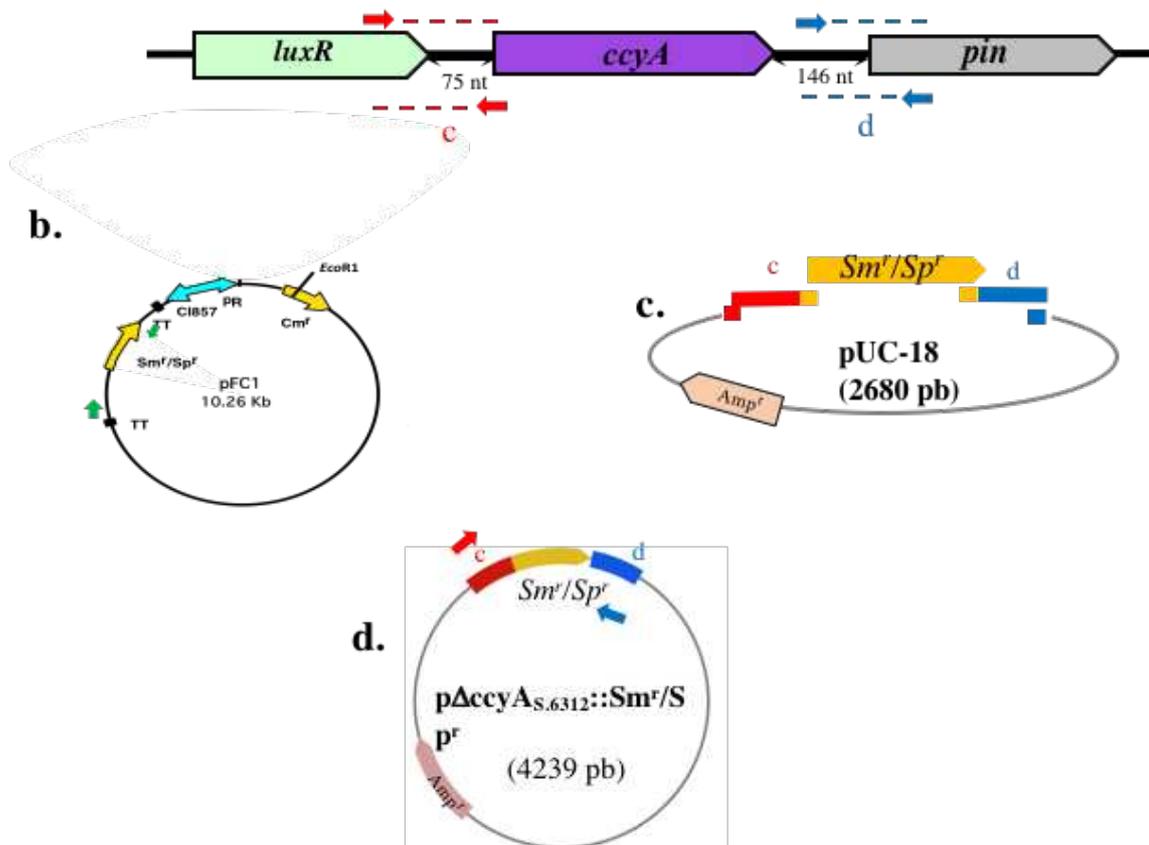


Figure 40 : **construction des cassettes de délétion ciblant le *ccyA* de *Synechococcus* sp. PCC 6312**
a. Le gène *ccyA* de *Synechococcus* sp. PCC 6312 (flèche violette) est flanqué en amont par un gène codant pour un régulateur transcriptionnel de la famille LuxR (flèche verte) et en aval par un gène annoté PIN codant pour une protéine possédant un domaine de la famille PIN (flèche grise). Le sens des flèches indique le sens de transcription des gènes. 75 nucléotides séparent le gène *luxR* de *ccyA* et 146 le séparent du gène annoté PIN

Les petites flèches rouges et bleues représentent les amorces utilisées pour amplifier par PCR les séquences **c** (rouge) et **d** (en bleu) qui serviront de plateformes pour la recombinaison homologue. Au final 1020 pb seront supprimées sur les 1044 de *ccyA*_{S.6312}

b. La cassette *Sm^r/Sp^r* est issue du plasmide pFC1 grâce à des amorces spécifiques Sp/Sm_Fw-Sp/Sm_Rv.

c. La construction de la cassette de délétion de *ccyA* de *Synechococcus* sp. PCC 6312 (*ccyA*_{S.6312}) dans laquelle le gène *ccyA* est remplacé par la cassette *Sm^r/Sp^r* a été réalisée par la technique Gibson (voir matériels et méthodes). Des amorces spécifiques des chevauchements ont été créées pour assembler les séquences entre elles.

d. Le plasmide pΔ*ccyA*_{S.6312}::*Sm^r/Sp^r* est un dérivé de pUC18 dans lequel le gène conférant la résistance à la Sm/Sp (flèche orange) est flanqué par la région **c** (en rouge) et la région **d** (en bleu).

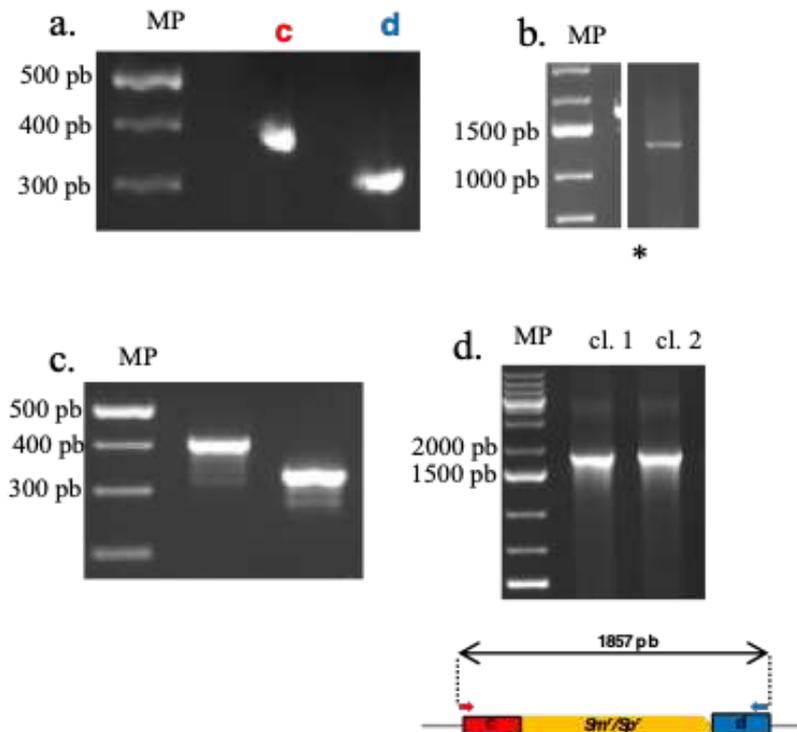


Figure 41 : **Préparation et vérification de la construction du plasmide pΔccyA_{S.6312}::Sm^r/Sp^r.**

Les produits PCR ont migré dans un gel d'agarose 0,8 % et visualisés sous UV en présence de Bet.

a. Amplification par PCR d'une région d'homologie en amont (notée **c**) de 382 pb et d'une région en aval (notée **d**) de 317 pb avec les amorces Figure 40 a. flèches rouges et bleues. Nom des amorces des flèches rouges 6312_seqUP_Fw/ 6312_seqUP_Rv et nom des amorces des flèches bleues 6312_seqDOWN_Fw/ 6312_seqDOWN_Rv.

b. Amplification par PCR pour créer des chevauchements entre la cassette Sm^r/Sp^r et les régions **c** et **d** (taille attendue : 1217 pb). La cassette Sp/Sm provient du plasmide pFC1. * les deux images appartiennent au même gel.

c. Amplification par PCR pour créer des chevauchements entre les régions **c** et **d** et le plasmide pUC18 respectivement de taille 412 pb et 339 pb. * les deux images appartiennent au même gel.

d. Vérification de l'intégrité de la cassette de délétion de *ccyA* dans le pΔccyA_{S.6312}:: Sm^r/Sp^r.

Visualisation des produits de PCR obtenus à partir de 2 transformants d'*E.coli* (NEB10béta) numérotés clone 1 et clone 2 suite à assemblage par la technique Gibson.

La taille attendue est de 1857, 6312_seqUP_Fw et 6312_seqDOWN_Rv. MP = marqueur de poids moléculaire GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific).

C. Manipulations génétiques

J'ai essayé d'introduire ces cassettes de délétion par deux stratégies différentes : par la transformation naturelle et par l'électroporation. Après l'introduction des cassettes, les régions d'homologie présentes dans les plasmides s'apparient avec celles présentes dans le génome et le gène *ccyA* est échangé avec la cassette Km ou Sp/Sm.

1. Introduction par transformation naturelle

Plusieurs conditions de transformation naturelle ont été testées chez *Cyanothece* sp. PCC 7425 et chez *Synechococcus* sp. PCC 6312 en faisant varier la D.O, la concentration d'ADN linéaire, le temps d'incubation en milieu liquide (= temps de contact entre les cellules et l'ADN), le temps d'incubation en milieu solide, et la sélection avec l'antibiotique. La concentration en antibiotique est un paramètre important car elle ne doit pas être trop faible afin d'éviter l'obtention de faux positifs, ni trop élevée sinon aucun clone résistant ne peut être sélectionné.

Tableau 5 : Paramètres testés pour la transofrmation naturelle sur *Cyanothece* sp. PCC 7525 et *Synechococcus* sp. PCC 6312

	Stress	D.O	Cell/mL	[ADN] µg_lineaire	Incubation liquide = temps de contact	Incubation solide	Km µg/mL	Sp/Sm µg/mL	Sm µg/mL	Total d'essais
Cyanothece sp. PCC 7425	Milieu liquide 24h sans phosphate*	Entre 0,5 et 1,3	2.10 ⁷	1 et 12 µg**	2000/2500 lux, de 1h30 à 6h	2000 lux, entre 24h et 48h	32 à 160	4 à 12		5***
Synechococcus sp. PCC 6312	Milieu liquide 24h sans Phosphate*	Entre 1 et 2	10 ⁸	Entre 1 et 20 µg**	1500/3000 lux, de 3h à 24h	1500/2000 lux, entre 24h et 72h		2 à 8	2 à 64	40***

* une seule condition testée

** Pour toutes les conditions testées, entre 1 µg et 3 µg d'ADN/mL ont été ajoutés, à l'exception de la condition avec le stress sans phosphate. Pour cette condition de culture sans phosphate, deux concentrations de plasmide linéaires ajoutées, chez *Cyanothece* sp. PCC 7425, 7 µg et 12 µg de plasmides ajoutés et pour *Synechococcus* sp. PCC 6312, 15 µg et 20 µg ont été ajoutés.

*** pour chaque condition, entre 5 et 10 boites ont été étalées, car l'efficacité de transformation peut être faible

Les incubations liquide et solides ont été réalisées sans antibiotiques.

Toutes les conditions ont été réalisées à 30°C.

Les antibiotiques Km, Sm/Sm, et Sm ont toujours été ajoutés sous la gélose.

a) **Chez *Cyanothece* sp. PCC 7425**

Cinq tentatives de délétion par la transformation naturelle ont été essayées. Comme pour la méthode de transformation par électroporation les clones résistant à la kanamycine étaient des faux positifs (environ 100 clones obtenus). En effet, j'ai observé par PCR des résultats similaires à ceux obtenus après les tentatives de transformation par électroporation Figure 45.

b) **Chez *Synechococcus* sp. PCC 6312**

Quarante conditions de transformation naturelle ont été réalisées avec la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312. Avec la sélection Sp/Sm 2 µg/mL (la plus basse utilisée), aucun clone n'est apparu. Mais, avec la Sm seule, une vingtaine de clones sont apparus. Une dizaine de clones sont apparus sur le témoin négatif (cellules non mises en contact avec le plasmide et cultivées avec l'antibiotique). Sur ces clones, des PCR avec les amorces 6312_seqUP_Fw et Sp/Sm_Rv (Flèches rouge et orange) et avec les amorces 6312_seqUP_Rv et Sp/Sm_Fw (Flèches bleue et verte) ont été réalisées afin de savoir si le gène de la Sp/Sm avait remplacé le gène *ccyA* (Figure 43).

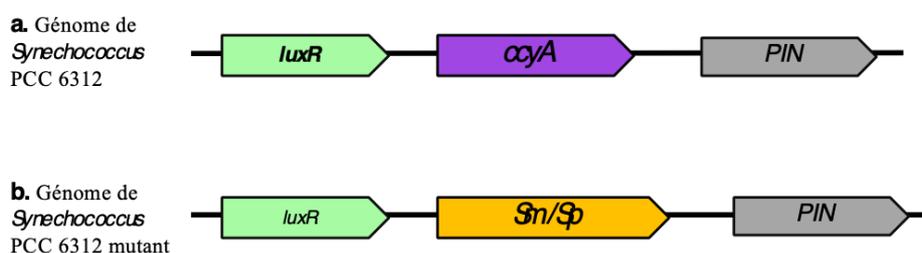


Figure 42 : **Représentation schématique de la région génomique autour du gène *ccyA* de la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312 sauvage en a. et du chromosome mutant en b.** Les gènes sont représentés par des flèches, dont le sens indique le sens de transcription. Le gène *Sp/Sm* en jaune remplace le gène *ccyA*

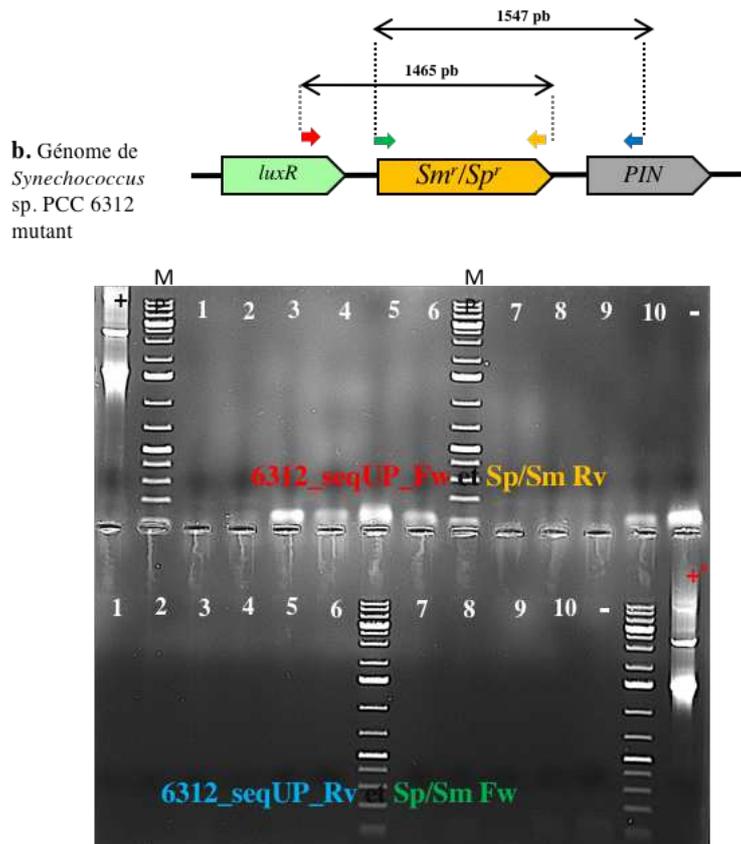


Figure 43 : **Résultats PCR sur les clones sélectionnés via la Sm seule après la transformation naturelle avec *Synechococcus* sp. PCC 6312.** Les produits PCR ont migré dans du gel d'agarose 0,8%. Dans la partie haute du gel, les PCR ont été réalisées sur les clones, le témoin négatif - (souche wt) et le témoin positif + ($p\Delta ccyA_{S.6312}::Sm^r/Sp^r$) avec les amorces 6312_seqUP_Fw et Sp/Sm_Rv. Dans la partie inférieure du gel, les PCR sur les clones, le témoin négatif - (souche wt) et le témoin positif + ($p\Delta ccyA_{S.6312}::Sm^r/Sp^r$) ont été réalisées avec les amorces 6312_seqUP_Rv et Sp/Sm_Fw. Dans le puits +, la taille attendue est de 1475 pb ; dans le puits '+', la taille attendue est de 1547 pb. MP : marqueur de poids moléculaire 1Kb Gene Ruler. La flèche rouge représente l'amorce 6312_seqUP_Fw. La flèche bleue, l'amorce 6312_seqDOWN_Rv. La flèche verte représente l'amorce Sp/Sm_Fw et la flèche orange l'amorce Sp/Sm_Rv

Ces résultats PCR montrent que le gène de la Sp/Sm ne remplace pas le gène *ccyA*. Dans la Figure 43 ci-dessus, aucune bande de taille attendue, 1475 pb ou 1547 pb, n'est observée, indiquant que les clones sélectionnés via la Sm sont probablement des faux positifs. En effet, il manque un témoin positif portant non pas sur le plasmide de délétion mais sur le génome de la souche. Ce témoin positif permet de s'assurer que l'absence de bande dans les mutants n'est pas due à la lyse cellulaire qui n'aurait pas fonctionné.

2. Introduction par électroporation

J'ai réalisé de nombreuses tentatives de délétion de *ccyA* chez *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 en utilisant l'électroporation. J'ai varié divers paramètres comme le nombre de cellules (OD_{750nm}), la phase de croissance de la culture, la quantité de plasmide circulaire ou linéaire mis en contact des cellules, la puissance (en kV), le temps (en ms) et le nombre de pulses, ainsi que le temps de régénération des cellules sans pression de sélection et la concentration en antibiotique (Tableau 6).

Tableau 6 : paramètres testés pour la transformation par électroporation sur les souches *Synechococcus* sp. PCC 6312 et *Cyanothece* sp. PCC 7425

	D.O	Cell/mL	[ADN] µg*	L	V	T en ms	N	T-R	Sélection **	Sélection***	Total d'essais
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	Entre 0,4 et 0,8	10 ⁹	Entre 1 et 6	Pas de lavage	Entre 500 et 3000	Entre 1 et 4	Entre 1 et 3	24h, 48 et 72h avec et sans agitation	Km 25 µg/mL, Km 30 µg/mL, Sm 2 µg/mL	Sp/Sm 4 et 8 µg/mL	29*****
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312.	Entre 0,4 et 1,1	10 ⁹	Entre 1 et 3	Une condition testée	Entre 500 et 3000	Entre 1 et 4	Entre 1 et 5	24 h avec et sans agitation	Sp/SM µg/mL 3 et 5µg/mL	Sp/Sm 4 et 8 µg/mL	14*****

L : Lavage 0.12 M NaCl, 0.05 M EDTA

V : voltage KeV

T : durée du pulse en milliseconde (ms)

T-R : temps de régénération cellulaire

N : nombre de pulse

*ADN linéarisé ou circulaire

** antibiotique dans la gélose

*** antibiotique sous la gélose

*****Pour chaque essai entre 5 et 10 boites ont été étalées

a) Chez *Cyanothece* sp. PCC 7425

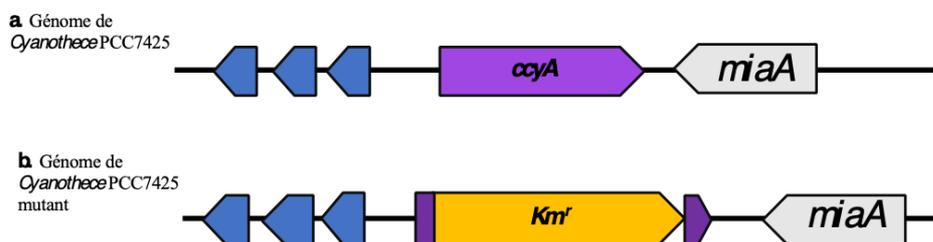


Figure 44 : Représentation schématique de la région génomique de *Cyanothece* sp. PCC 7425 portant le gène *ccyA* de la souche sauvage (a) et de la souche mutante (b) dans laquelle la quasi-totalité du gène *ccyA* a été remplacée par une cassette conférant la résistance à la kanamycine (Km^r). Les triangles représentent le pseudo-gène et la flèche beige représente le gène *miaA*.

Après électroporation, plusieurs clones (une cinquantaine) sont apparus sur Km 25 $\mu g/mL$. Un nombre similaire de clones a été obtenu pour les témoins négatifs (cellules électroporées sans plasmide et cultivées avec antibiotique). Les clones sont apparus après 8 jours de culture dans les conditions suivantes : 3000 V, pendant 4 ms, 1 pulse et un temps de régénération de 24h avec agitation. Ceux-ci ont été repiqués deux fois sur Km 50 $\mu g/mL$. Lors du second repiquage sur Km 50 $\mu g/mL$, des PCR ont été réalisées pour déterminer si la *Km* avait remplacé le gène *ccyA*. Puis un troisième repiquage sur Km 100 $\mu g/mL$ a été réalisé. Sur Km 100 $\mu g/mL$ les clones sont morts. Sur Km 50 $\mu g/mL$ les clones ont aussi fini par mourir.

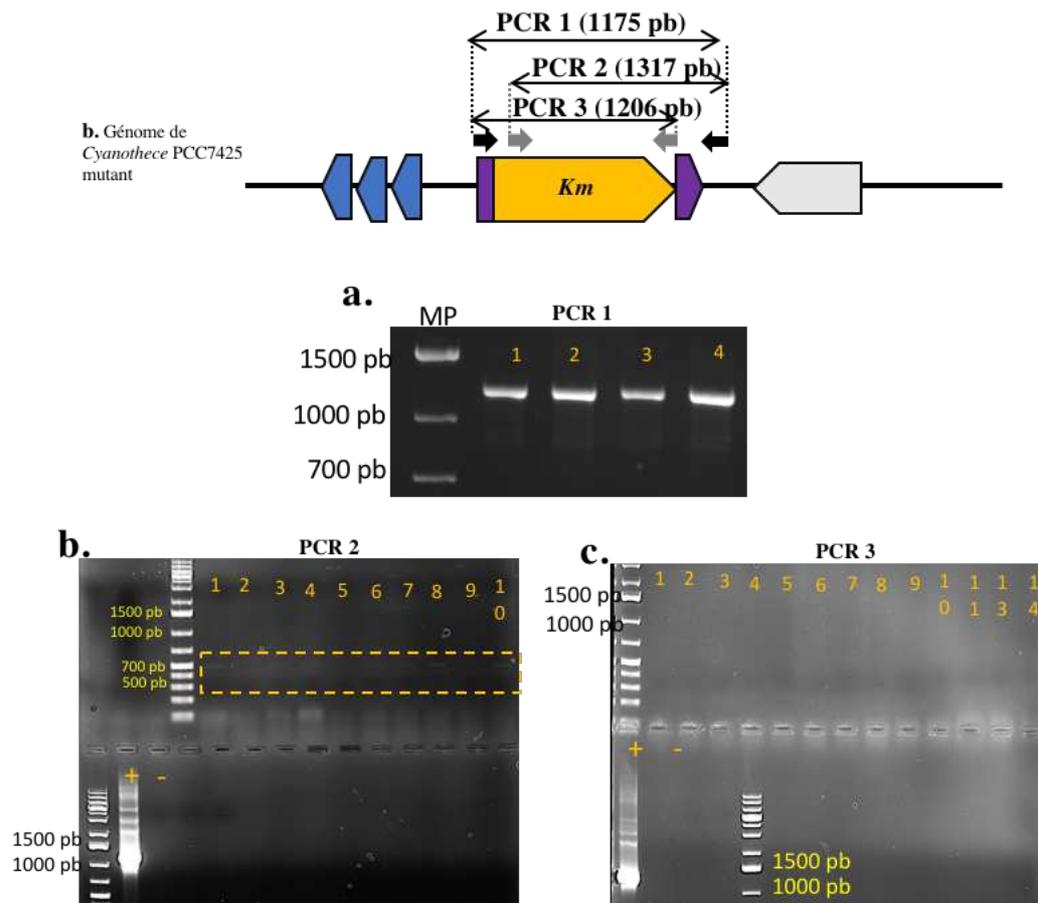


Figure 45: **Résultats des PCR réalisées sur les clones obtenus après transformation par électroporation** avec le plasmide $p\Delta ccyA_{C7425}::Km^r$ circulaire ou bien linéarisé (digéré par *pVUII*). En a. PCR 1 réalisée avec les amorces 7425 Fw/7425 Rv. La bande observée correspond à la présence du gène *ccyA* dont la taille attendue est de 1175 pb. En b. PCR 2 réalisée avec les amorces 7425 Fw/*Km_int_Rv*, la taille attendue est de 1317 pb. Aucune bande de cette taille n'est observée. Deux faibles bandes d'environ 500 pb sont observées. En c. PCR réalisée avec les amorces 7425 Rv/*Km_int_Fw*, la taille attendue de la bande devrait être de 1206 pb. Mp : marqueur de poids moléculaire 1kb Gene Ruler ; + : témoin positif ($p\Delta ccyA_{C.7425}::Km^r$) ; - : témoin négatif, souche WT.

Ces résultats PCR montrent que le gène conférant la résistance à la kanamycine n'a pas remplacé le gène *ccyA*.

Le chromosome des cyanobactéries est présent en plusieurs copies par cellule (Labarre et al. 1989; Griese et al. 2011). De ce fait, plusieurs types de résultats auraient pu être observés :

(1) La *Km* a remplacé *ccyA* dans toutes les copies du chromosome ; dans ce cas une seule bande de 1460 pb est attendue.

(2) la cassette *Km* n'a pas remplacé *ccyA* dans toutes les copies du chromosome ; de ce fait les transformants possèdent deux types de chromosomes ; des copies de chromosome sauvage et des copies de chromosome mutant. Dans ce cas, une bande de 1175 pb correspondant à la présence du gène *ccyA* et une bande de 1460 pb correspondant au chromosome mutant (*ccyA* remplacé par la *Km*) devraient apparaître

(3) La cassette *Km* ne s'est pas intégrée au locus *ccyA* et donc ne remplace pas le gène ; de ce fait la seule bande attendue est de 1175 pb. Ce que j'ai observé.

Les fragments de PCR visualisés dans la figure 45 ci-dessus, panneaux b et c sont spécifiques des chromosomes mutants. On n'observe pas de bande à 1460 pb correspondant au chromosome mutant ; par contre des bandes de 500 pb de faible intensité, non spécifiques sont observées.

Donc les clones sélectionnés sur Km 25 µg/mL, puis repiqués deux fois sur Km 50 µg/mL sont vraisemblablement des faux positifs. Des PCR spécifiques de la cassette Km^r auraient dû être réalisées pour vérifier que l'intégration n'avait pas eu lieu à un autre endroit du génome (intégration ectopique).

L'utilisation de la résistance à la kanamycine donnant lieu vraisemblablement à la sélection de faux positifs, j'ai donc construit une seconde cassette de délétion dans laquelle le gène *ccyA* a été remplacé par le gène conférant la résistance à la Sp/Sm. Malheureusement, aucun clone n'a été obtenu avec une sélection sur Sm².

b) Chez *Synechococcus* sp. PCC 6312

Quatorze tentatives d'introduction du plasmide par électroporation ont été réalisées sur la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312, avec le plasmide de délétion pΔ*ccyA*_{S.6312}::Sp^r/Sm^r, en faisant varier les différents paramètres (Tableau 6).

La sélection s'est faite directement sur Sm/Sp 3 µg/mL ou Sm/Sp 5 µg/mL mais également, en ajoutant l'antibiotique sous la gélose (Sp/Sm 4 µg/mL et Sp/Sm 8 µg/mL). Aucun clone n'a été observé.

En conclusion, deux souches de cyanobactéries ont donc été sélectionnées comme étant, selon nos critères, les meilleures candidates pour des manipulations génétiques. Les tentatives de délétion des gènes *ccyA* n'ont pas permis d'obtenir de mutants. Nous ne savons toutefois pas si cela est dû à l'impossibilité de faire rentrer l'ADN dans les souches avec les protocoles utilisés ou si cela est dû au caractère essentiel du gène.

D. Discussion

Concernant l'électroporation de *Synechococcus* sp. PCC 6312 et l'absence de clone, cette absence n'est pas due à la mort cellulaire suite à l'électroporation, car les cellules électroporées et cultivées sans antibiotique ont repoussé.

Par conséquent, plusieurs possibilités peuvent expliquer l'absence de mutants de délétion chez *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312.

- (a) La première explication est que les protocoles utilisés n'ont pas été efficaces pour faire rentrer de l'ADN dans ces deux souches ou bien l'ADN est rentré mais celui-ci a été dégradé

- (b) La seconde explication est que les protocoles ont été efficaces mais le gène *ccyA* est un gène essentiel pour la viabilité cellulaire donc sa délétion même partielle ne permet pas d'obtenir des mutants viables.
- (c) La dernière possibilité est bien évidemment une combinaison de ces hypothèses

Dans le cas (b), l'impossibilité d'obtenir des mutants de *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 serait liée au fait que le gène *ccyA* est un gène essentiel pour la viabilité des souches formant des inclusions de CaCO₃ intracellulaires, c'est-à-dire que la délétion même d'une seule copie induit la mort des cellules. En effet, différentes hypothèses de la fonction du gène (Figure 10, en introduction) peuvent expliquer son caractère essentiel ; Si celui-ci joue un rôle direct ou indirect dans la formation des CaCO₃ alors il pourrait impacter l'homéostasie du calcium, qui pourrait donc être létal si cela était modifié.

Dans ce cas, on pourrait contourner le problème en créant des mutants létaux conditionnels comme discuté au paragraphe F. perspectives.

Par la suite, je développe les difficultés qui pourraient être liées à la transformation naturelle et à l'électroporation.

Problèmes d'efficacité de la transformation naturelle et de l'électroporation

D'après la littérature, il peut y avoir plusieurs causes/paramètres contrôlant l'efficacité de la transformation naturelle et de l'électroporation. Je les détaille par la suite en discutant, selon les tests réalisés dans le cadre de notre étude, lesquels devraient être plus particulièrement pris en compte dans de futures études.

Importance de la phase de croissance

Il a été démontré que la phase de croissance influence l'efficacité de transformation chez les cyanobactéries. Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, d'après le savoir-faire du laboratoire, l'efficacité de transformation est maximale au moment du passage en phase stationnaire, de plus il est nécessaire que la souche ait été repiquée au moins trois fois en phase exponentielle avant la transformation (données non publiées). Après une transformation naturelle, chez *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, le nombre de transformants est plus élevé pendant la phase exponentielle que pendant la phase stationnaire (Onai et al. 2004; Iwai et al. 2004). C'est pourquoi, ne sachant pas à quel moment la souche est la plus compétente, nous avons utilisé des cultures de différentes phases de croissance (début, milieu et fin de la phase exponentielle et début de la phase stationnaire) lors des tentatives de transformations pour pallier ce problème mais aucune condition testée n'a donné de meilleur résultat.

Importance des longueurs des régions d'homologie en amont et en aval du gène

Des études ont montré que l'efficacité de transformation dépendait des longueurs des régions d'homologie en amont et en aval entourant le gène conférant la résistance à un antibiotique. Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, des résultats montrent qu'avec des régions d'homologie dont les longueurs sont de 1300 pb en amont et de 1700 pb en aval, l'efficacité était la plus élevée. A l'inverse, avec 400 pb de chaque côté, l'efficacité était moindre (Zang et al. 2007). Chez *Synechococcus* sp. PCC 7002, l'efficacité de la transformation augmente avec la taille des régions d'homologie et le temps de contact entre les cellules et le plasmide linéaire. La taille minimum des régions d'homologie pour obtenir des mutants est de 250 pb, cependant,

avec une taille de 1250 pb, l'efficacité est plus élevée (Ruffing et al. 2016). De même pour *Thermosynechococcus elongatus* BP1, la taille des régions d'homologie influence l'efficacité de la transformation (Onai et al. 2004).

Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus elongatus* PCC 7942, des régions d'homologie de 300 pb sont suffisantes pour obtenir des mutants (Kammerscheit et al. 2019). Ainsi, pour les trois plasmides de délétion utilisés dans ma thèse, (p Δ ccyA_{C.7425}::Km^r, p Δ ccyA::Sm^r/Sp^r et p Δ ccyA_{S.6312}::Sm^r/Sp^r), des régions d'homologie de 300 pb en amont et 300 pb en aval ont été utilisées. Une possibilité serait d'augmenter ces régions d'homologie avec au moins 1000 pb de chaque côté du gène conférant la résistance à l'antibiotique.

Importance du temps de contact entre cellules et ADN et importance de la concentration en plasmide

Pour la transformation naturelle, le temps de contact entre les cellules et l'ADN est un paramètre important pour l'efficacité de transformation chez les cyanobactéries. Et le temps de contact optimal est souche dépendante, par exemple chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, une période d'incubation trop courte (< à 1h) ou trop grande (> à 10 h) peut diminuer l'efficacité de transformation (Zang et al. 2007). Au laboratoire, le temps de contact dure 1h - 1h30 (Chauvat et al. 1986). Chez *Synechococcus* sp. PCC 7002, l'efficacité de transformation est corrélée avec le temps d'incubation, et 24h d'incubation est le temps optimum (Ruffing et al. 2016), et chez *Thermosynechococcus elongatus* BP1, une incubation de 4 heures permet d'obtenir une efficacité maximale (Onai et al. 2004).

Pour *Cyanothece* sp. PCC 7425 j'ai donc fait varier les temps de contact entre 1h30 et 6h, et pour *Synechococcus* sp. PCC 6312 entre 3h et 24h.

Une augmentation de la concentration de plasmide mis en contact avec les cellules augmente aussi l'efficacité de la transformation naturelle (Thiel et Poo 1989; Zang et al. 2007). Cependant, à partir d'une certaine concentration, l'efficacité n'augmente plus (Zang et al. 2007) et peut même la diminuer (exemple chez *Thermosynechococcus elongatus* BP1) (Onai et al. 2004). Généralement les concentrations utilisées/optimales sont de 1 μ g de plasmide par mL pour 10⁸ cellules (Labarre et al. 1989). C'est pourquoi, pour toutes les tentatives réalisées, entre 1 μ g et 3 μ g de plasmide ont été utilisés, excepté pour les tentatives avec le stress sans phosphate, 7 μ g et 12 μ g ont été utilisés avec la souche *Cyanothece* sp. PCC 7425 et 15 μ g et 20 μ g avec la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312.

D'autres explications pourraient expliquer l'échec de la transformation naturelle et de l'électroporation.

Des barrières, à l'extérieur de la cellule comme les exopolysaccharides (EPS) et les nucléases, à l'intérieur de la cellule comme le système de restriction-modification (R-M) peuvent empêcher l'ADN de rentrer dans la cellule ou de s'intégrer dans le génome (Stucken et al. 2013).

Impact des Exopolysaccharides

La transformation par électroporation de plasmide répliquatif dans *Fischerella muscicola* PCC 7414 a été possible en partie en détruisant les EPS en amont par la sonication (Stucken et al. 2012). Une autre méthode pour enlever les EPS est le lavage des cellules avec du NaCl 1M pendant 1 heure (Stucken et al. 2012).

Une tentative d'électroporation avec un lavage avec du NaCl (0,12 M) et de l'EDTA (0,05 M) a été réalisée avec la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312 pour enlever les EPS, sans obtention de clones après sélection. Les cellules n'ont pas été incubées ; j'ai juste lavé 3 fois les cellules

avec du NaCl/EDTA, ce qui n'a sûrement pas suffi à enlever assez d'EPS. Une incubation d'une heure ou plus serait donc à tester.

D'après l'annotation des génomes de *Cyanothece* sp. PCC 7425 et de *Synechococcus* sp. PCC 6312 et dans NCBI, les deux souches possèdent des protéines impliquées dans la formation des EPS (WP_156793635.1 pour le génome de *Cyanothece* sp. PCC 7425 ou WP_015125213.1 pour le génome de *Synechococcus* sp. PCC 6312). Cependant, cette annotation ne prouve en rien que ces deux souches produisent des EPS, aucun test n'a été réalisé montrant que des EPS étaient produits. Mais si les souches en produisaient alors cela pourrait constituer une barrière pour l'introduction d'ADN par transformation.

Impact des nucléases

Les nucléases, enzymes clivant l'ADN, constituent, elles aussi, une barrière extérieure à l'entrée d'ADN dans les cellules. Toutes les cyanobactéries produisent des nucléases extracellulaires et intracellulaires (Stucken et al. 2013). Ces enzymes peuvent être inactivées par l'EDTA, augmentant ainsi l'efficacité de transformation après introduction de plasmide linéaire obtenu par PCR chez *S. elongatus* PCC 7942 (Almeida et al. 2017). L'EDTA est un agent chélateur des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Il permet donc d'inhiber l'activité des nucléases Ca-dépendante (Almeida et al. 2017). D'après l'annotation de 2019 du génome de *Synechococcus* sp. PCC 6312 dans NCBI, elle possède des gènes codant pour des nucléases (id : WP_015124831.1 ; id : WP_015126264.1 ; id : WP_015126192.1), qui sont peut-être la raison de l'inefficacité de la transformation naturelle ou par électroporation.

J'ai réalisé une électroporation avec en amont un lavage des cellules à l'EDTA (0,05M) et NaCl (0,12 M), au cours duquel 1 μ g d'ADN linéaire avait été mélangé aux cellules. Aucun mutant n'est apparu après sélection avec antibiotique. Il est probable qu'un seul lavage n'ait pas été suffisant pour inactiver les nucléases.

Rôle du système restriction-modification

En plus, les cyanobactéries possèdent une barrière intracellulaire : le système restriction-modification (R-M). Il permet à la cellule de différencier l'ADN cellulaire (chromosome et plasmide) de l'ADN étranger. Ce système est composé d'enzymes de restriction endonucléases et d'enzymes de méthyltransferase. Les endonucléases reconnaissent et clivent les ADN non méthylés (=non modifiés). Les méthylases modifient l'ADN cellulaire en méthylant les cytosines et les adénines, le protégeant ainsi du clivage (Stucken et al. 2013) (Figure 46). Le système R-M est classé selon quatre types (I-IV), selon les co-facteurs requis, les sites de reconnaissance sur l'ADN, les sites de clivage et la composition des sous-unités (Roberts et al. 2003). La plupart des enzymes de restriction chez les cyanobactéries appartiennent au type II, et les enzymes de restriction les plus communes sont *AvaI*, *AvaII* et *AsuII* (Lyra et al. 2000). Plusieurs études ont montré que les systèmes R-M chez les cyanobactéries empêchaient l'intégration d'ADN étranger dans le génome de la cellule, et, qu'en inhibant ce système, l'efficacité de transformation en était augmentée.

En effet, dans la souche *Anabaena* M131, produisant des enzymes *AvaII*, l'efficacité de transformation par électroporation, d'un plasmide réplcatif, était 100 fois moins élevée si un seul site *AvaII* dans le plasmide était non méthylé (Thiel et Poo 1989). L'électroporation dans *Fischerella muscicola* PCC 7414 est dépendante de la méthylation du plasmide à intégrer. Ce plasmide a été méthylé dans *E. coli* grâce au plasmide pRL623 qui code pour trois méthylases *M.AvaI*, *M.Eco47II* et *M.EcoT221*, qui protègent contre les enzymes de restriction *AvaI*, *AvaII* et *AvaIII* (Stucken et al. 2012). L'efficacité de transformation naturelle chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 a été augmentée grâce à la méthylation du plasmide intégratif. Un plasmide portant

deux gènes méthylases ciblant spécifiquement la première cytosine des deux séquences 5'-GGCC-3' et 5'-CGATCG-3 dans le plasmide intégratif, empêche la digestion enzymatique de ces deux séquences (Wang et al. 2015). La méthylation du plasmide intégratif par le plasmide pRL623 (codant pour trois méthylases *M.AvaI*, *M.Eco47II* et *M.EcoT221* qui protègent contre les enzymes de restriction *AvaI*, *AvaII* et *AvaIII*) a été essentielle dans la réussite de la conjugaison chez *Cyanothece* ATCC 51142 (Liberton et al. 2019). Enfin, chez *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 une méthylase a permis d'introduire un plasmide de délétion (Dittmann et al. 1997).

Le système R-M de *Synechococcus* sp. PC 6312 reconnaît 15 motifs de clivage, et certains genres de cyanobactéries comme les *Cyanothece*s semblent avoir un système R-M plus large (Stucken et al. 2013). Les plasmides de délétion utilisés sont d'abord introduits dans *E. coli* pour ensuite en être extraits. *E. coli* méthyle naturellement le plasmide introduit (Barras et Marinus 1989), mais tout le plasmide n'est pas méthylé et il suffit que quelques sites de restriction soient reconnus par des enzymes de restriction produites chez *Synechococcus* sp. PCC 6312 et *Cyanothece* sp. PCC 7425 pour diminuer drastiquement l'efficacité de transformation ou d'électroporation. Une des perspectives serait d'utiliser le même type de plasmide portant des méthylases que décrit plus haut, ou de faire un pré-traitement avant la transformation sur le plasmide avec des méthylases, ciblant des séquences spécifiques (Vermaas 1996; Dittmann et al. 1997).

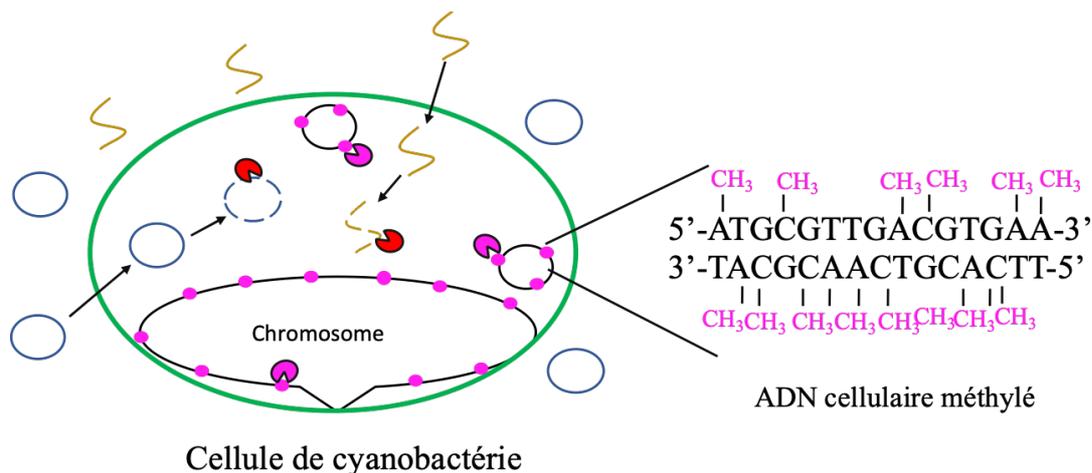


Figure 46 : **Schéma représentant le système restriction-modification dans une cellule de cyanobactérie.** L'ADN cellulaire (chromosome et plasmides -cercles noirs-) est méthylé (cette méthylation est représentée par des points roses dans la cellule, et par des molécules **CH₃** sur les cytosines -C- et adénines -A- de l'ADN) par des méthylases (pacmans roses). L'ADN étranger circulaire (cercles bleus) ou linéaire (traits oranges) n'est pas méthylé, et est dégradé par les enzymes de restriction endonucléases (pacmans rouges). Adapté de (Stucken et al. 2013).

Rôle des recombinaisons homologues

L'efficacité de la délétion d'un gène dépend aussi du taux de simple ou double recombinaison homologue (RH). La fréquence de double RH est souche dépendante (Koksharova et Wolk 2002; Thiel 1994). Avec un plasmide circulaire, un événement de simple ou de double recombinaison peut avoir lieu. Si un événement de simple recombinaison se réalise, cela conduit à l'intégration totale du plasmide dans le génome et à la non suppression du gène (Heap et al. 2012). Alors qu'avec un plasmide linéaire, l'évènement de double recombinaison homologue est favorisé (Thiel 1994) (Figure 47 ci-dessous). Après introduction d'un plasmide circulaire, certaines souches comme *Synechocystis* sp. PCC 6803 linéarisent le

plasmide grâce à des nucléases cytoplasmiques (Barten et Lill 1995). Cependant, le plasmide linéaire peut être plus sensible aux exonucléases, donc plus facilement dégradé (Almeida et al. 2017).

Chez *S. elongatus* PCC 7942, chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 et chez *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, le taux de double recombinaison est plus grand que le taux de simple recombinaison lors d'une transformation naturelle, mais l'inverse est observé, lors d'une conjugaison ou d'une électroporation (Stucken et al. 2013; Iwai et al. 2004). Chez *Synechococcus* sp. PC 6312 et *Cyanothece* sp. PCC 7425, on ne sait pas quel type -simple ou double- de recombinaison homologue est favorisé durant l'électroporation ou la transformation naturelle si le plasmide est circulaire. Ainsi pour éviter un évènement de simple recombinaison homologue, dans la plupart des tentatives testées, les plasmides de délétion ont été linéarisés. (Ludwig et al. 2008) a montré que l'insertion de plasmide réplicatif et de plasmide intégratif était possible dans la souche *Synechococcus* sp. PCC 6714 par électroporation. Mais ils observent beaucoup moins de clones après insertion dans la souche de plasmide intégratif qu'après insertion de plasmide réplicatif. Ceci s'explique par le fait qu'avec le plasmide intégratif, un évènement de double recombinaison homologue est nécessaire ce qui rend son insertion moins fréquente, alors qu'aucun évènement de double recombinaison homologue n'est requis avec un plasmide réplicatif. Ceci peut expliquer l'absence de clone après électroporation des plasmides de délétion (qui sont des plasmides intégratifs) chez *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312, car l'évènement de RH pourrait être trop peu fréquent.

Enfin, un autre type de RH peut avoir lieu : c'est la recombinaison non homologue, c'est-à-dire que le gène à insérer s'intègre n'importe où dans le génome excepté à l'emplacement ciblé. Dans certaines souches de cyanobactéries comme *Cyanothece* sp. PCC 7424, PCC 8801, PCC 8802, ATCC 51142 mais aussi PCC 7425, après électroporation, le taux de recombinaison non-homologue peut être très fréquent (Min et al. 2010).

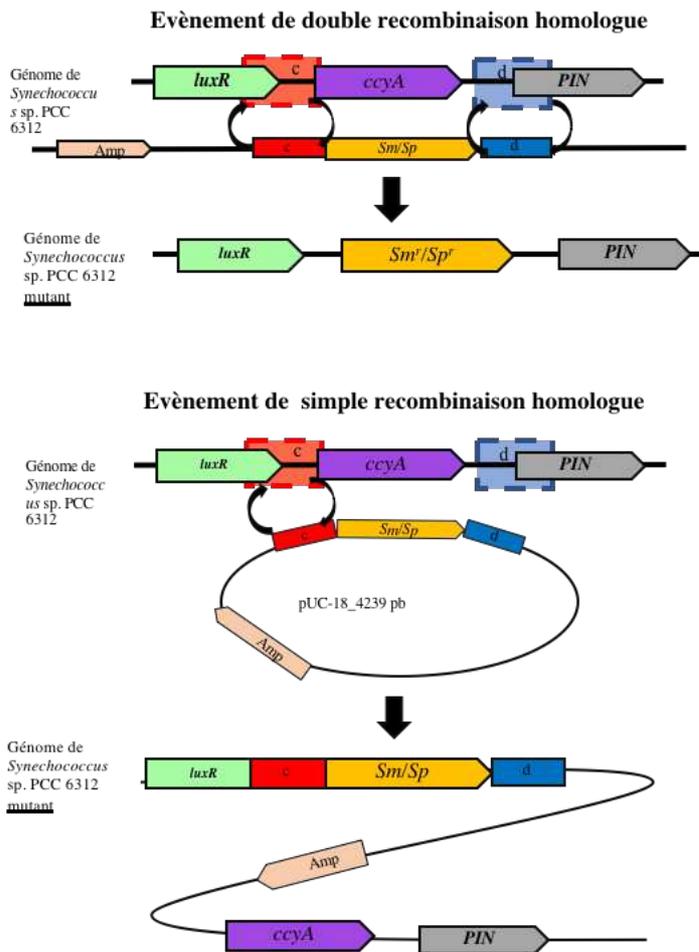


Figure 47 : Schéma représentant les évènements de double et de simple recombinaisons homologues.

Importance de la disponibilité en phosphate

Le phosphate est un élément qui entre dans la composition des molécules d'ADN (adénine (A), thymine (T), cytosine (C) et guanine (G)). Pour synthétiser leur ADN, les cellules ont donc besoin de phosphate (Loera-Quezada et al. 2015; Raven 2013). En retirant le phosphate du milieu de culture, un stress est ainsi induit. J'ai réalisé en amont une tentative de transformation naturelle avec un stress sans phosphate. Le principe était qu'après ce stress, les cellules étaient plus enclines à faire rentrer le plasmide de délétion pour synthétiser leur ADN, et qu'une copie du plasmide, au lieu d'être utilisée par la cellule, fasse la recombinaison homologue permettant de supprimer *ccyA*.

Le protocole était de cultiver les souches *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 jusqu'en phase exponentielle, puis de les repiquer dans le milieu de culture sans phosphate pendant 24 h, et ensuite de mettre en contact les cellules avec le plasmide (mis en grande quantité -7 µg et 12 µg avec les cellules de *Cyanothece* sp. PCC 7425 et 15 µg et 20 µg avec les cellules de *Synechococcus* sp. PCC 6312). Après sélection, aucun clone n'a été obtenu. Plusieurs hypothèses sont possibles : soit les souches n'étaient pas assez stressées et donc il faudrait rallonger le temps de culture sans phosphate ; soit toutes les copies du plasmide ont été

intégrées dans les cellules mais utilisées par celles-ci pour fabriquer l'ADN ; soit le taux de RH est trop peu fréquent ou encore la RH a eu lieu, une ou plusieurs copies du gène *ccyA* ont été supprimées mais le mutant de délétion n'était pas viable.

Rôle d'autres gènes

Une étude a montré la distribution, chez les cyanobactéries dont on dispose du génome, des gènes *pilA*, *pilD*, *pilB*, *pilC*, *pilM*, *pilN*, *pilO*, *pilQ* mais aussi *comA*, *comE* et *comF* (Figure 12, en introduction) essentiels dans le mécanisme de transformation (Wendt et Pakrasi 2019). Les résultats suggèrent que le processus de transformation est beaucoup plus répandu chez les cyanobactéries que prévu (Wendt et Pakrasi 2019).

Cyanothece sp. PCC 7525 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 possèdent tous ces gènes (Wendt et Pakrasi 2019 supplemental data ; Cassier-Chauvat et al. 2016). Cependant, on ne sait pas si ces gènes sont fonctionnels dans ces deux souches et si d'autres gènes encore non identifiés sont indispensables pour faire rentrer de l'ADN. Par exemple, *Cyanothece* ATCC 51142 possède elle aussi tous ces gènes (Wendt et Pakrasi 2019, supplemental data) mais les protocoles de transformation naturelle restent un échec (Min et Sherman 2010; Liberton et al. 2019). Les mêmes résultats sont obtenus avec la souche *Fischerella muscicola* PCC 7521, qui n'est pas naturellement transformable malgré la présence des gènes (Springstein et al. 2020). Des cyanobactéries formant les ACC intracellulaires possèdent les gènes *pilA*, *pilD*, *pilB*, *pilC*, *pilM*, *pilN*, *pilO*, *pilQ* mais non les gènes *comA*, *comE* et *comF*, comme *Gloeomargarita lithophora* D10, *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212 (Wendt et Pakrasi 2019). Certains gènes, comme *comF*, peuvent être essentiels pour le mécanisme de transformation, par exemple chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Nakasugi et al. 2006) mais non chez *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 qui ne les possède pas (Wendt et Pakrasi 2019, supplemental data) mais est naturellement transformable (Dittmann et al. 1997). Ainsi l'absence des gènes *comA*, *comE* et *comF* ne signifie pas que la souche n'est pas naturellement compétente.

Donc certains gènes identifiés comme essentiels à la transformation sont présents chez *Cyanothece* sp. PCC 7525 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 sans que cela ne soit suffisant pour assurer une transformation.

E. Perspectives

Toujours par transformation naturelle ou par électroporation, d'autres protocoles peuvent être utilisés.

Si l'électroporation ou la transformation naturelle ne fonctionne pas chez *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 avec de l'ADN double brin linéaire ou circulaire alors il faudra peut-être essayer le protocole de Min et Sherman 2010. Les auteurs ont transformé la souche *Cyanothece* sp. PCC 7822 avec de l'ADN simple brin. L'avantage de l'utilisation d'ADN simple brin est que celui-ci n'est pas reconnu par le système restriction-modification.

Par ailleurs, toutes les souches de cyanobactéries ne sont pas transformables (l'électroporation a été un échec chez *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912, (Stucken et al. 2012)) et, dans ce cas, d'autres techniques doivent être utilisées pour faire rentrer le plasmide de délétion.

- Les plasmides pourraient être introduit dans les souches par conjugaison (cette méthode a déjà été réalisée chez *Cyanothece* ATCC 51142 (Liberton et al. 2019), chez *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 9212, chez *Chroococciopsis thermalis* PCC 7203 (C. Zhao et al. 2015), et encore chez de nombreuses autres souches (Tableau 3).
- On pourrait aussi utiliser le système CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) qui est composé de courtes séquences d'ADN répétitives espacées par l'ADN étranger à intégrer. CRISPR-Cas, basé sur la technique de double recombinaison homologue a montré une grande efficacité dans la délétion du gène *nblA* chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Behler et al. 2018). Cependant, cette stratégie est bien plus compliquée que les protocoles de transformation naturelle chez les cyanobactéries.
- La transformation par biolistique qui consiste à bombarder les cellules avec de l'ADN pourrait aussi être utilisée (Stucken et al. 2012).

Une dernière stratégie, afin de s'assurer que l'absence de mutants de délétion du gène *ccyA* ne soit due à l'échec des protocoles testés et non pas au caractère essentiel du *ccyA*, serait de supprimer un autre gène connu pour ne pas être essentiel.

Enfin, si le gène s'avère être essentiel pour les souches alors la création de mutants conditionnels (Poncellet et al. 1998) pourra être réalisée. Le principe est d'introduire le gène *ccyA* de *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312, cloné dans un plasmide d'expression thermorégulé répliatif (pFC1) dans les souches respectives. Ainsi, dans chaque souche le gène *ccyA* sera exprimé à la fois à partir du génome et à partir du plasmide. Puis le *ccyA* du génome sera supprimé. Des mutants de délétion seront obtenus et seront viables grâce à la copie du gène exprimé à partir du plasmide. Pour étudier les conséquences de la perte du gène, l'expression du gène dans le plasmide sera petit à petit diminuée jusqu'au niveau d'expression basal indispensable à la survie des mutants qui pourront ensuite être étudiés (Figure 48, ci-dessous).

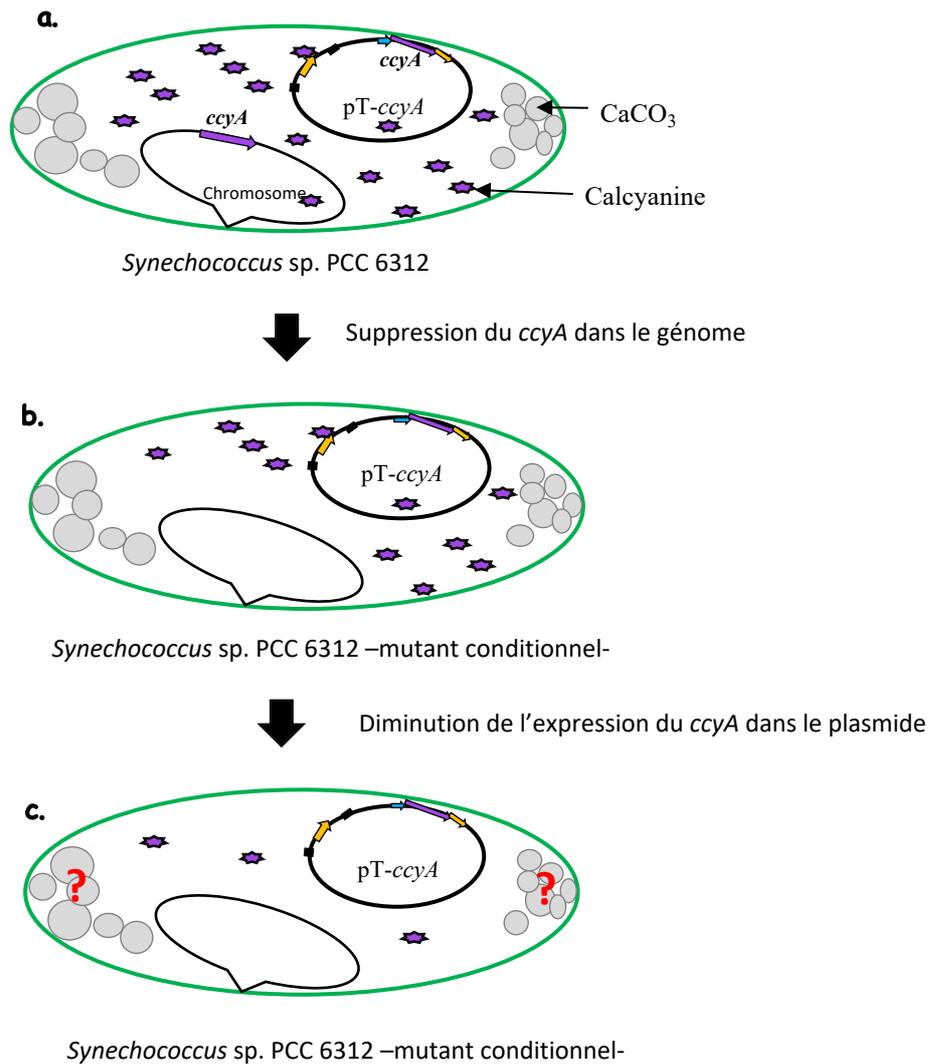


Figure 48 : **Schéma représentant le mutant conditionnel de *Synechococcus* sp. PCC 6312.** **a.** La souche *Synechococcus* sp. PCC 6312 (cercle vert) portant et exprimant son gène *ccyA* présent dans son génome et dans le plasmide d'expression. La protéine Calcyanine (étoiles violettes) est fortement produite dans la cellule. **b.** Suppression du gène *ccyA* présent dans le génome, moins de protéine Calcyanine produite **c.** Diminution de l'expression du gène et donc de la production de la Calcyanine.



Une seconde stratégie utilisée dans ma thèse pour étudier le rôle du gène *ccyA* a été de l'exprimer dans des souches ne formant pas naturellement d'iACC et ne possédant pas le gène *ccyA*, et ce grâce au plasmide d'expression pFC1, afin de voir si l'expression de ce gène induit un phénotype.

Chapitre 2 : Expression du gène *ccyA* dans des souches ne formant pas d'inclusions intracellulaires de CaCO₃.

I. Introduction

La seconde stratégie employée pour étudier la fonction du gène *ccyA* a été de l'exprimer dans deux souches ne formant pas d'iACC : *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *S. elongatus* PCC 7942.

La première étape a été de sélectionner deux souches de cyanobactéries ne formant pas d'iACC, différentes tant par leur morphologie que par leur métabolisme pour étudier l'expression d'un gène inconnu. Un phénotype peut apparaître dans une souche mais pas dans l'autre dont la morphologie, le métabolisme ou des protéines spécifiques peuvent être proches des souches formant les iACC.

Il s'agissait de comprendre si (1) l'expression de ce gène induit un phénotype chez des souches ne formant pas de carbonate intracellulaire et (2) si l'expression de ce gène induit un phénotype en lien avec la biominéralisation de CaCO₃, comme l'incorporation de calcium ou encore la formation d'inclusions intracellulaires.

La seconde étape a été de choisir les gènes *ccyA* provenant de *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701, *Gloeomargarita lithophora* et *Synechococcus* sp. PCC 6312, puis de les cloner dans un vecteur d'expression afin de produire la Calcyanine.

A. Choix des châssis cyanobactériens

1. *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis sp. PCC 6803 appartient à l'ordre des Chroococcales. Elle est hétérotrophe facultative (Rippka et al. 1979), c'est-à-dire qu'elle peut croître sans réaliser la photosynthèse tant que du glucose est présent dans le milieu. Elle possède 7 plasmides de 2,3 kb à 119 kb et un chromosome circulaire de 3,57 Mb (Chauvat et al. 1986; Kaneko et al. 1996).

Synechocystis sp. PCC 6803 est un modèle de génétique (Tableau 3, introduction). Elle est facilement manipulable, tant par la conjugaison que par la transformation. Elle est de forme sphérique (Figure 49). *Synechocystis* sp. PCC 6803 se divise par fission binaire symétrique en alternant de façon orthogonale ses plans successifs de divisions (Mazouni et al. 2004). Cette division est réalisée par la protéine FtsZ qui est capable de polymériser un anneau au milieu de la cellule sous la forme de longs polymères (Mazouni et al. 2004; Marbouty, Saguez, et al. 2009b). Une seconde protéine indispensable à la division cellulaire est la protéine membranaire ZipN : elle s'associe physiquement avec la protéine FtsZ au niveau du septum. ZipN est essentielle à la viabilité cellulaire chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Mazouni et al. 2004). D'autres protéines comme MinCDE interviennent dans le processus de division cellulaire et interagissent avec FtsZ : elles contrôlent le positionnement de FtsZ et la structure des polymères (Mazouni et al. 2004). Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, la délétion du gène *MinE* montre que celui-ci n'est pas essentiel à la viabilité cellulaire mais déclenche des divisions asymétriques et un grossissement des cellules (Mazouni et al. 2004). Dans les conditions standard optimales de culture au laboratoire LBBC au CEA en milieu liquide, son temps de génération est d'environ 12 heures. Sur milieu solide, certaines cellules de *Synechocystis* sp. PCC 6803 sont motiles.

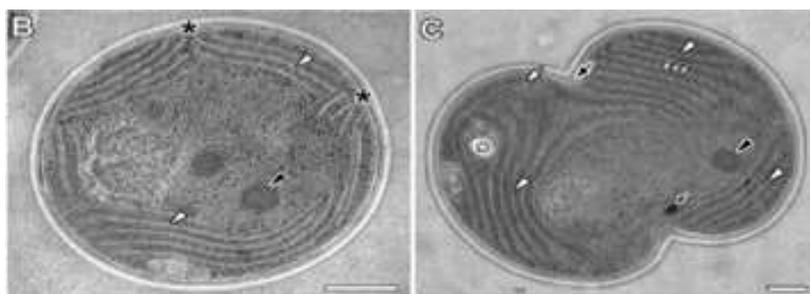


Figure 49 : Cellules de *Synechocystis* sp. PCC 6803 observées par microscopie électronique à transmission sans division observable (A.) ou en division (B.). Les flèches blanches représentent les thylakoïdes ; les grandes flèches noires pointent sur des carboxysomes et la petite flèche noire sur les polyphosphates. L'astérisque blanc représente un granule de PHA et les larges flèches blanches montrent les corps lipidiques. Image tirée de (Meene et al. 2006).

2. *Synechococcus elongatus* PCC 7942

S. elongatus PCC 7942 appartient à l'ordre des Chroococcales. Elle est photoautotrophe stricte (Waterbury 1986). Elle possède un chromosome circulaire de 2,7 Mb et deux plasmides (les informations ont été trouvées sur NCBI). Cette souche est un second modèle de génétique. Elle est de forme allongée, mesurant 1 μm de diamètre pour 3 à 4 μm de long. (Figure 50). FtsZ est aussi impliquée dans la division cellulaire chez *S. elongatus* PCC 7942, et forme également un anneau au niveau du septum qui est le lieu de la division (Miyagishima et al. 2005). Comme chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, les protéines MinCDE interviennent dans le processus de division cellulaire et interagissent avec FtsZ ; elles contrôlent le positionnement de FtsZ et la structure des polymères (Miyagishima et al. 2005). Chez *S. elongatus* PCC 7942, la délétion du gène *MinE* induit une filamentation des cellules (Miyagishima et al. 2005).

D'autres gènes comme *cdv1*, *cdv2*, *cdv3*, *fn6* et *cikA* sont impliqués dans la division cellulaire chez *S. elongatus* PCC 7942 (Miyagishima et al. 2005).

Comme *Synechocystis* sp. PCC 6803, au laboratoire LBBC (Laboratoire de biologie et biotechnologie des cyanobactéries) au CEA, son temps de génération est d'environ 12 heures. Les cellules ne sont pas motiles.

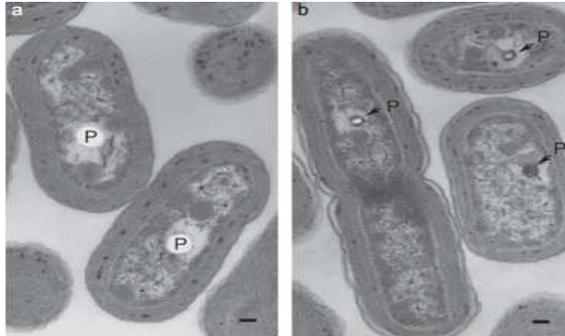


Figure 50 : Cellules de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 observées par microscopie électronique à transmission. En a, les ronds blancs notés P représentent l'emplacement des polyphosphates perdus durant la coupe ultra-mince. En b, les ronds noirs représentent les polyphosphates. Images tirées de (Seki et al. 2014).

B. Choix des gènes *ccyA* étudiés

Quatre versions différentes du gène *ccyA* (provenant de *Gloeomargarita lithophora*, *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701, *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312) ont été choisies pour être introduites dans les deux souches modèles. Ces quatre gènes ont été retenus d'après différents critères (Tableau 7, ci-dessous) afin de représenter et d'étudier au maximum les variabilités entre les protéines Calcyanine, et les différents phénotypes liés à la formation de CaCO_3 .

Deux versions de la protéine Calcyanine sont ainsi représentées : celle de *Gloeomargarita lithophora* qui possède un N-ter inconnu nommé x et celles de *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 qui possèdent un domaine N-ter annoté HMA-like.

Les deux types de localisation cellulaire des iACC sont aussi représentés d'une part par *Gloeomargarita lithophora* et *Cyanothece* sp. PCC 7425 qui forment les iACC réparties dans le cytoplasme des cellules (Benzerara et al. 2014) et d'autre part par les souches *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 qui forment des iACC réparties aux pôles et au septum (Tableau 7, ci-dessous).

Concernant l'incorporation de calcium, *Gloeomargarita lithophora*, *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 font partie des souches incorporant le plus de calcium d'après (De Wever et al. 2019). Pour *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701, aucune donnée n'est disponible.

Concernant l'incorporation d'autres alcalino-terreux, comme le baryum (Ba), le strontium (Sr) et le radium (Ra), *Gloeomargarita lithophora* est la seule qui incorpore préférentiellement le Ba, le Sr et le Ra. *Cyanothece* sp. PCC 7425 incorpore elle aussi Ba et Sr mais seulement lorsque ces éléments sont à une concentration comparable à celle du Ca (Cam

et al. 2016). Pour les souches *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 ces données sont inconnues.

Enfin, la croissance de *Gloeomargarita lithophora* et de *Cyanothece* sp. PCC 7425 est fortement diminuée lorsque les souches sont cultivées dans du BG11 contenant 50 μM de Ca, contrairement à celles cultivées dans du BG11 contenant 250 μM de Ca. En revanche, peu de différences sont observées entre les cultures de la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312 avec 50 μM de Ca ou 250 μM de Ca. Aucune donnée n'est disponible pour *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701.

Tableau 7 : Variabilité du domaine N-ter de la Calcyanine et du phénotype de biominéralisation du CaCO_3 .

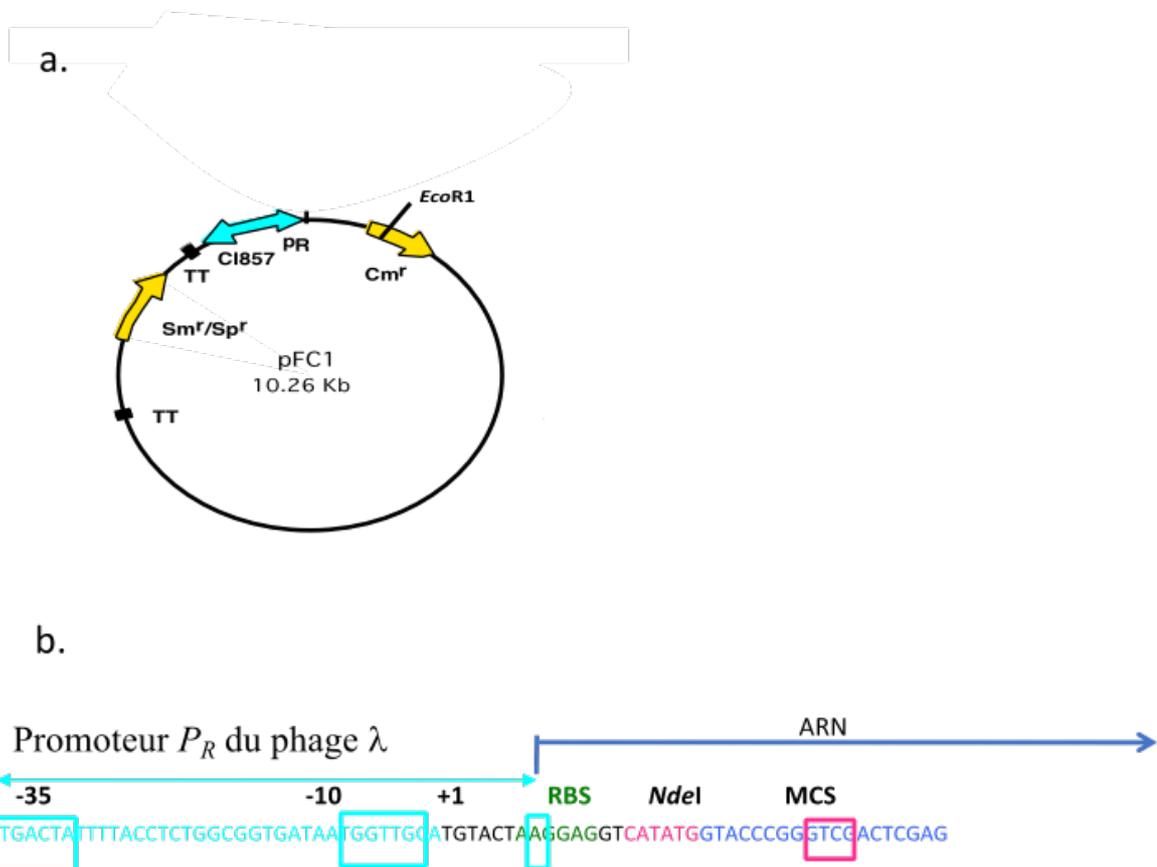
	Calcyanine	localisation des iACC	incorporation de Ca	incorporation préférentielle du Ba, Sr, Ra	diminution de la croissance avec 50 μM de Ca
<i>Gloeomargarita lithophora</i>	X-(Gly-Zip) ₃	réparties	forte	oui	oui
<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	HMA-like—(Gly-Zip) ₃	réparties	forte	non	oui
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312	HMA-like—(Gly-Zip) ₃	aux pôles et au septum	forte	donnée inconnue	non
<i>Synechococcus calcipolaris</i> sp. PCC 11701	HMA-like—(Gly-Zip) ₃	aux pôles et au septum	donnée inconnue	donnée inconnue	donnée inconnue

Les informations sont tirées de (Couradeau et al. 2012; Benzerara et al. 2014; Cam et al. 2018; De Wever et al. 2019; Mehta et al. 2019).

II. Construction des plasmides d'expression et introduction dans les souches modèles

Les gènes *ccyA* ont d'abord été clonés dans un vecteur d'expression pFC1. Celui-ci a été construit au LBBC : c'est un vecteur à large spectre d'hôte ; il se réplique chez *E. coli* et chez diverses cyanobactéries dont *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Mermet-Bouvier et Chauvat 1994; Mermet-Bouvier et al. 1993). Le pFC1 est dérivé du RSF1010 qui comporte deux marqueurs de sélection (Sm^r/Sp^r et Cm^r). Deux versions de ce plasmide sont disponibles : le pFC1 (pT) et le pFC1 ΔcI857 (pC). Le pT possède une plateforme qui permet l'expression thermorégulée du gène qu'on y clone. Celui-ci consiste en un

promoteur fort dérivé du bactériophage lambda (P_R) et en un site opérateur sur lequel peut se fixer un répresseur thermolabile codé par un gène adjacent (cI_{857}). Un site *NdeI* unique (5'-CA/TATG-3') présent à proximité immédiate du promoteur P_R permet de cloner les ORF des gènes d'intérêt en phase avec ce promoteur fort (voir Figure 51). A 30°C, le répresseur bloque complètement l'activité du promoteur et la protéine étudiée n'est pas produite. A partir de 33°C, le répresseur commence à être dénaturé, ce qui permet la biosynthèse de la protéine analysée. Celle-ci s'accumule alors de façon proportionnelle à la température, jusqu'à devenir l'une des protéines majoritaires des cellules cultivées à 39-40°C. Cette version pT est utilisée quand l'expression de la protéine induit une toxicité dans la souche. (Mermet Bouvier et al., 1994) (Figure 51). Le pFC1 ΔcI_{857} (pC) correspond au plasmide pFC1 dont le gène cI_{857} , codant pour le répresseur thermosensible du P_R a été tronqué (Veaudor et al. 2019). Il permet une expression constitutive forte du gène cloné. Il est utilisé lorsque la protéine exprimée n'induit pas de toxicité chez la souche. Le clonage dans le pT ou le pC se fait via les sites uniques de restriction *NdeI* et *EcoR1*. A la suite du clonage, les transformants sont Sm^r/Sp^r et Cm^s



L'expression de ce gène est alors gouvernée par le promoteur fort, *pR*, qui est lui-même contrôlé par le répresseur thermosensible codé par le gène *cI₈₅₇* (en turquoise). RBS : ribosome binding site.

Les séquences des gènes *ccyA* provenant de *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 (appelé *ccyA_{S.11701}*) et de *Gloeomargarita lithophora* (appelé *ccyA_{Gloeo}*), avaient préalablement été clonées dans un vecteur de clonage pUC-SP, flanquées entre les sites de restriction *Nde*1 et *Eco*R1 (Figure 52). Les séquences ont été optimisées avec le biais de codon de *Synechocystis* sp. PCC 6803 qui est similaire à celui de *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

Les gènes de *Cyanothece* sp. PCC 7425 (*ccyA_{C.7425}*) et *Synechococcus* sp. PCC 6312 (*ccyA_{S.6312}*) ont été amplifiés par PCR et des sites *Nde*1/*Eco*R1 ont été ajoutés de part et d'autre du gène (Figure 52) ; la séquence du gène n'est donc pas optimisée pour l'expression dans *Synechocystis* sp. PCC 6803 ni *S. elongatus* PCC 7942. Mais l'expression est malgré tout possible, et il a été démontré au laboratoire LBBC que des gènes, dont le biais de codon pour la traduction a été optimisé pour *Synechocystis* sp. PCC 6803, s'exprimaient dans *Cyanothece* sp. PCC 7425 (Chenebault et al. 2020).

Tous les gènes *ccyA* ont été clonés dans le pT et le pC et introduits dans les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Tableau 8). Seuls les mutants dont le *ccyA* a été cloné dans la version pC ont été analysés pendant ma thèse.

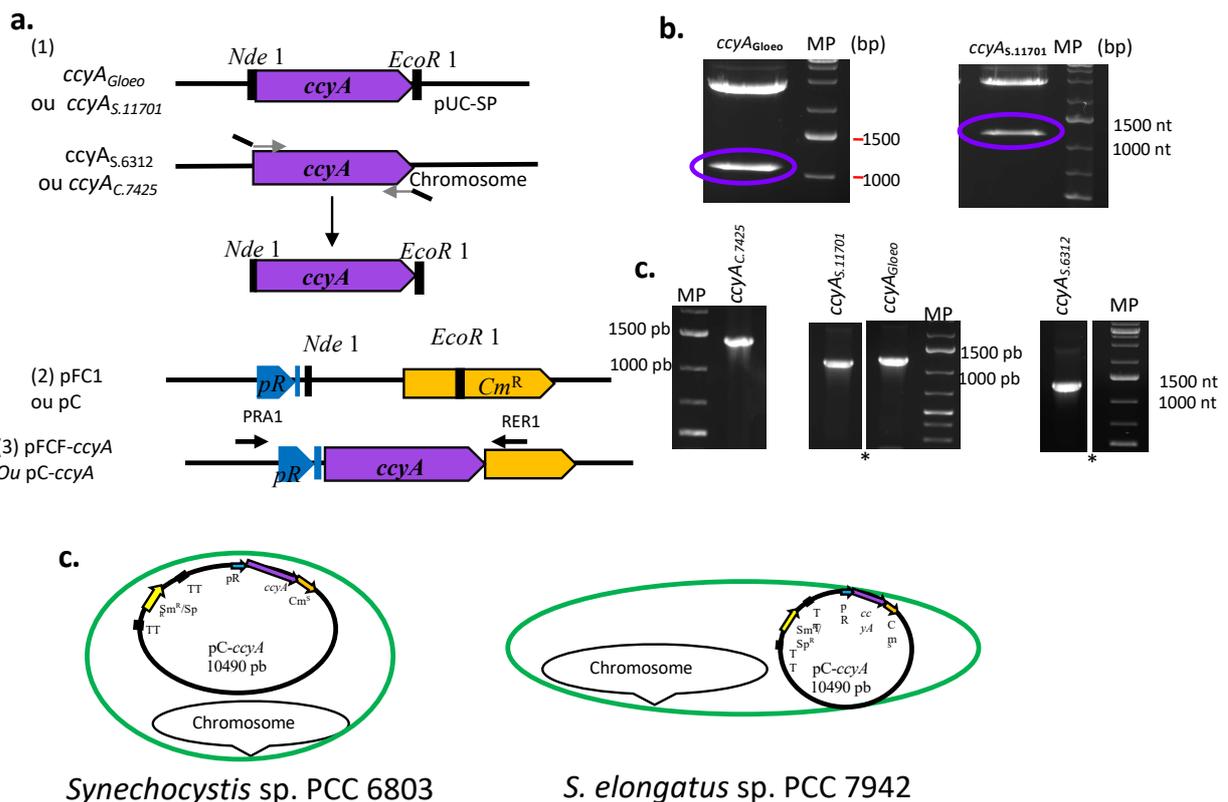


Figure 52 : a. Construction de la cassette d'expression des gènes *ccyA* provenant de diverses cyanobactéries formant des iACC.

(1) Les gènes *ccyA* provenant de *Gloeomargarita lithophora* (*ccyA_{Gloeo}*) ou de *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 (*ccyA_{S.11701}*) flanqués par les sites de restriction *Nde*1 (5'-CATATG-3') et *Eco*R1 (5'-GATATC-3') représentés par des rectangles noirs ont été synthétisés et clonés dans le plasmide de clonage pUC-SP.

Les gènes *ccyA* de *Cyanothece* sp. PCC 7425 (*ccyA_{C.7425}*) et de *Synechococcus* sp. PCC 6312 (*ccyA_{S.6312}*) ont été amplifiés par PCR à partir de leur ADN génomique en utilisant des amorces spécifiques (flèches grises), permettant l'introduction des sites *Nde*I et *Eco*R1 (7425_ *Nde*I_Fw et 7425_ *Eco*R1_Rv ; 6312_gene_ *Nde*I_Fw et 6312_gene_ *Eco*R1_Rv). Les gènes *ccyA* de couleur violette sont représentés par une flèche et le sens de la flèche indique le sens de transcription du gène. (2) Les plasmides d'expression, l'un constitutif (pFC1Δ*cI*₈₅₇=pC) et l'autre thermorégulé (pFC1=pT), ont été digérés par les enzymes de restriction *Nde*I et *Eco*R1. Le site de restriction *Nde*I se trouve juste après le promoteur (*pR*) et le site de fixation au ribosome (RBS). Il contient le codon initiateur de la transcription (5'-CATATG-3') du gène cloné. Le site de restriction *Eco*R1 se situe dans la séquence du gène conférant la résistance au chloramphénicol (Cm^r) représenté par une flèche orange ; le sens de la flèche indique le sens de transcription du gène. (3) Les gènes *ccyA* sont clonés entre les sites *Nde*I et *Eco*R1 des plasmides d'expression. Les flèches PRA1 et RER1 représentent les amorces utilisées pour vérifier par PCR si le gène est cloné dans le plasmide d'expression lors du séquençage.

b. Résultats après digestion par *Nde*I et *Eco*R1 des gènes *ccyA_{Gloeo}* et *ccyA_{S.11701}* clonés dans les plasmides pUC-18, la taille des gènes est : *ccyA_{Gloeo}* 1234 pb et *ccyA_{S.11701}* 1309 pb.

c. Résultats des PCR montrant la présence des gènes *ccyA* clonés dans les plasmides d'expression pC.

* Indique que deux images appartiennent au même gel.

Les tailles attendues des amplicons avec les amorces PRAR et RER1 sont : *ccyA_{Gloeo}* 1234 pb ; *ccyA_{S.11701}* 1309 pb ; *ccyA_{S.6312}* 1314 pb ; *ccyA_{C.7425}* 1395 pb.

d. Schéma représentant les cyanobactéries *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 7942 dans lesquelles les plasmides d'expression pC ou pT contenant les gènes *ccyA* ont été introduits MP indique le marqueur de poids moléculaire GeneRuler 1 Kb Plus DNA (Thermo Scientific).

Tableau 8 : Récapitulatif des gènes *ccyA* introduits et exprimés dans deux cyanobactéries ne formant pas d'iACC : *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus elongatus* PCC 7942

	<i>ccyA</i> provenant de :			
	<i>G. lithophora</i>	<i>S. calcipolaris</i> PCC 11701	<i>C. PCC</i> 7425	<i>S. PCC 6312</i>
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	oui	oui	oui	Pas de mutant
<i>S. elongatus</i> PCC 7942	oui	oui	oui	oui

III. Analyse de l'effet de l'expression du *ccyA* sur la croissance en présence de diverses concentrations en calcium

Dans ce chapitre je ne présenterai pas les résultats à propos des phénotypes de tous les mutants obtenus car certains n'ont pas pu être analysés faute de temps comme par exemple le mutant S.6803 pC-*ccyA*_{C.7425}.

Pour le mutant S.7942 pC-*ccyA*_{C.7425}, seule l'observation par CEMOVIS (voir plus bas) a été faite mais aucune courbe de croissance n'a pu être réalisée.

Concernant la nomenclature, les mutants seront nommés ainsi : S.6803 WT pour la souche sauvage de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ; S.6803 pC pour la souche portant le plasmide d'expression pC (donc sans le gène *ccyA*) ; S.6803 pC-*ccyA*_{S.11701} signifie que le gène *ccyA* de *S. calcipolaris* PCC 11701 a été cloné dans le plasmide d'expression constitutif pC et introduit dans la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 où il s'exprime. Cette nomenclature est utilisée pour les autres gènes *ccyA* et toutes les souches de cyanobactéries châssis manipulées (*Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus elongatus* PCC 7942).

Deux témoins ont été utilisés : la souche sauvage (WT) et la souche portant le pC qui est un contrôle nécessaire afin de s'assurer que le plasmide seul n'induit pas de phénotype.

A. Comparaison de la croissance des mutants et des souches sauvages dans des milieux de croissance contenant différentes concentrations en calcium

1. Croissance de la souche sauvage et des mutants de *Synechocystis* sp. PCC 6803 exprimant *ccyA*

Une étude précédente (De Wever et al. 2019) a montré qu'une certaine concentration initiale dans le milieu de culture de calcium est indispensable à la croissance de certaines souches formant des iACC comme *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Gloeomargarita lithophora*. En effet, si la concentration en calcium est diminuée de cinq fois (50 μ M) dans le BG11 par rapport à la concentration habituelle du BG11 (250 μ M), on observe un effet négatif drastique sur la croissance de ces souches. Par contre cela a peu d'impact sur la croissance des souches *Synechococcus* sp. PCC 6312, et les deux souches ne formant pas d'iACC comme *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus elongatus* PCC 7942 dont la croissance semble moins dépendante de la concentration en calcium.

Je me suis donc demandée si l'expression des gènes *ccyA* dans *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *S. elongatus* PCC 7942 avait ou non un impact sur leur croissance en BG11 contenant 50 μ M ou 250 μ M de calcium.

Quatre souches de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ont été étudiées et cultivées dans du BG11 contenant 250 μ M ou 50 μ M de Ca : la souche sauvage (wt), le mutant pC (témoin), le mutant pC-*ccyA*_{S.11701} et le mutant pC-*ccyA*_{G10eo}.

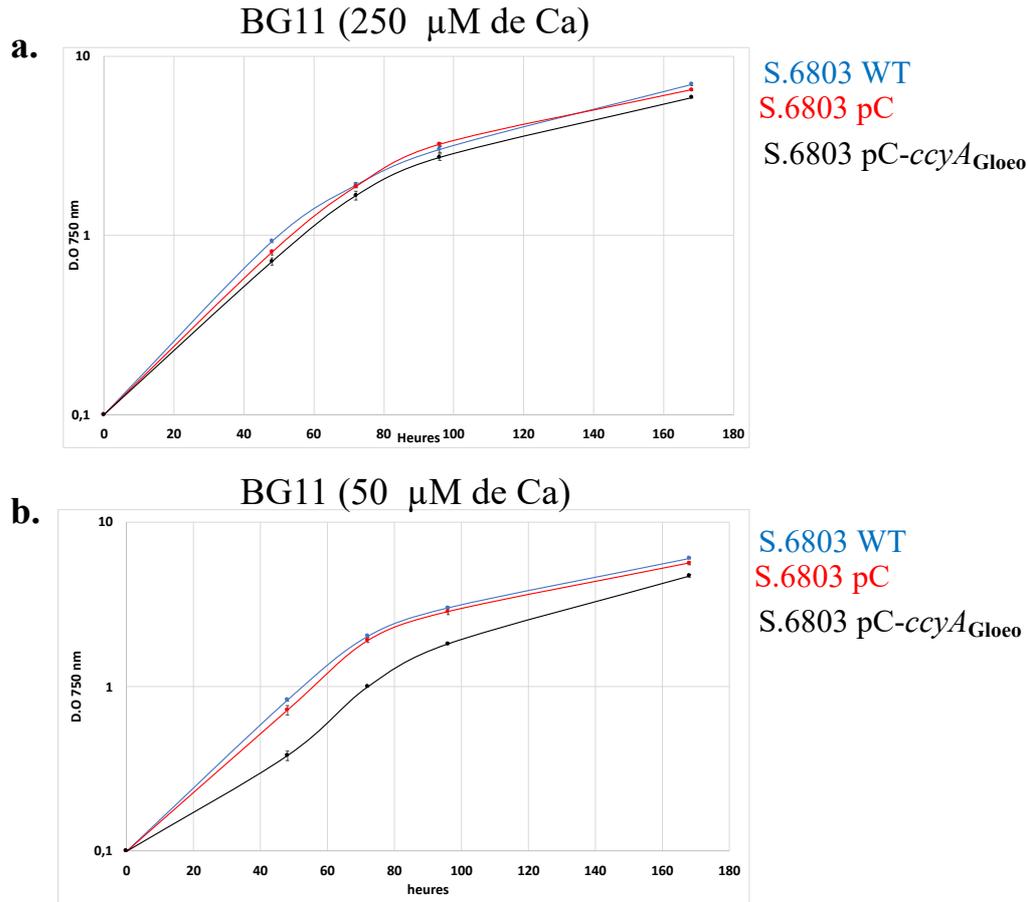


Figure 53 : Effet de l'expression de *ccyA*_{Gloeo} sur la croissance de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en fonction de la concentration en calcium. Courbes de croissance des souches de *Synechocystis* sp. PCC 6803 sauvage (WT) ou possédant les plasmides pC ou pC-*ccyA*_{Gloeo} cultivées dans du BG11 en présence de 250 μM (a) ou 50 μM (b) de calcium, à 30°C, avec agitation, sous un éclairage de 2500 lux. Les barres d'erreur représentent les écart-types calculés en fonction des variations entre les triplicats.

D'après les courbes de croissance réalisées à partir de souches cultivées dans du BG11 contenant 250 μM de Ca (Figure 53), des temps de génération similaires peuvent être observés entre les 3 souches (Tableau 9, ci-dessous). Un léger ralentissement de la croissance peut être observé à l'entrée de la phase de ralentissement chez le mutant S.6803 pC-*ccyA*_{Gloeo}. A l'inverse, des différences de temps de génération plus importantes peuvent être observées entre le mutant S.6803 pC-*ccyA*_{Gloeo} et les deux contrôles S.6803 wt et S.6803 pC lorsqu'ils sont cultivés avec 50 μM de Ca (Figure 53 et Tableau 9, ci-dessous).

Des temps de génération similaires sont observés entre les souches S.6803 wt et S.6803 pC cultivées avec 250 μM de Ca ou 50 μM de Ca pendant la phase exponentielle, puis un ralentissement de la croissance est observé lorsqu'elles rentrent en phase stationnaire lorsqu'elles sont cultivées dans du BG11 à 50 μM de Ca.

Tableau 9 : **Temps de génération des souches S.6803 wt, S.6803 pC et S.6803 pC-*ccyA*_{Gloeo}**

	S.6803 wt	S.6803 pC	S.6803 pC- <i>ccyA</i> _{Gloeo}
BG11 + 250 μM de Ca	15 h	16 h	17 h
BG11 + 50 μM de Ca	15,7 h	16,8 h	25 h

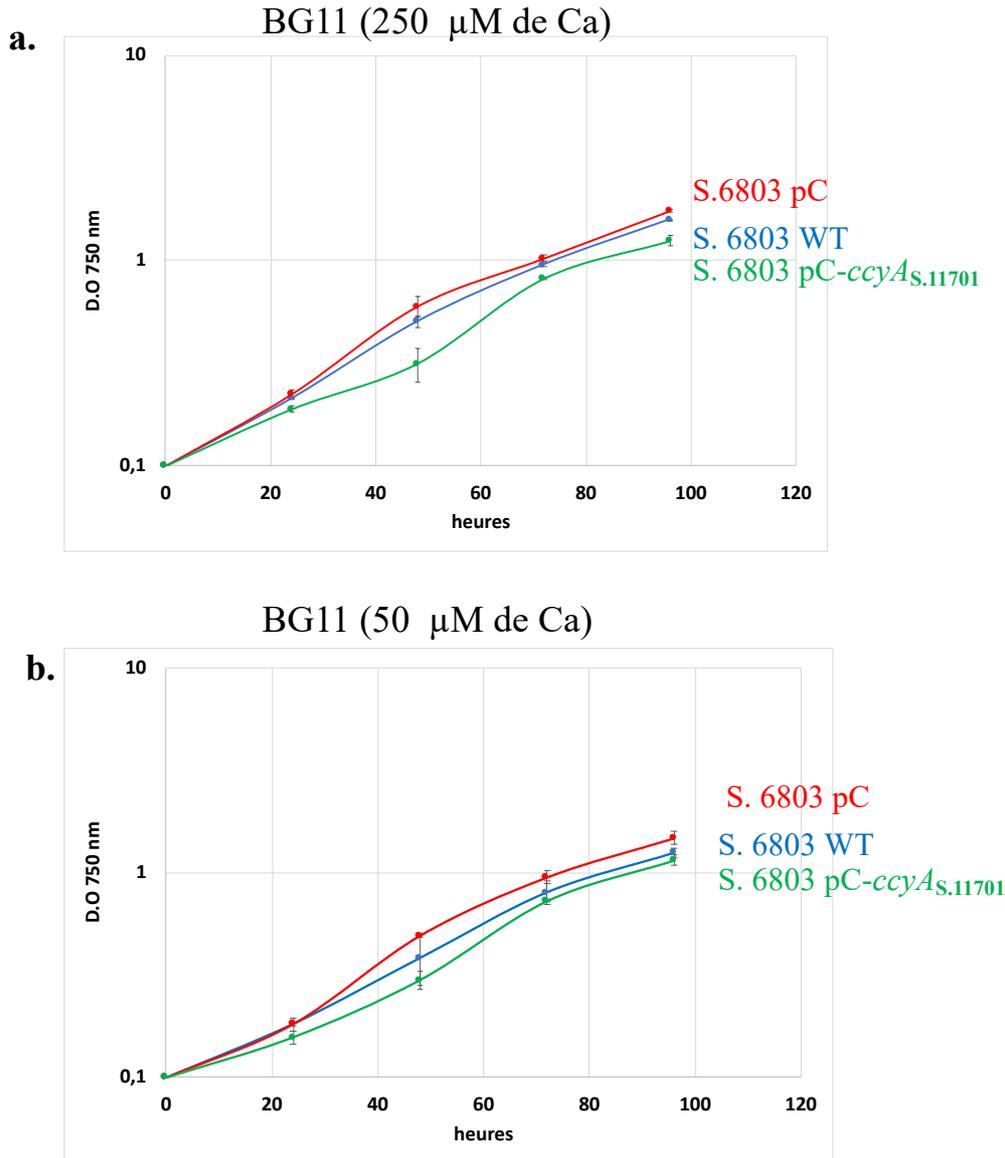


Figure 54 : Effet de l'expression de *ccyA*_{S.11701} sur la croissance de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en fonction de la concentration en calcium.

Courbes de croissance de la souche S.6803 sauvage (WT) et des souches mutantes de *Synechocystis* sp. PCC 6803 portant le pC, ou le pC-*ccyA*_{S.11701} cultivées en présence de 250 μM (a) ou 50 μM de calcium (b). Toutes les cultures sont réalisées à 30°C, avec agitation sous un éclairage de 2500 lux. La D.O initiale 750 nm est de 0,1. Les barres d'erreur représentent les écart-types calculés en fonction des variations entre les duplicats.

D'après les courbes de croissance réalisées à partir de cultures cultivées dans du BG11 contenant 250 μM de Ca (Figure 54), des temps de génération similaires peuvent être observés entre les 3 souches (Tableau 10, ci-dessous). Dans la condition de culture dans du BG11 avec 50 μM de Ca, des temps de génération similaires peuvent aussi être observés (Figure 54 et Tableau 10, ci-dessous).

Tableau 10 : Temps de génération des souches S.6803 wt, S.6803 pC et S.6803 pC-*ccyAs.11701*

	S.6803 wt	S.6803 pC	S.6803 pC- <i>ccyAs.11701</i>
BG11 + 250 μ M de Ca	24 h	22 h	21 h
BG11 + 50 μ M de Ca	22 h	22,5 h	21 h

Une seconde et unique expérience a été réalisée pour reproduire l'expérience de De Wever (2019) consistant à cultiver les souches à 50 μ M et à ajouter ensuite 200 μ M pour savoir si la croissance en serait impactée.

Les résultats de cette expérience ont été divisés en deux figures, montrant dans la figure 55, les croissances des souches (S.6803 wt, S.6803 pC et S.6803 pC-*ccyA_{Gloeo}*) cultivées avec 50 μ M de Ca, et dans la figure 7, les mêmes courbes mais avec l'ajout d'une courbe en plus (en gris) qui montre la croissance du mutant S.6803 pC-*ccyA_{Gloeo}* auquel 200 μ M de Ca ont été ajoutés, après 48 h de culture.

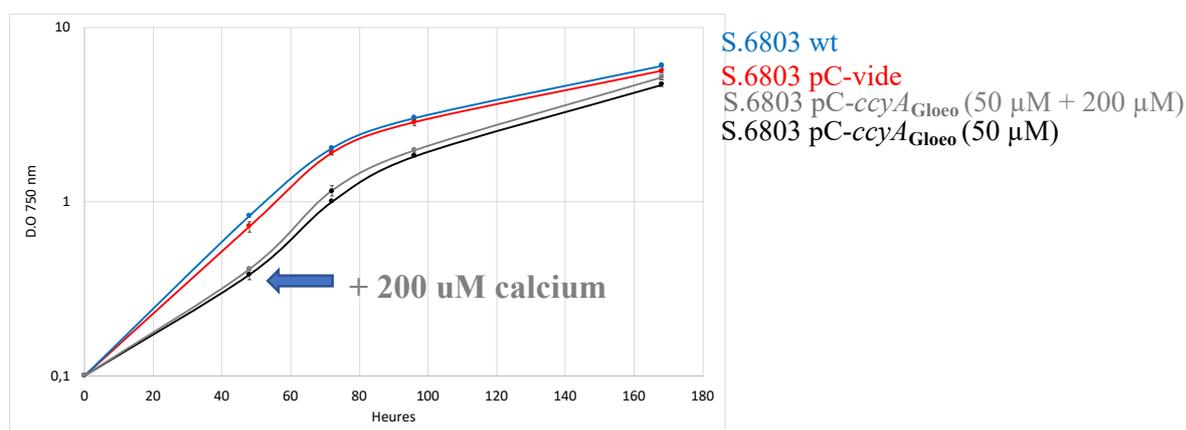


Figure 55 : Courbes de croissance de *Synechocystis* sp. PCC 6803 wt, S.6803 pC, S.6803 pC-*ccyA_{Gloeo}* (courbe noire) cultivées avec 50 μ M. Après 48 h de culture, 200 μ M Ca ont été ajoutés dans les cultures du mutant S.6803 pC-*ccyA_{Gloeo}* (courbe grise). Les barres d'erreur représentent les écart-types calculés en fonction des variations entre les triplicats.

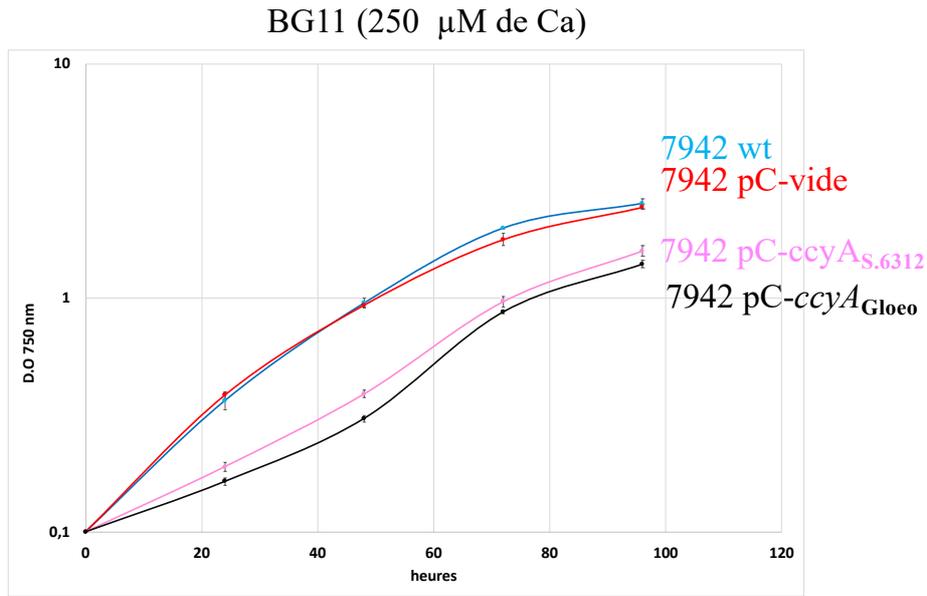
Ces résultats préliminaires montrent que la croissance du mutant 6803 pC-*ccyA_{Gloeo}* augmente lorsque du calcium est ajouté dans la culture. Le temps de génération de la souche mutante cultivée avec 50 μ M de Ca pendant les 48 premières heures à laquelle ont ensuite été ajoutés

200 μM de calcium est de 23 heures (alors qu'elle est de 25 heures lorsque la souche est cultivée avec 50 μM de Ca) (Figure 53, Tableau 9). Une légère augmentation du temps de génération est observée en phase exponentielle ; cette différence s'accroît au moment du passage en phase de ralentissement.

2. Croissance de la souche sauvage et des mutants de *S. elongatus* PCC 7942 exprimant *ccyA*

Cinq souches ont été analysées chez *S. elongatus* PCC 7942, S.7942 wt, S.7942 pC, S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312}, S.7942 pC-*ccyA*_{S.11701} et S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo}.

a.



b.

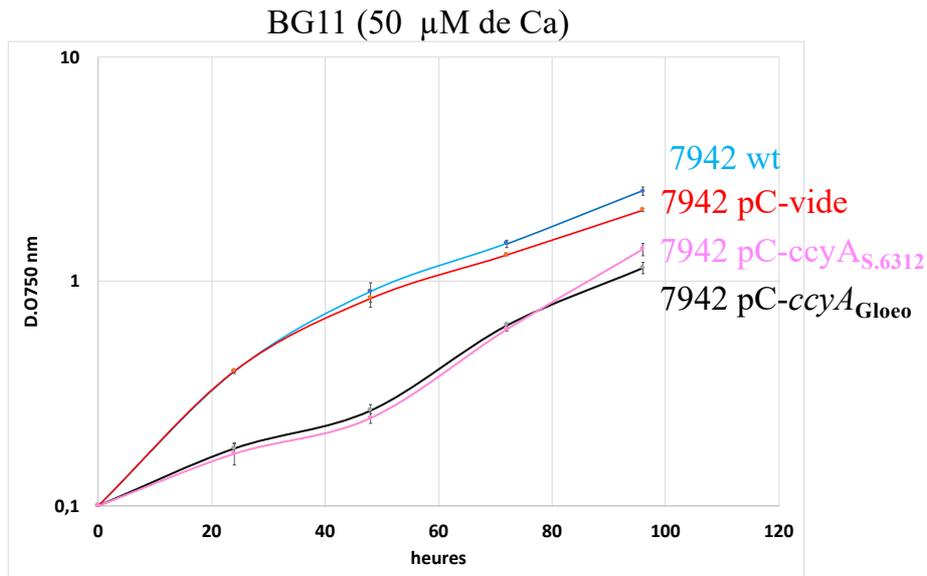


Figure 56 : Courbes de croissance de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wt, S.7942 pC, S.7942 pC-*ccyAs.6312* et S.7942 pC-*ccyAGloeo* cultivées dans du BG11 liquide contenant 250 μM (a) ou 50 μM (b) de calcium. Les barres d'erreur représentent les écart-types calculés en fonction des variations entre les triplicats.

Dans le BG11 avec 250 μM de Ca, l'expression des gènes *ccyAs.6312* et *ccyAGloeo* impacte la croissance de la souche *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Tableau 11, ci-dessous)

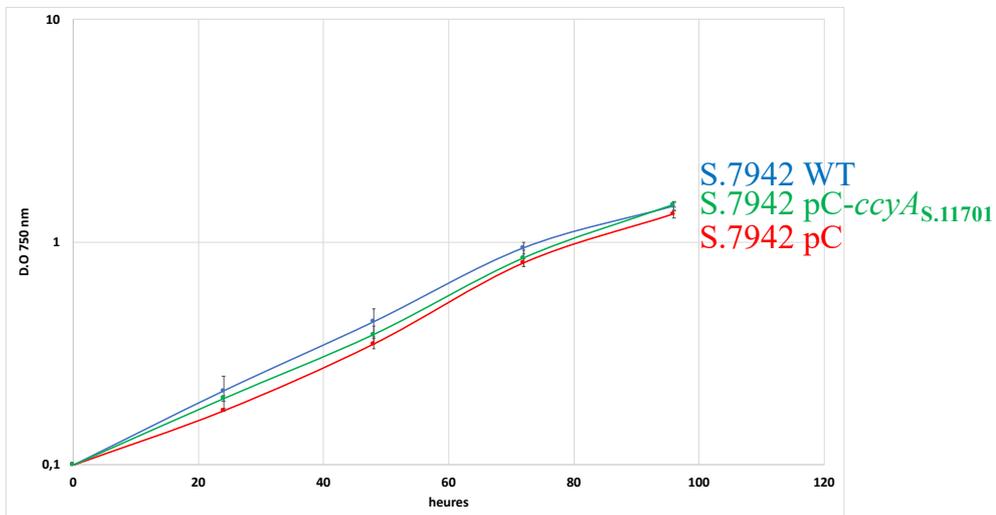
Dans le BG11 avec 50 μM de Ca, des temps de génération similaires sont observés entre les souches S.7942 wt, S.7942-pC mais ils diminuent chez les mutants S.7942 pC-*ccyAs.6312* et S.7942 pC-*ccyAGloeo* (Tableau 11, ci-dessous).

Entre les mutants S.7942 pC-*ccyAs.6312* et S.7942 pC-*ccyAGloeo* cultivés avec 250 μM de Ca et 50 μM de Ca, un ralentissement est observé pendant la phase exponentielle (entre 24 h et 72 h de culture), lorsque les souches sont cultivées avec 50 μM de Ca (Tableau 11, ci-dessous).

Tableau 11 : Temps de génération des souches S.7942 wt, S.7942 pC et S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312} et S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo}

	S.7942 wt	S.7942 pC	S.7942 pC- <i>ccyA</i> _{S.6312}	S.7942 pC- <i>ccyA</i> _{Gloeo}
BG11 + 250 μ M de Ca	17,5 h	18 h	24 h	25 h
BG11 + 50 μ M de Ca	19 h	18 h	26 h	27 h

a. BG11 (250 μ M de Ca)



b. BG11 (50 μ M de Ca)

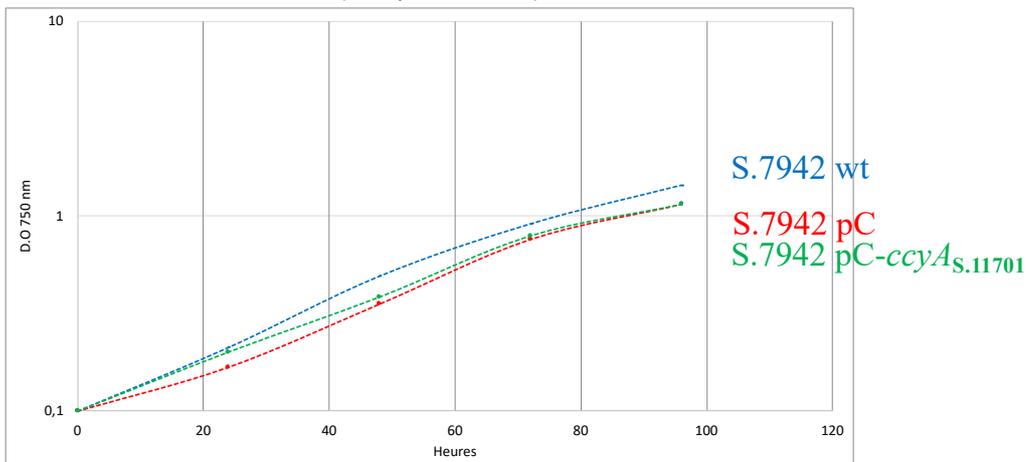


Figure 57 : Courbes de croissance de *S. elongatus* PCC 7942 wt, S.7942 pC, S.7942 pC-*ccyA*_{S.11701} cultivées dans du BG11 liquide contenant 250 μ M (a) ou 50 μ M (b) de calcium, à 30°C avec agitation, sous un éclairage de 2500 lux. Les barres d'erreur représentent les écart-types calculés en fonction des variations entre les duplicats.

Le mutant S.7942 pC-*ccyAs.11701* montre une même croissance que les souches S.7942 wt et S.7942 pC lorsqu'il est cultivé avec 250 μ M ou 50 μ M de Ca (Figure 57 et Tableau 12, ci-dessous). Cependant, la hauteur des plateaux des courbes des deux mutants S.7942 pC et S.7942 pC-*ccyAs.11701* est plus faible que la hauteur du plateau de la souche S.7942 wt (à 96 h, la D.O des deux mutants atteint 1,2 de D.O. alors que la culture de la souche S.7942 wt atteint une D.O de 2).

Tableau 12 : Temps de génération des souches S.7942 wt, S.7942 pC et S.7942 pC-*ccyAs.11701*

	S.7942 wt	S.7942 pC	S.7942 pC- <i>ccyAs.11701</i>
BG11 + 250 μ M de Ca	22 h	21,5 h	21 h
BG11 + 50 μ M de Ca	22 h	21 h	21 h

IV. L'expression de *ccyA* influence-t-elle l'incorporation du calcium et sa distribution ?

L'objectif ici est de tester si les mutants de *Synechocystis* et *Synechococcus* exprimant les différentes versions du gène *ccyA* incorporent plus de calcium que les souches wt et pC. Nous avons utilisé deux approches pour tenter de mesurer l'incorporation de calcium : l'une à une échelle globale et utilisant l'ICP-AES. L'autre à l'échelle de la cellule unique, utilisant la microscopie.

A. Quantification du calcium incorporé par les cellules par ICP-AES

1. Suivi du calcium solution avec les mutants *ccyA*_{Gloeo} et *ccyA*_{S.11701} chez *Synechocystis* sp. PCC 6803

Les cultures, réalisées dans du BG11 avec 250 µM de Ca, ont été suivies pendant 96 heures. La D.O à 750 nm, le pH du milieu et la diminution de la concentration de Ca en solution ont été mesurés.

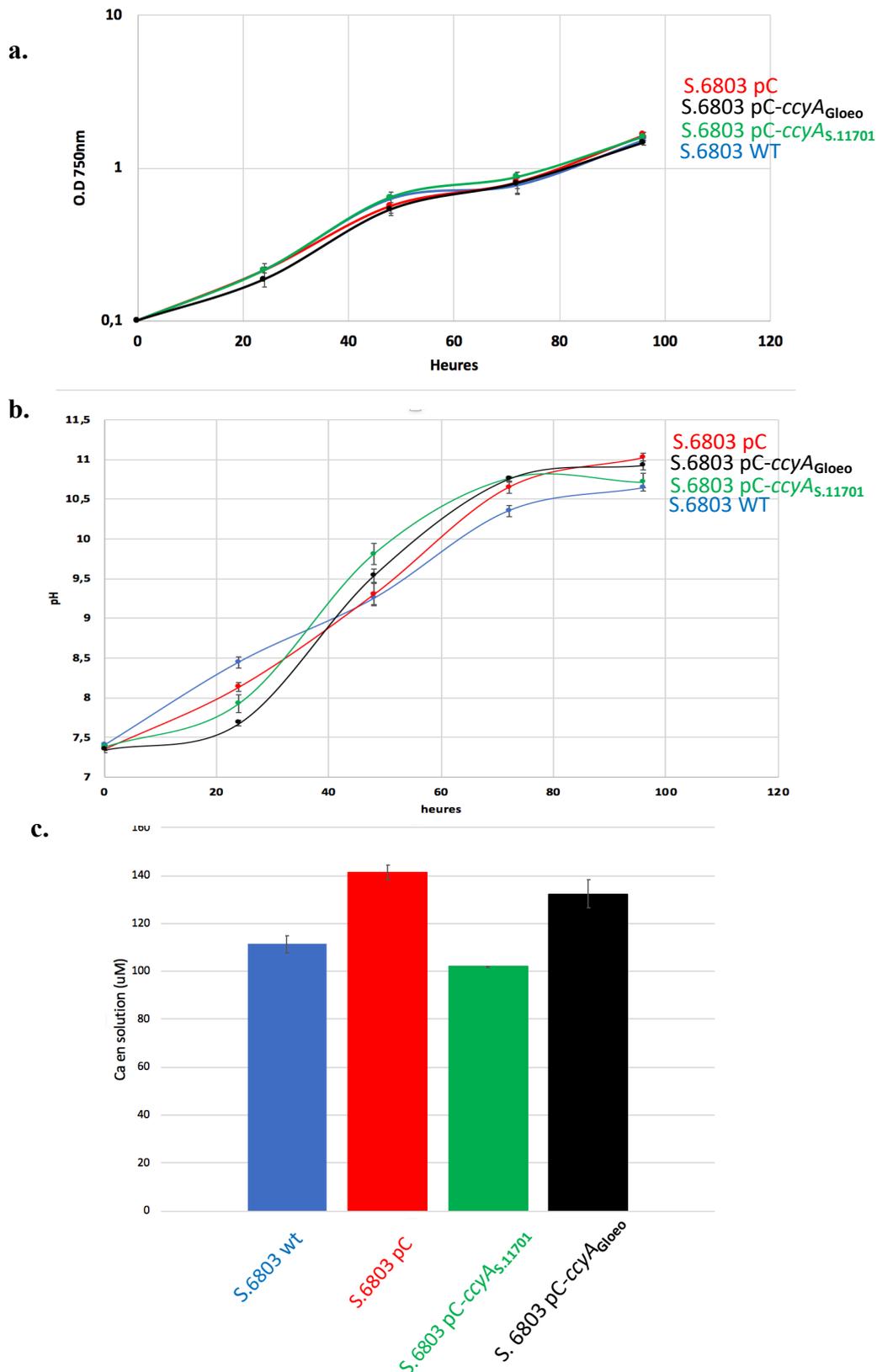


Figure 58 : courbes de croissance, suivi pH et suivi de la diminution du calcium dans la solution des souches S.6803 wt, S.6803 pC, S.6803 pC-*ccyA*_{S.11701} et S.6803 pC-*ccyA*_{Gloeo}.

a. courbes de croissance et b. courbes de pH des souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 wt, S. 6803 pC, S.6803 pC-*ccyA*_{S.11701} et S.6803 pC-*ccyA*_{Gloeo}, cultivées dans du BG11 + 250 µM de Ca. c. résultats ICP-

AES, montrant le calcium en solution après 96h de culture. Les barres d'erreur représentent les écarts-types calculés en fonction des variations entre les duplicats.

D'après les courbes de densité optique, les quatre souches montrent une même croissance (le temps de génération des cultures se situe autour de 25 heures).

Le pH des solutions de culture des deux contrôles (wt et pC) évolue de la même manière temporellement.

Les résultats d'ICP-AES ont été obtenus en suivant le Ca en solution en faisant initialement l'hypothèse que la diminution serait liée à l'incorporation par les cellules. Ces résultats montrent que dans les cultures wt et pC il reste en solution 140 μM et 130 μM de calcium sur les 250 μM de Ca initialement ajoutés. Concernant les cultures des mutants S.6803 pC-*ccyA*_{S.11701} et S.6803 pC-*ccyA*_{Gloeo}, il reste respectivement 110 μM et 130 μM de calcium en solution. Cette diminution du calcium en solution peut être due (1) à l'incorporation du calcium par les cellules et/ou (2) par la précipitation du calcium avec du phosphate et/ou du carbonate due au fort pH atteint en fin de culture (valeur de 11).

2. Suivi du calcium en solution avec les mutants *ccyA*_{Gloeo}, *ccyA*_{S.11701} et *ccyA*_{S.6312} chez *S. elongatus* PCC 7942

Les cultures, réalisées dans du BG11 avec 250 μM de Ca, ont été suivies pendant 240 heures. La D.O à 750 nm, le pH du milieu et la diminution de la concentration de Ca en solution ont été mesurés (Figure 59).

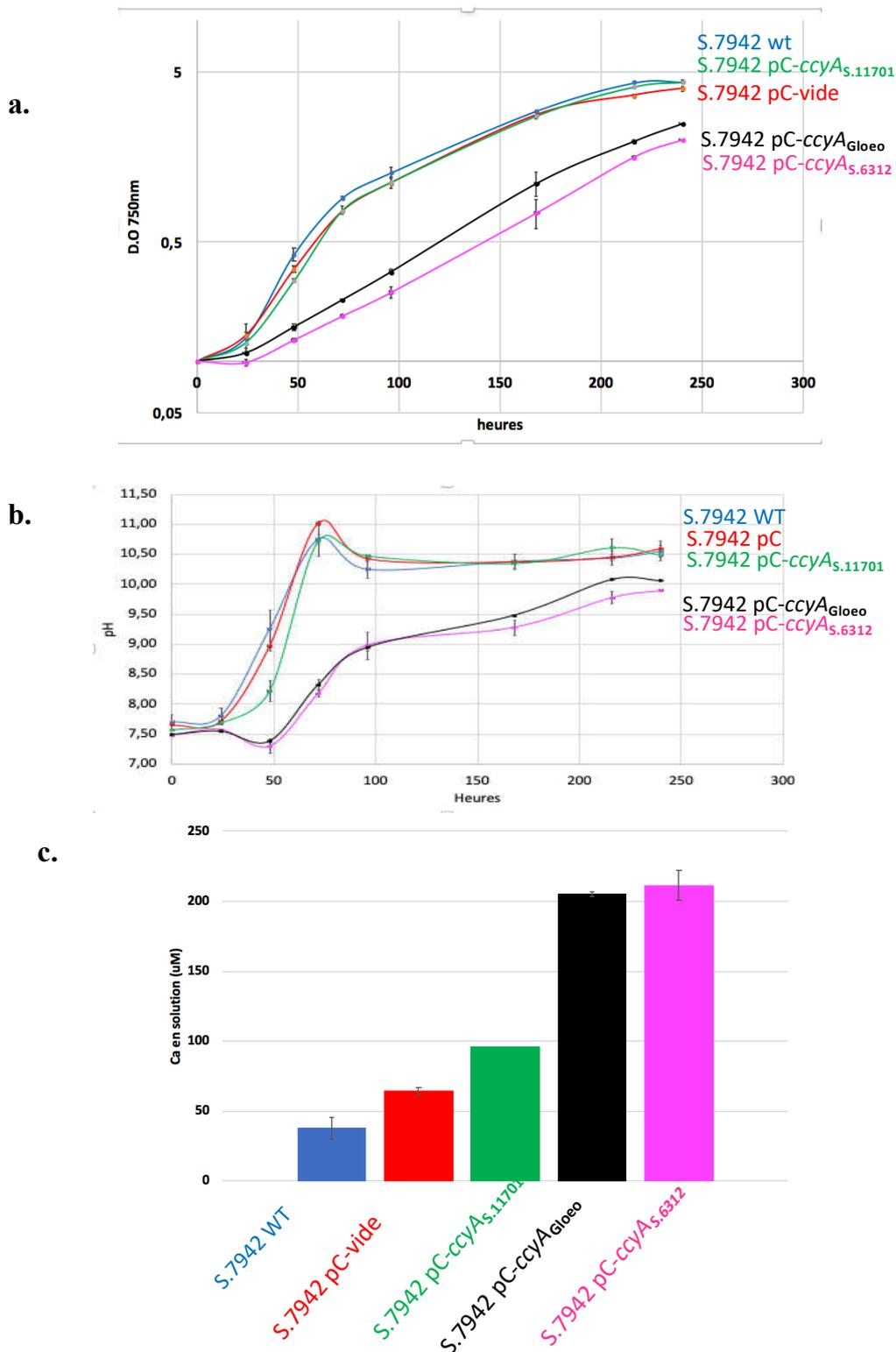


Figure 59 : Courbes de croissance, suivi pH et mesure de la diminution de la concentration en Ca dans les souches S. 7942 wt, S. 7942 pC, S.7942 pC-*ccyA*_{S11701}, S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} et S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312}.

(a.) Courbes de croissances et courbes de pH (b.) des souches *Synechococcus* PCC 7942 WT, S.7942 pC, S.7942 pC-*ccyA*_{S11701}, S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} et S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312} cultivées dans du BG11 contenant 250 µM de Ca. (c.) résultats ICP-AES, montrant l'incorporation du calcium après 96h de culture (voir a.) La D.O._{750 nm} initiale est de 0,1. Les barres d'erreur représentent les écart-types calculés en fonction des variations entre les duplicats.

D'après les courbes de densité optique, les souches *S. elongatus* wt, pC et pC-*ccyAs*.11701 ont une même croissance (leur temps de génération est d'environ 21 h) alors que les deux mutants pC-*ccyA*G10e0 et pC-*ccyAs*.6312 montrent une croissance ralentie (leur temps de génération est de 35 h).

Quant aux courbes de pH, des courbes similaires sont observées entre les souches *S. elongatus* wt, S.7942 pC et S.7942 pC-*ccyAs*.11701 d'un côté avec un pH de 10,5 après 240 h de culture et de l'autre côté les mutants pC-*ccyA*G10e0 et pC-*ccyAs*.6312 dont le pH final se situe aux alentours de 9,5-10,0.

D'après les résultats d'ICP-AES (ci-dessus en c.) les mêmes observations, faites avec la souche *Synechocystis*, peuvent être obtenues avec les souches *S. elongatus* wt, pC et pC-*ccyAs*.11701. Cette diminution du Ca dans la solution peut être due à l'incorporation de ce dernier par les cellules et/ou la précipitation peut être due au fort pH atteint avec les souches S.7942 wt, S.7942 pC et S.7942 pC-*ccyAs*.11701. Pour les mutants S.7942 pC-*ccyA*G10e0 et S.7942 pC-*ccyAs*.6312, après 240h, il reste dans le milieu 200 μ M de Ca. Nous ne savons pas si les 50 μ M de Ca ont été incorporés par les mutants, et/ou si le calcium a commencé à précipiter en même temps que l'augmentation du pH.

B. Observation des mutants de *Synechococcus* sp. PCC 7942 par microscopie

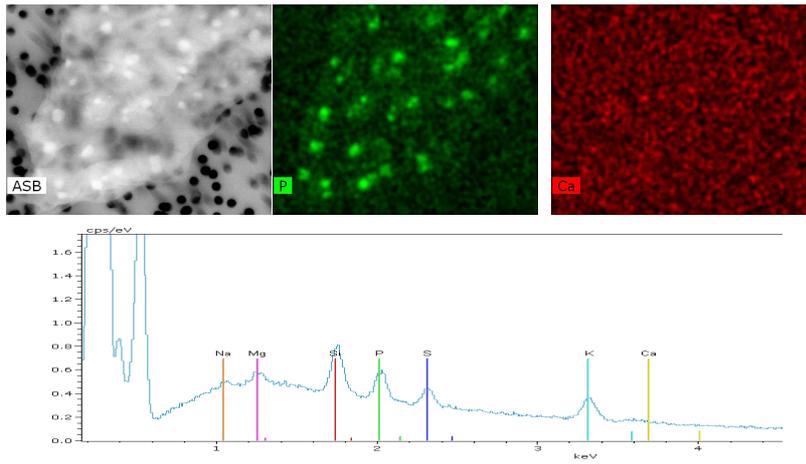
1. Microscopie électronique à balayage

Les mesures en ICP-AES nous éclairent sur la quantité de Ca soustraite à la solution. Ceci peut résulter de l'incorporation de Ca par les cellules et/ou de la précipitation de phases minérales riches en Ca extracellulaire. Il y a donc une ambiguïté. C'est pourquoi nous avons essayé de mesurer la quantité de Ca incorporée par les cellules grâce à des outils de microscopie. Les mutants de S.6803 pC, S.6803 pC-*ccyAs*.11701, pC-*ccyA*G10e0, pC-*ccyAs*.6312 ainsi que les mutants S.7942 pC, S.7942 pC-*ccyA*G10e0 et S.7942 pC-*ccyAs*.6312 ont été observés au MEB-EDXS.

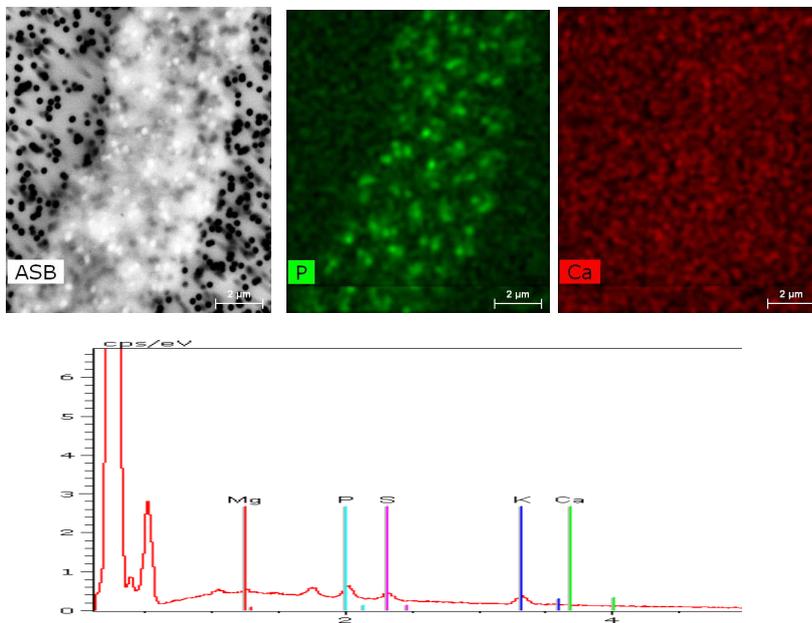
Des données hyperspectrales contenant un spectre EDXS pour chaque pixel ont été obtenues. Dans le spectre EDXS, un élément chimique a été donné à un ou à des pics caractéristiques. Nous avons vérifié qu'il n'y avait pas d'interférence entre les éléments concernés. En intégrant l'aire sous le pic, on a une semi-quantification qui nous permet de tirer des cartographies. Nous pouvons voir des spots riches en Ca. Ils sont corrélés avec des spots riches en P. L'observation du spectre montre que le pic de P est relativement élevé par rapport à celui du Ca. De plus on détecte un peu de K et de Mg. Tout cela est caractéristique de polyphosphates contenant du Ca (Rivas-Lamelo et al. 2017).

Les courbes de croissance des souches, S.6803 wt et des mutants, associées aux observations MEB sont à la figure 53, a. Pour les souches S.6803 wt, S.6803 pC-*ccyAs*.11701 et S.6803 pC-*ccyA*G10e0 cultivées avec 250 μ M de Ca, aucun spot riche en calcium n'a été observé, ni aucun phénotype particulier comparé à la souche S.6803 pC.

a.



b.



c.

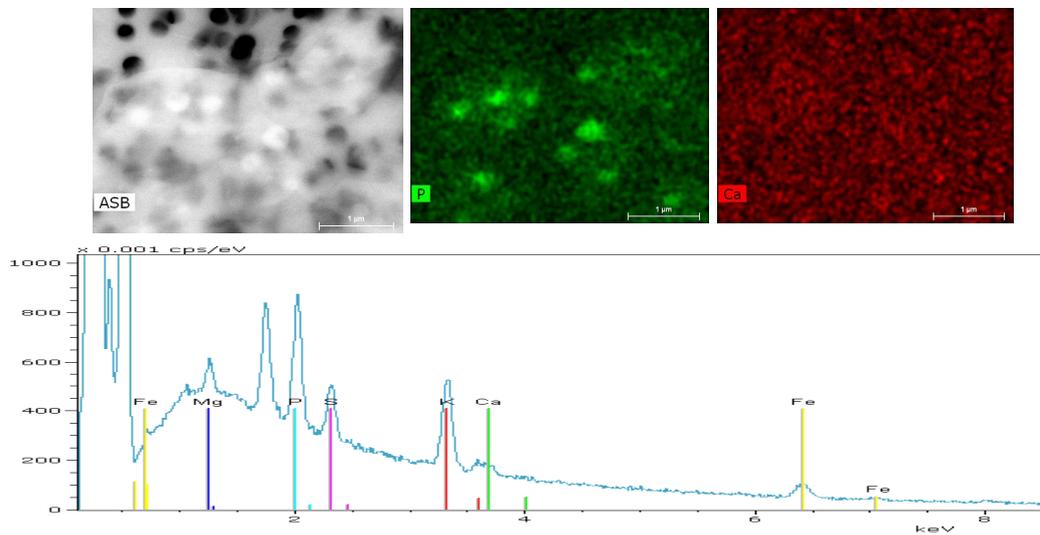
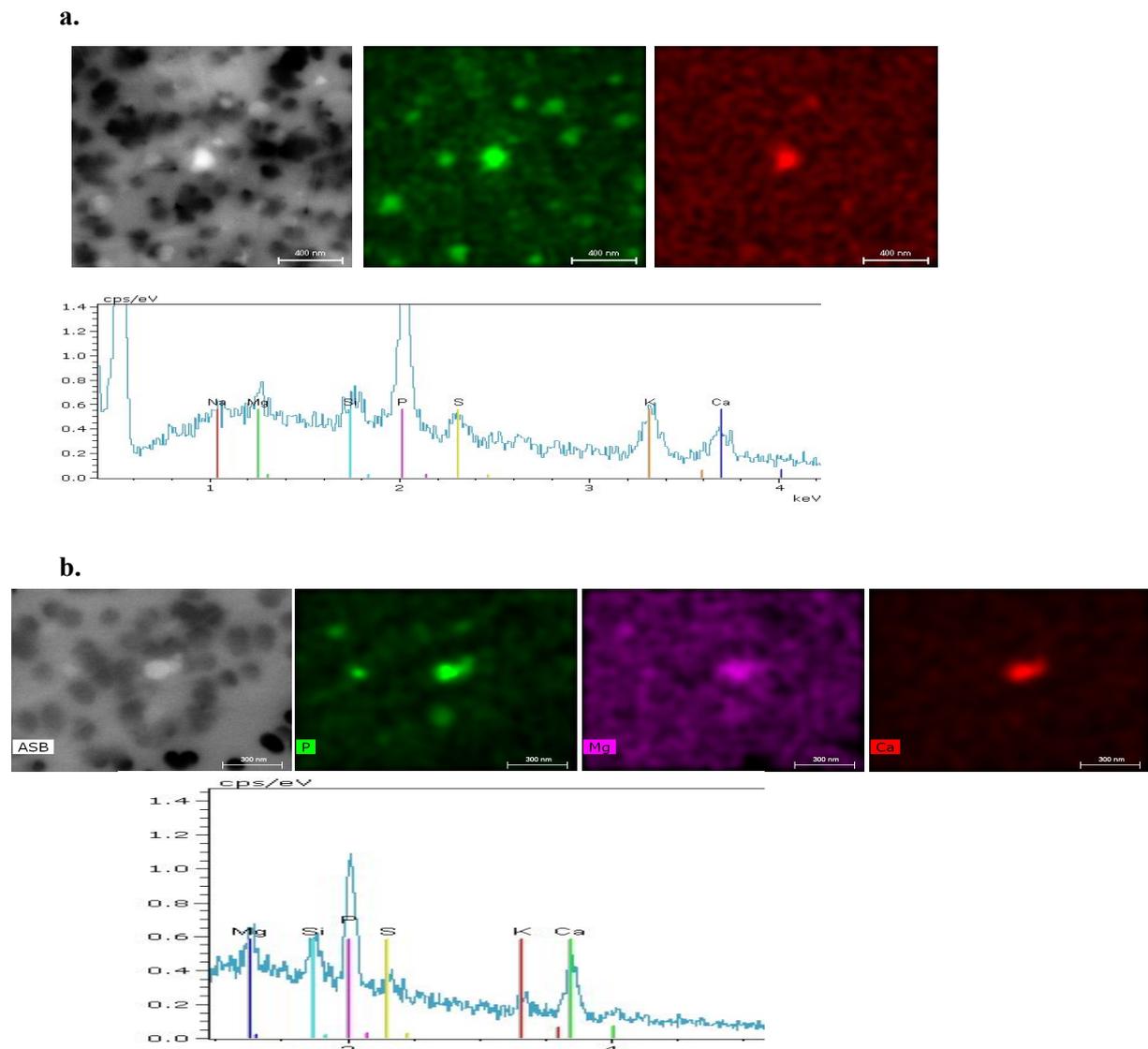
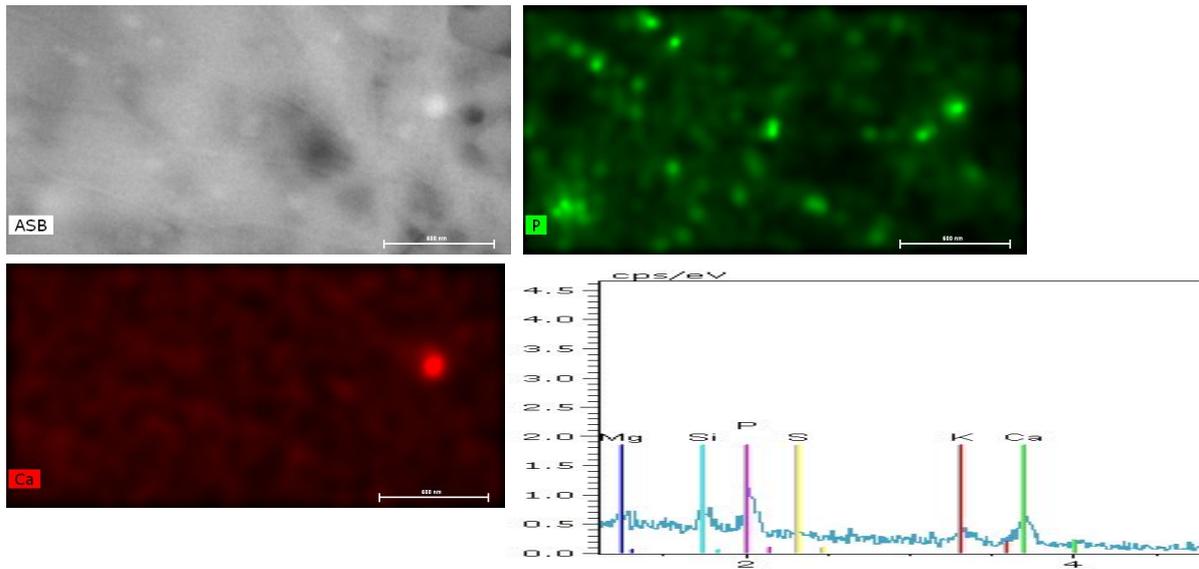


Figure 60 : images prises au microscope électronique à balayage et cartographie EDXS en a. du mutant *S.6803 pC-ccyA_{G10c0}* et en b. du mutant *S.6803 pC-ccyA_{S.11701}*, en c. du mutant *S.6803 pC*. Le calcium est colorié en rouge, le phosphate en vert et le magnésium en rose.

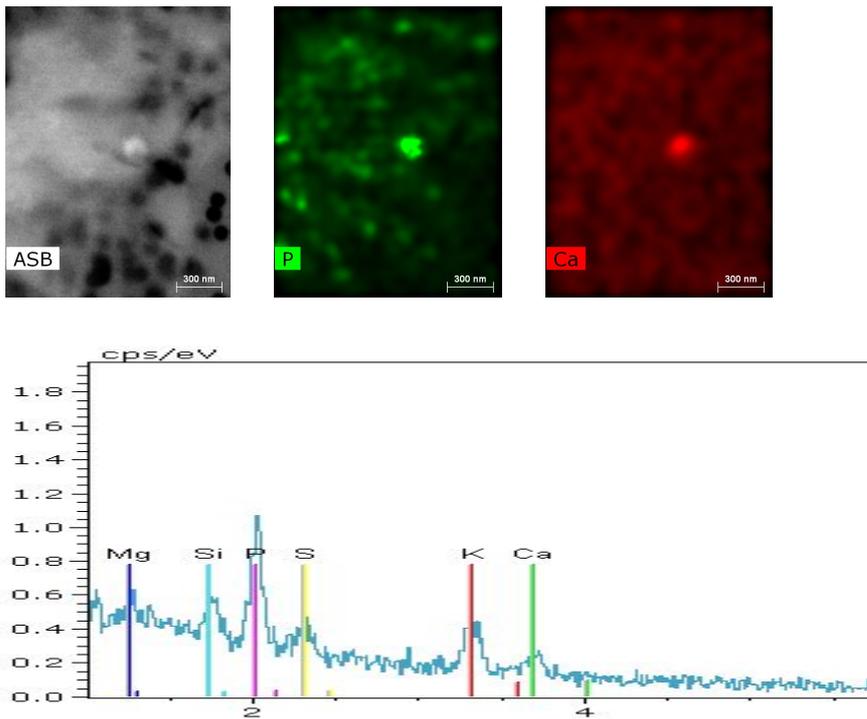
Pour les mutants *S.7942 pC-ccyA_{G10c0}* et *S.7942 pC-ccyA_{S.6312}*, 17 et 18 paquets cellulaires ont été regardés, provenant de deux expériences différentes, 13 et 11 échantillons de cellules ont montré du calcium dans des polyphosphates. Concernant les souches *S.7942 pC* et *pC-ccyA_{S.11701}*, 14 et 6 paquets cellulaires ont été observés. Du calcium a été détecté dans des polyphosphates dans 5 et 1 échantillons.



c.



d.



Figures 61 : images prises au microscope électronique à balayage et cartographie EDXS en a. du mutant *S.7942 pC-ccyA_{Gloeo}* et en b. du mutant *S.7942 pC-ccyA_{S,6312}*, en c. du mutant *S.7942 pC-ccyA_{S,11701}* et en d. du mutant *pC*. Le calcium est colorié en rouge, le phosphate en vert et le magnésium en rose.

2. Scanning transmission X-ray microscopy

Afin de mesurer des cartographies cellulaires du Ca avec une sensibilité plus forte (seuil de détection plus bas), nous avons analysé ces mêmes mutants grâce à la technique de scanning transmission X-ray microscopy (STXM) sur la ligne de lumière HERMES au synchrotron SOLEIL.

Le STXM permet : (1) d'obtenir des images avec une résolution spatiale de l'ordre de 25 nm, (2) de cartographier avec une sensibilité élevée le Ca au seuil $L_{2,3}$ du calcium (Benzerara et al. 2004; Obst et al. 2009), (3) d'obtenir des mesures complémentaires avec la quantité de carbone dans la cellule et (4) de donner des mesures semi-quantitatives (DiMasi et Gower 2014).

La procédure a été la suivante : nous avons acquis les images d'un paquet de cellules à 3 énergies différentes du faisceau incident. L'une à 347,2 eV, sous le seuil d'absorption du Ca, une autre à 352,6 eV, c'est-à-dire au maximum d'absorption du Ca et enfin une dernière à 354,0 eV, c'est-à-dire au-dessus du seuil d'ionisation du Ca (Figure 62). Ces 3 images donnent le nombre de photons transmis à travers chaque pixel. Nous avons ensuite converti en densité optique, c'est-à-dire $-\log(I/I_0)$ en considérant I_0 comme le nombre de photons transmis à une énergie donnée au niveau d'un pixel où il n'y a pas d'échantillon.

Puis à partir de ces 3 images, nous avons calculé une nouvelle image selon la formule : $I=I_{352,6}-I_{347,2}+0,794(I_{347,2}-I_{354})$. Ceci permet d'estimer la hauteur du pic à 352,6 eV corrigée de l'intensité de la ligne de base estimée grâce aux images à 347,2 et 354 eV (Figure 62).

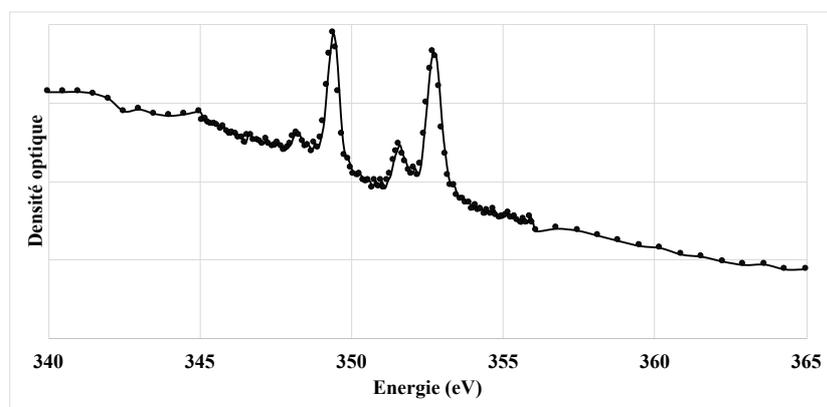


Figure 62 : Spectre XANES au seuil $L_{2,3}$ du Ca

L'intensité des pixels de l'image obtenue est proportionnelle à la quantité de Ca dans ces pixels. La hauteur du pic d'absorption du Ca est nommée H_{Ca} et est donc liée linéairement à la quantité de Ca.

Puis nous avons tracé les histogrammes des images obtenues c'est-à-dire la distribution des intensités des pixels. Une comparaison entre les différents histogrammes a pu être réalisée car toutes les images ont été prises avec la même taille des pixels et le même temps de comptage.

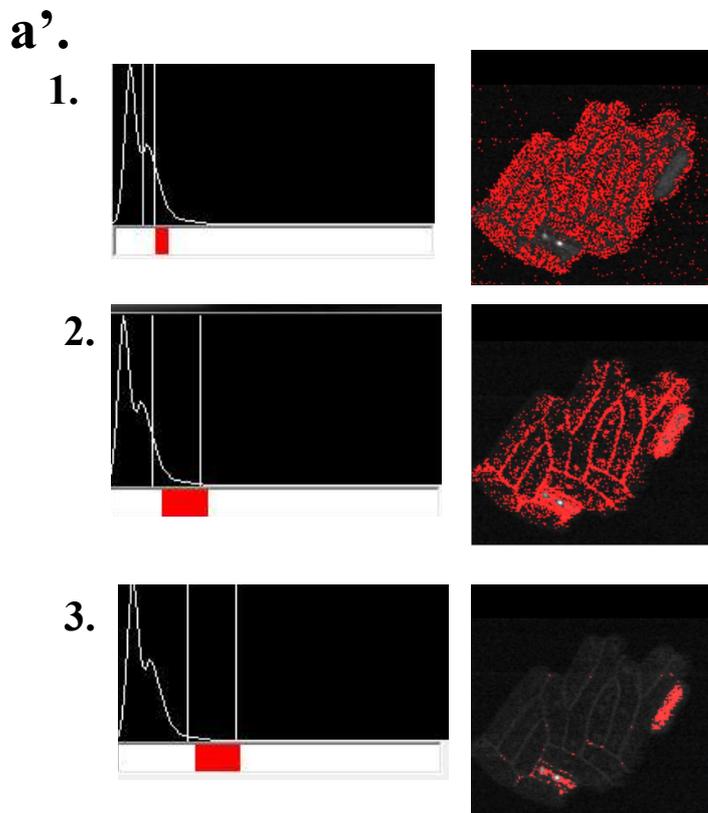
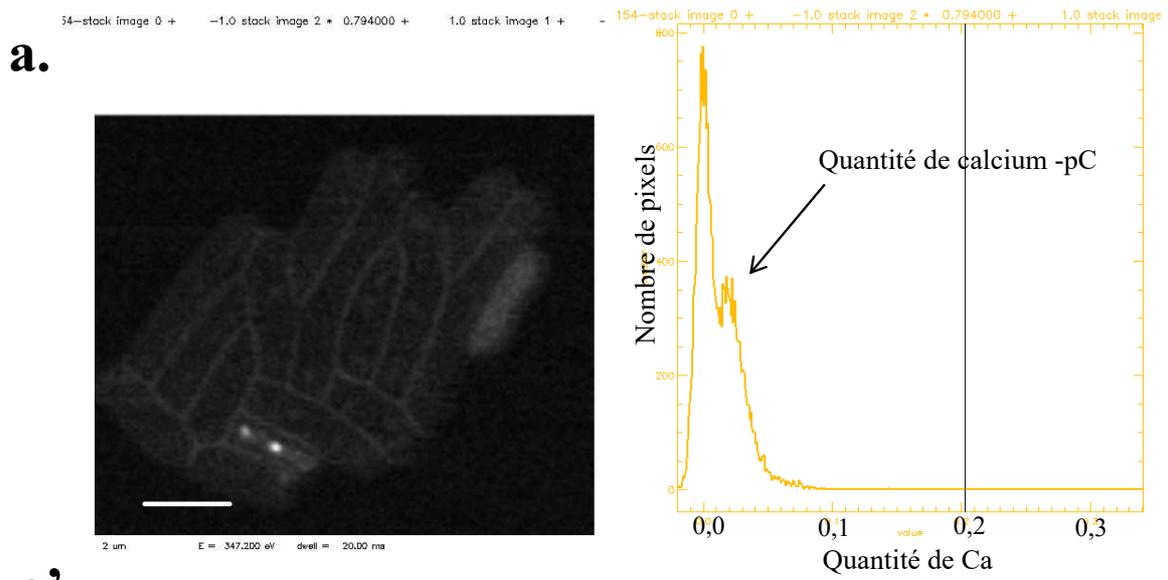
Dans chaque histogramme montré, deux pics sont observés : un premier pic représentant un grand nombre de pixels et centré à 0, c'est-à-dire correspondant à des zones sans calcium et

un second pic représentant moins de pixels mais avec une certaine quantité de calcium. L'image (a.) montre les cellules du mutant S.7942 pC et l'histogramme associé à l'image. Elle montre que H_{Ca} s'étend de 0,03 - 0,04. Cette quantité en calcium est ensuite comparée avec la quantité en calcium dans les cellules des mutants S.7942 pC-*ccyA*_{G10e0} en (b.) et S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312} en (c.). On peut remarquer dans l'histogramme en (b.) que le second pic du mutant S.7942 pC-*ccyA*_{G10e0} (en orange) est composé de deux épaulements et est plus décalé vers la droite donc vers une plus grande quantité de calcium (ce pic s'étend de 0,02 – 0,12). En (c.) un même décalage du second pic est observé entre le mutant S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312} et le mutant S.7942 pC. Chez le mutant S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312} ce second pic s'étale de 0,02 à 0,1. Donc, les résultats montrent que les cellules des mutants S.7942 pC-*ccyA*_{G10e0} et S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312} cultivés en présence de 250 μ M de Ca dans le milieu de culture possèdent une quantité de calcium plus grande que la souche pC.

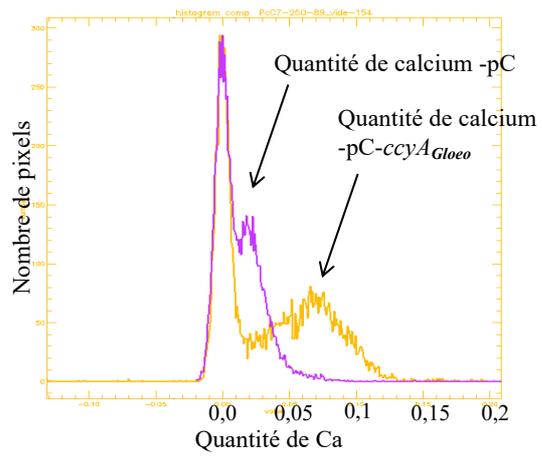
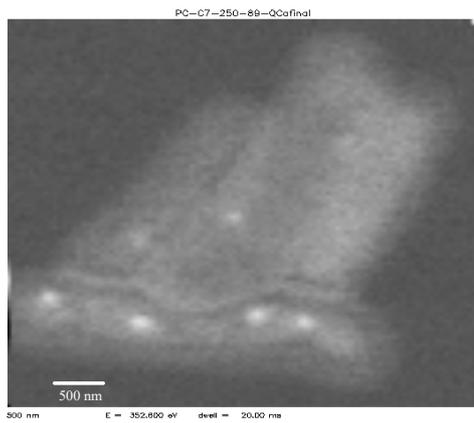
On peut aussi remarquer des hauteurs du second pic différentes, selon les 3 histogrammes. La hauteur d'un pic représente le nombre de pixels de l'image contenant une quantité de Ca donnée. Ainsi, pour l'histogramme en (b.) la différence de hauteur du second pic entre le mutant pC et le mutant S.7942 pC-*ccyA*_{G10e0} s'explique par la différence du nombre de cellules par échantillon : 16 cellules dans l'échantillon S.7942 pC et 4 cellules dans l'échantillon du mutant S.7942 pC-*ccyA*_{G10e0}. Les mêmes observations peuvent être faites avec les pics de l'histogramme en (c.).

Les images en (a') (b') et (c') montrent la localisation du calcium dans les cellules, à partir des histogrammes. Pour le mutant S.7942 pC (a'. 1. 2. 3.), les valeurs de calcium les moins hautes sont retrouvées dans le cytoplasme de quelques cellules à l'exception des cellules où l'on voit des polyphosphates riches en calcium (a'. 1.). Lorsque l'on se déplace ensuite sur ce pic, on remarque que des valeurs plus élevées en calcium sont retrouvées au niveau des membranes (a'. 2.). Ensuite, on peut remarquer que les valeurs en Ca plus hautes sont retrouvées dans le cytoplasme des cellules possédant des polyphosphates riches en Ca (a'. 3.). Enfin les valeurs les plus élevées en Ca sont retrouvées dans les polyphosphates. Cette distribution est la même avec les mutants S.7942 pC-*ccyA*_{G10e0} et S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312} mais les valeurs en calcium sont plus hautes et ce dans toute la cellule.

Ici un seul échantillon de chaque mutant est présenté, mais lors de l'analyse plusieurs échantillons ont été observés et les résultats sont reproductibles (4 échantillons analysés avec le mutant S.7942 pC, et 3 échantillons pour chacun des mutants S.7942 pC-*ccyA*_{G10e0} et S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312})

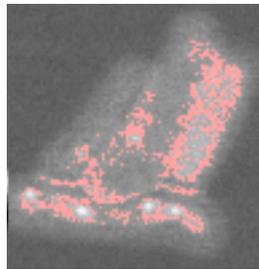
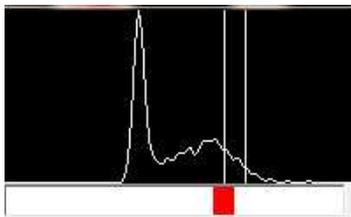


b.

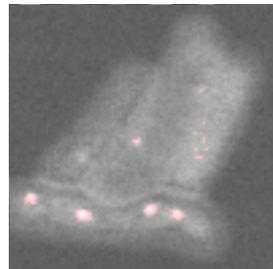
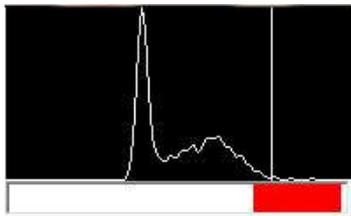


b'.

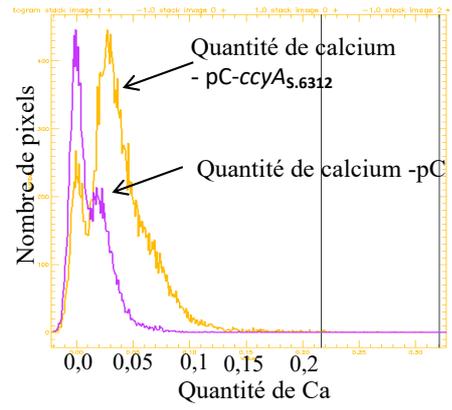
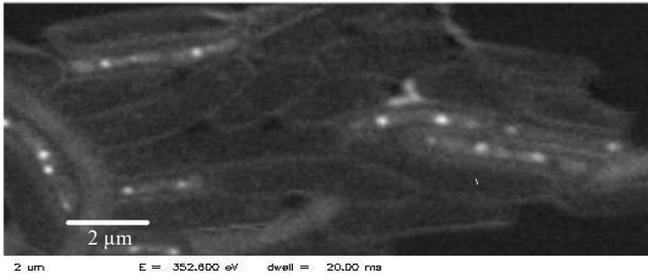
1.



2.



c.



c'.

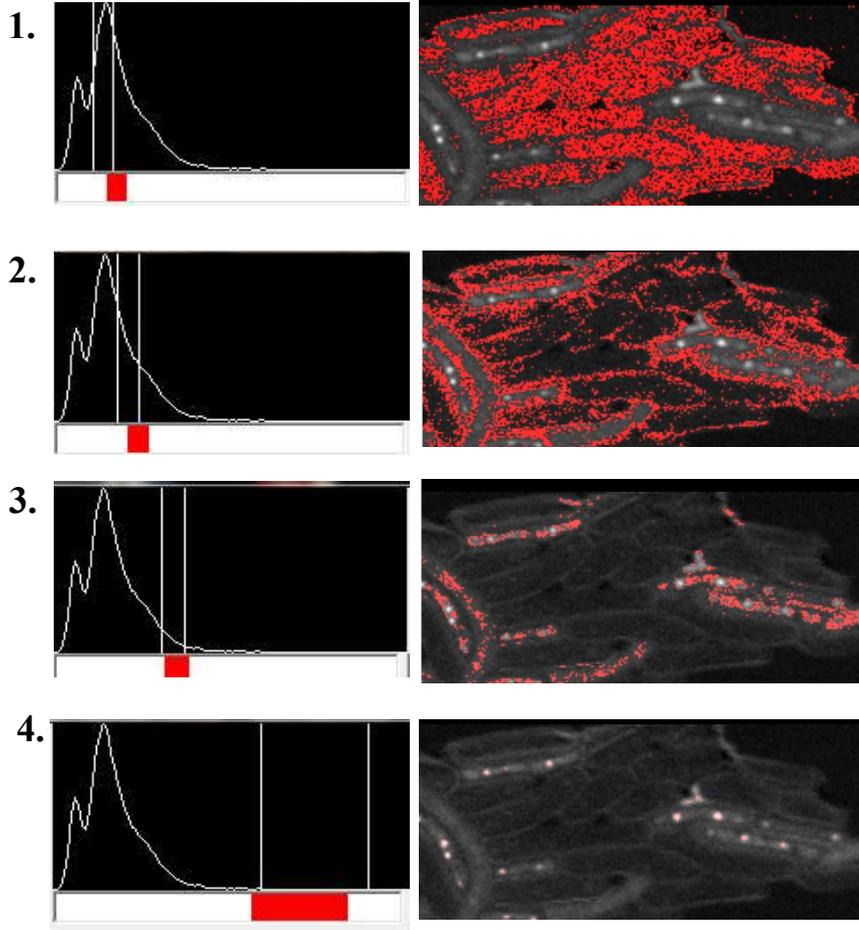


Figure 63 : Observations des mutants S.7942 pC, S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} et S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312} aux STXM.

Les images de gauche représentent la cartographie du Ca à partir de cluster de cellules en **a.** du mutant S.7942 pC, en **b.** du mutant pC-*ccyA*_{Gloeo} et en **c.** du mutant S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312}. Quelques cellules montrent des spots de calcium (points lumineux blancs) et une concentration en calcium plus grande (cellules gris clair).

Les histogrammes de droite montrent la comparaison entre la distribution de la quantité en calcium (abscisse) par pixel dans le mutant en **a.** S.7942 pC, en **b.** S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} et en **c.** S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312} (orange) et dans la souche S.7942 pC (violet).

en **a'**, **b'**, et **c'**. est montrée la localisation du calcium dans les cellules selon les valeurs de calcium dans l'histogramme chez le mutants S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} et le mutant S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312}.

V. L'expression de *ccyA* induit-elle l'apparition de structures liées aux carbonates ?

A. Observation de l'ultrastructure des cellules par cryo-microscopie électronique en transmission

L'ultrastructure des mutants S.7942 pC, S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} et S.7942 pC-*ccyA*_{S.7425} a été observée par Martin Sachse (Institut Pasteur) en utilisant la technique appelée cryo-electron microscopy of vitreous section (CEMOVIS). Cette expérience avait pour but de savoir si une structure particulière apparaissait chez les mutants. Récemment, (Blondeau et al. 2018) ont identifié par CEMOVIS une enveloppe composée de protéine(s) ou d'une monocouche lipidique, entourant les iACC. Cette observation est intéressante car une des hypothèses concernant la fonction de la protéine Calcyanine est qu'elle pourrait être une composante de la structure entourant les iACC.

La technique CEMOVIS permet d'observer des échantillons biologiques à l'échelle du nanomètre, dans leur état presque natif car elle ne nécessite pas d'étape de fixation, ni d'utilisation d'agent de coloration. Les échantillons sont d'abord vitrifiés puis coupés et observés au microscope électronique dans la glace à l'état vitreux (Eltsov et Dubochet 2005; Chlanda et Sachse 2014; Blondeau et al. 2018).

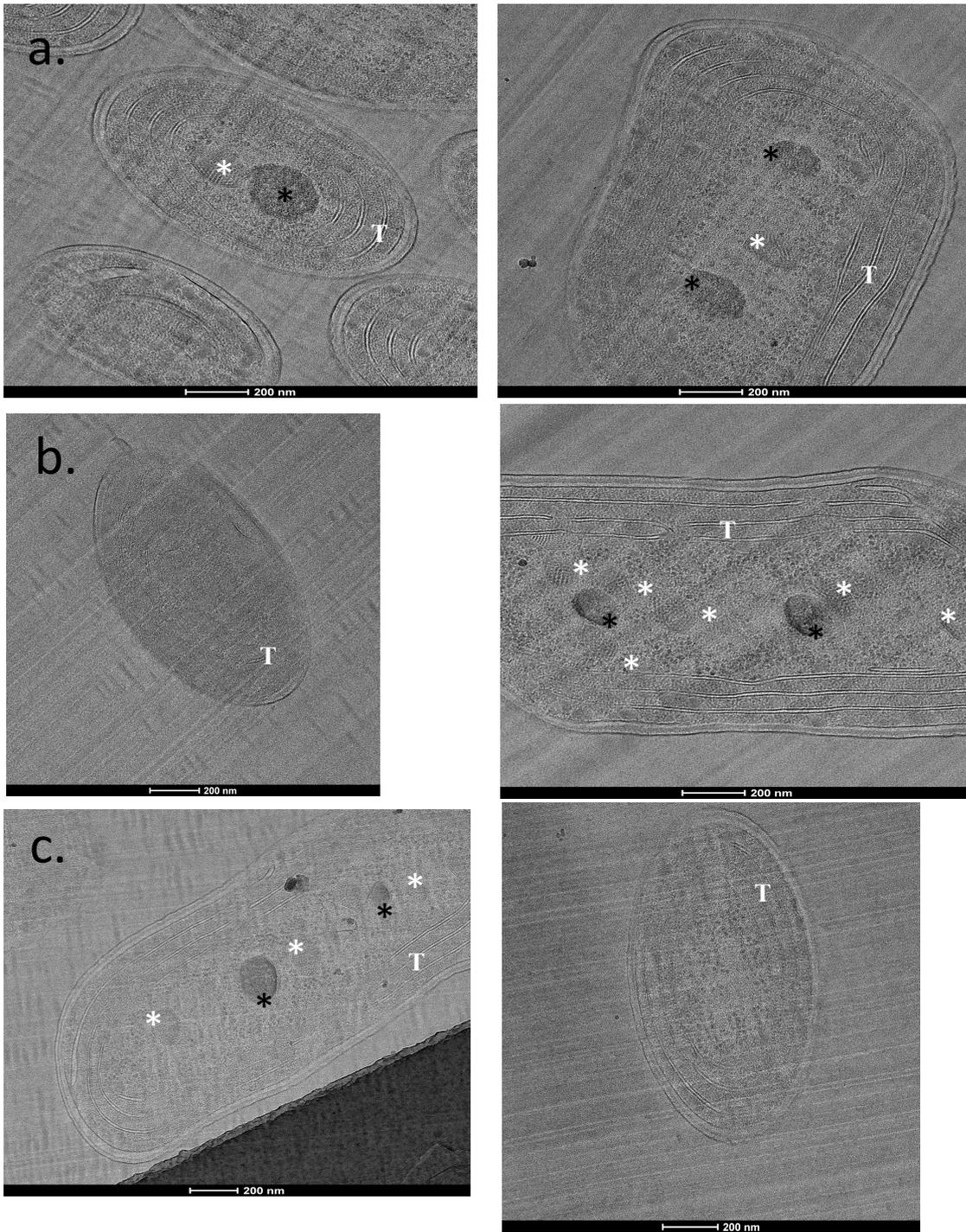


Figure 64 : Observation des mutants S.7942 pC (a.), S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} (b.) et S.7942 pC-*ccyA*_{C.7425} (c.) par microscopie électronique en transmission. T : thylakoides ; les étoiles blanches : les carboxysomes et les étoiles noires : les polyphosphates.

On retrouve dans les cellules des mutants S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} et S.7942 pC-*ccyA*_{C.7425} les mêmes structures que dans les cellules de la souche S.7942 pC, c'est-à-dire des thylakoïdes proches des membranes (3 thylakoïdes par cellule), des carboxysomes (entre 1 et 3 par cellule), des polyphosphates (entre 1 et 2 par cellule), et un cytoplasme granuleux. Certaines cellules des mutants S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} et S.7942 pC-*ccyA*_{C.7425} étaient vides (sans polyphosphate, ni carboxysome), et présentaient un cytoplasme lisse, de sorte que les cellules étaient peut-être mortes.

Dans tous les cas, on ne voit aucune structure particulièrement dense aux électrons qui pourrait être des carbonates.

Tableau 13 : récapitulation des phénotypes observés

	croissance avec 250 μ M de Ca	croissance avec 50 μ M de Ca	observations MEB/STXM	CEMOVIS
S.6803 pC- <i>ccyA</i> _{Gloeo}	Faible diminution **	Forte diminution*	Pas de phénotype	NR
S.6803 pC- <i>ccyA</i> _{S.11701}	Pas d'impact	Pas d'impact	Pas de phénotype	NR
S.7942 pC- <i>ccyA</i> _{Gloeo}	Fort impact*	Fort impact *	Plus de calcium intracellulaire	Pas de structure, beaucoup de cellules mortes
S.7942 pC- <i>ccyA</i> _{C.7425}	NR	NR	NR	Pas de structure, beaucoup de cellules mortes
S.7942 pC- <i>ccyA</i> _{S.6312}	Fort impact*	Fort impact*	Plus de calcium intracellulaire	NR
S.7942 pC- <i>ccyA</i> _{S.11701}	Pas d'impact	Pas d'impact	Pas de phénotype	NR

NR : non réalisé

* : une forte différence est observée entre ces mutants et les témoins (WT et pC)

** une faible diminution a été observée sur la croissance entre les cultures des mutants cultivés avec 250 μ M de Ca ou 50 μ M de Ca.

Les différentes expériences avaient pour but d'une part d'identifier le rôle que la Calcyanine pourrait avoir dans deux souches ne formant pas d'iACC, et d'autre part de savoir si cette fonction pouvait être liée à la formation des carbonates. Les premiers résultats montrent que l'expression de certaines versions du *ccyA* impacte négativement la croissance des souches ne formant pas d'iACC selon la concentration en calcium. Puis, des cellules des mutants S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} et S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312} contiennent des quantités de calcium plus grandes que les cellules du mutant S.7942 pC. Enfin, les observations au CEMOVIS ne montrent pas de formation de structure particulière chez les mutants S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} et S.7942 pC-*ccyA*_{C.7425} comparés à la souche S.7942 pC, mais un plus grand nombre de cellules mortes est observé.

VI. Discussion

1. Comparaison des croissances des souches mutantes et des souches sauvages dans le BG11 standard ($[Ca^{2+}] = 250 \mu M$)

Une faible différence de croissance significative est toujours observée entre la souche wt et celle possédant le pC que ce soit chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 ou chez *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942, montrant que le plasmide pC a un impact faible sur la croissance.

Les différences de temps de génération observées entre les figures 53 et 54 avec les cultures des souches S.6803 wt et S.6803 pC et entre les figures 56 et 57 réalisées avec les cultures des souches S.7942 wt et S.7942 pC cultivées avec $250 \mu M$ de Ca peuvent s'expliquer par le fait que les suivis de culture ont été réalisés dans deux laboratoires différents, avec une même intensité lumineuse (2000/2500 lux, mais des lumières de qualité différente, ce qui pour des organismes photosynthétiques comme les cyanobactéries peut faire varier la croissance).

Ensuite, des différences de croissance sont observées dans la condition de culture avec du calcium à $250 \mu M$ entre d'un côté les deux contrôles wt et pC et de l'autre côté certains mutants.

Chez le genre *Synechocystis* un écart de $D.O_{750 \text{ nm}}$ a été observé au moment du passage dans la phase de ralentissement entre le mutant pC-*ccyA*_{G10e0} et les témoins wt et pC dans une de nos expériences (figure 53). Cet écart a aussi été observé avec le mutant S.6803 pC-*ccyA*_{S.11701} et les souches contrôles S.6803 wt et S.6803 pC (figure 6).

Toutefois, cette différence entre les deux mutants et les deux témoins n'a pas toujours été observée (Figure 55). Ceci peut résulter d'une non stabilité de la protéine CcyA chez *Synechocystis* qui n'est pas l'hôte naturel de cette protéine.

Chez le genre *Synechococcus*, deux phénotypes différents peuvent être observés selon la version du gène *ccyA* exprimé. Le mutant pC-*ccyA*_{S.11701} ne montre aucun écart de croissance avec les souches wt et pC (des temps de génération similaires ont été calculés). A l'inverse des mutants pC-*ccyA*_{S.6312} et pC-*ccyA*_{G10e0} dont la croissance est ralentie par rapport aux souches S.7942 wt et S.7942 pC.

Deux hypothèses peuvent être émises, concernant les mutants 7942 pC-*ccyA*_{S.6312} et 7942 pC-*ccyA*_{G10e0} dont un ralentissement de la croissance est observé avec $250 \mu M$ de Ca : (1) la protéine CcyA de par sa fonction induit un ralentissement du métabolisme ou (2) le métabolisme n'est pas ralenti mais des cellules meurent. Une observation au CLSM pourrait répondre à la question de la viabilité cellulaire. Les cellules vivantes apparaissent en rouge de par l'autofluorescence de la chlorophylle et en vert lorsqu'elles meurent (Schulze et al. 2011). Un test de survie permettrait de savoir si les cellules sont capables de former des colonies, car certaines cellules peuvent arrêter de se diviser sans mourir tout de suite.

2. Comparaison des croissances des mutants et des souches sauvages selon la concentration initiale en Ca dans le milieu de culture

Les expériences de (De Wever et al. 2019) ont montré que la croissance de certaines souches formant les iACC comme *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Gloeomargarita lithophora* était limitée lorsqu'elles étaient cultivées dans un milieu contenant une concentration initiale en Ca de 50 μM par rapport à un milieu contenant une concentration initiale en Ca de 250 μM de Ca. Ceci démontre que le calcium peut être limitant pour leur croissance.

A l'inverse, comme pour l'étude de De Wever 2019, pendant la phase exponentielle, des croissances similaires sont observées. Cependant, une différence de hauteur des plateaux atteints est observée entre les cultures des souches wt *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *S. elongatus* PCC 7942 cultivées à 50 μM Ca comparées avec les cultures cultivées avec 250 μM de Ca.

Au final, les croissances des souches sauvages *S. elongatus* PCC 7942 et *Synechocystis* sp. PCC 6803 varient peu avec 250 μM ou 50 μM de Ca (Figures 53, 54, 56 et 57).

Par conséquent, nous avons voulu tester l'hypothèse selon laquelle les souches *Synechococcus elongatus* PCC 7942 et *Synechocystis* sp. PCC 6803 exprimant le gène *ccyA* pousseraient mieux en présence de 50 μM de Ca qu'en présence de 250 μM de Ca.

Ensuite, des phénotypes différents sont observés dans la souche *Synechocystis* selon la version du gène *ccyA* exprimé et la concentration initiale en Ca.

La croissance du mutant S.6803 pC-*ccyA*_{Gloeo} diminue lorsqu'il est cultivé avec une concentration initiale de 50 μM de Ca (Figure 53). A l'inverse aucune différence de croissance n'est observée entre les cultures du mutant S.6803 pC-*ccyA*_{S.11701} avec 50 μM de Ca ou avec 250 μM de Ca (figure 54).

De plus, l'expérience de la figure 55 montre un résultat en accord avec les premières observations, c'est-à-dire que le mutant 6803 pC-*ccyA*_{Gloeo} croît mieux avec plus de calcium. Cependant, cette expérience est à refaire car le calcium a été ajouté uniquement dans les cultures du mutant 6803 pC-*ccyA*_{Gloeo} et non dans les deux souches témoins wt et pC.

Ces résultats montrent que l'expression du gène *ccyA*_{Gloeo} impacte la croissance de la souche *Synechocystis* lorsque les souches sont cultivées avec 50 μM de Ca, mais l'expression du gène *ccyA*_{S.11701} n'impacte pas la croissance de la souche.

Une réponse inverse à celle attendue est observée avec le mutant *ccyA*_{Gloeo}, car ce mutant pousse moins bien dans du BG11 avec 50 μM de Ca.

Les mutants S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312}, S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} et S.7942 pC-*ccyA*_{S.11701} répondent différemment en terme de croissance à des variations de la concentration initiale en Ca de 50 μM ou de 250 μM (figure 56 et 57).

Si pour les mutants S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312}, S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} la différence de croissance, d'avec les cultures des souches S.7942 wt et S.7942 pC, pendant la phase exponentielle, est due à la concentration en calcium, pour le mutant S.7942 pC-*ccyA*_{S.11701} cette différence peut être due au plasmide pC lui-même. En effet, le même écart de D.O est observé pour les deux mutants. Toutefois, cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois ; il faudrait donc la refaire.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'absence de diminution de croissance du mutant pC-*ccyA*_{S.11701}, comme cela a été observé avec les mutants S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312}, S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo}, cultivés avec 250 μM ou 50 μM de Ca chez les souches *Synechococcus* et *Synechocystis*. La protéine Calcyanine de *S. calcipolaris* PCC 11701 (a) n'est

pas produite, car il y a dégradation de l'ARN messenger, (b) elle est produite mais n'est pas stable dans les cyanobactéries ne formant pas d'iACC et (c) elle est produite et stable mais non fonctionnelle car il lui manque des partenaires pour assurer sa fonction.

Les différences de croissance observées chez certains mutants *Synechocystis* sp. PCC 6803 (S.6803 pC-*ccyA*_{G10e0}) et *S. elongatus* PCC 7942 (S.7942 pC-*ccyA*_{G10e0} et S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312}) selon les concentrations de calcium ajoutées semblent indiquer que la protéine Calcyanine impacte l'homéostasie du calcium chez les souches *Synechocystis* et *Synechococcus*.

3. Incorporation du calcium et distribution du calcium dans les cellules

(De Wever et al. 2019) ont montré que les souches possédant le gène *ccyA* et formant des iACC incorporaient systématiquement plus de Ca que les autres souches ne possédant pas le gène *ccyA* et ne formant pas les iACC. Nous avons donc voulu mesurer l'incorporation de Ca par les cellules des souches mutantes et la comparer avec celle des souches sauvages.

Les résultats d'ICP-AES montraient une forte diminution de calcium dans les cultures des souches *Synechocystis* et *Synechococcus* wt, pC et le mutant pC-*ccyA*_{S.1170}. Pourtant *Synechococcus* et *Synechocystis* font partie des souches de cyanobactéries qui incorporent très peu le calcium d'après l'étude de (De Wever et al. 2019). Une différence entre mes expériences et celles de cette étude, est que dans mon cas, les cultures ont atteint des pH très forts. Il est ainsi vraisemblable que cela ait favorisé la précipitation de phases minérales extracellulaire riches en Ca, avec des phosphates et/ou des carbonates. Ainsi, la diminution de calcium constatée pourrait être liée à la précipitation de phases extracellulaires et nous n'avons pas ainsi accès à l'incorporation de Ca par les cellules elles-mêmes car elle est masquée par cette précipitation. De plus, dans ce cadre explicatif, la diminution du Ca dissous attendue est positivement corrélée à l'augmentation du pH, elle-même liée à la croissance des cellules. Puisque les souches sauvages poussent mieux et qu'elles induisent une augmentation plus forte de pH, on peut ainsi comprendre qu'elles induisent une diminution du Ca dissous plus forte. Ceci va à l'inverse des résultats attendus où la diminution du Ca dissous aurait été uniquement liée à l'incorporation de Ca par les cellules. Des expériences devront être refaites en prenant des points plus rapprochés. En effet au bout de 48h de culture, le pH des souches *Synechocystis* et *Synechococcus* se situe entre 9 et 10. A ces pH aucune précipitation extracellulaire du Ca n'est observée d'après l'étude de (De Wever et al. 2019).

C'est pourquoi nous avons, dans un second temps, abordé différemment le problème afin de mesurer spécifiquement l'incorporation de Ca par les cellules. Nous avons, d'abord, utilisé la microscopie électronique à balayage qui, couplée à la spectrométrie des rayons X en dispersion d'énergie, permet d'avoir une estimation semi-quantitative du Ca dans les cellules. Des analyses MEB-EDXS ont été réalisées sur les mutants de la souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 de la figure 6 lorsqu'ils sont cultivés avec 250 μ M de Ca : aucune différence de teneur en Ca dans les cellules n'a été détectée entre les mutants et la souche sauvage. Ceci confirme l'idée que la diminution observée de Ca dissous dans les cultures n'est pas liée à une différence d'incorporation du Ca par les cellules.

A l'inverse, les données MEB-EDXS ont souvent montré la présence de calcium dans les polyphosphates des cellules des mutants S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312} et S.7942 pC-*ccyA*_{G10e0} quand

ceux-ci sont cultivés en présence de 250 μM de Ca dans le milieu de culture. La présence de Ca dans les polyphosphates a aussi été observée chez les mutants S.7942 pC et S.7942 pC-*ccyAs.11701* mais beaucoup moins souvent.

Le MEB-EDXS offre cependant une sensibilité au Ca relativement limitée et il est particulièrement difficile d'avoir une vision statistique (autant que cela soit possible en microscopie). En effet pour s'assurer de la présence de Ca dans une cellule, il faut mesurer une cartographie EDXS qui a pris de l'ordre de 5 à 10 minutes pour un paquet de ~ 10 cellules dans les résultats montrés au-dessus. Nous nous sommes donc tournés vers la microscopie X synchrotron. Les seuils d'absorption $L_{2,3}$ du Ca montrent en effet des résonances relativement fortes qui rendent cette technique sensible au Ca et plus précise au niveau de la quantification même si nous n'avons pas travaillé sur la calibration pour obtenir des valeurs absolues en grammes de Ca par exemple. Le principe général est d'obtenir une image au-dessus du seuil d'absorption du Ca (par exemple au maximum d'absorption) et de lui soustraire une image sous le seuil d'absorption du Ca. La différence est une image dont l'intensité est reliée à la quantité de Ca. Cependant, la ligne de base du spectre d'absorption n'est pas horizontale. Afin de tenir compte de cela, nous avons donc pris 3 images à trois énergies différentes. Deux images permettent de mesurer la ligne de base non horizontale qui est ensuite soustraite au maximum d'absorption.

Les données STXM montrent que les mutants S.7942 pC-*ccyAs.6312* et S.7942 pC-*ccyAG10e0* cultivés avec 250 μM de Ca incorporent une plus grande quantité de calcium que la souche n'exprimant pas *ccyA* (pC). Deux hypothèses peuvent expliquer ces observations : (a) la protéine CcyA augmente l'incorporation du calcium par les cellules et (b) la protéine a une fonction délétère chez *S. elongatus* PCC 7942, stressant ou tuant les cellules et ce stress pourrait induire ainsi une augmentation de la teneur intracellulaire en calcium. Ce phénomène a déjà été observé par (Li et al. 2018) qui a montré qu'un influx de calcium était la conséquence de la perméabilité des membranes due à la mort des cellules d'*E. coli* par sonication. Cependant, d'après les images obtenues, on remarque du calcium présent dans les polyphosphates. Ainsi la question se pose de savoir si les cellules mortes gardent intacts leurs polyphosphates et donc le calcium contenu à l'intérieur. Ces résultats ne permettent pas de dire non plus si le calcium observé et mesuré est complexé ou dissous.

4. Formation de structures chez les mutants.

Les images CEMOVIS n'ont pas montré de nouvelle unité structurale intracellulaire évidente chez les mutants S.7942 pC-*ccyAG10e0* et S.7942 pC-*ccyAC.7425* de type vésicule par exemple. Nous avons observé cependant que certaines cellules montraient un intérieur cellulaire plus lisse, comme vidé des ribosomes qui donnent une granulosité caractéristique. Il nous a semblé qualitativement qu'un plus grand nombre de cellules montraient cet intérieur cellulaire plus lisse chez les mutants que chez le témoin, allant dans le sens d'un plus grand nombre de cellules stressées/mortes.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence de différence notable dans l'ultrastructure des mutants : (a) dans les souches formant les iACC, la Calcyanine ne participe pas à la formation de la structure entourant les iACC, (b) sa fonction est de former la structure entourant les iACC mais dans les souches ne formant pas naturellement les iACC, elle ne peut tenir cette fonction car elle est mal adressée chez *S. elongatus* sp. PCC 7942 ou il lui manque des partenaires et enfin (c) cette protéine s'assemble et forme des structures mais celles-ci ne sont pas visibles, (d) ou encore il faut suffisamment de Ca dans ces cellules pour que la protéine s'assemble et cela n'est pas le cas ici.

VII. Perspectives

1. Validation des expériences

Premièrement les suivis de culture devront être refaits pour confirmer certaines observations, comme les suivis de culture avec les mutants S.6803 et S.7942 pC-*ccyA*_{S.11701} qui n'ont été réalisés qu'une seule fois en duplicats ou triplicats. Les expériences d'ICP-AES doivent aussi être refaites en tamponnant le pH afin de ne pas induire de la précipitation extracellulaire corrélée avec l'augmentation de pH. Ces tests devront aussi être suivis par une observation au CLSM et des tests de survie afin de savoir si les mutants dont la croissance est ralentie est due à la mort cellulaire ou au ralentissement du métabolisme. De plus, le suivi de la viabilité cellulaire au CLSM permettrait de savoir si les cellules des mutants S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} et S.7942 pC-*ccyA*_{S.6312} montrant une plus forte incorporation au STXM sont mortes ou vivantes et donc de savoir si cette incorporation de calcium est le résultat de la mort des cellules.

2. Confirmer la production de la protéine Ccyas.11701

Dans les deux souches *Synechocystis* et *Synechococcus*, une même observation peut être réalisée concernant le mutant pC-*ccyA*_{S.11701} : celui-ci pousse aussi bien que les souches wt et la souche pC, et la diminution de la quantité de calcium dans le BG11 (50 μ M de Ca) n'a aucun impact sur la croissance du mutant. Il est peu probable que l'absence de phénotype soit due à une non-expression du gène *ccyA* cloné dans le plasmide d'expression pFC1, car les mêmes clonages ont été réalisés avec tous les autres gène *ccyA*. Mais une Reverse Transcriptase-PCR permettrait de répondre à la question. Ensuite, il est possible que la protéine ne soit pas stable. Pour vérifier cela nous ne disposons pas d'anticorps ciblant spécifiquement la protéine. Mais il serait possible de réaliser un SDS-page. Cette technique permet de faire migrer les protéines totales dénaturées sur un gel, et de les comparer avec les protéines totales de la souche wt. Il n'est pas sûr que cette stratégie fonctionne. Pour cela il faudrait que la protéine Ccyas.11701 ne migre pas à la même hauteur que les autres protéines présentes dans la souche wt. Une seconde stratégie serait de cloner le gène *ccyA*_{S.11701} tagué His (cette séquence est clonée actuellement dans un vecteur d'expression pET pour être exprimée dans *E. coli*) dans le vecteur de clonage pFC1. Pour ensuite utiliser un anticorps anti-His, nous permettant de savoir si la protéine est produite et stable et où elle se situe dans la cellule.

3. Incorporation d'autres alcalino-terreux

La souche *Gloeomargarita lithophora* est la seule à incorporer préférentiellement le Ba, le Sr et le Ra (Nithavong Cam et al. 2016; Mehta 2019). Il serait intéressant de savoir si les mutants S.6803 pC-*ccyA*_{Gloeo} et S.7942 pC-*ccyA*_{Gloeo} incorporent (1) du Ba et du Sr et (2) s'ils les incorporent préférentiellement en présence de Ca, donc si cette capacité de sélection et d'incorporation d'alcalino-terreux est due au gène *ccyA*.

4. Incorporation d'autres éléments

Pour ces expériences d'ICP-AES, seule la diminution de la concentration en calcium dans la solution avait été suivie, mais il serait important de savoir si les mutants exprimant le gène

ccyA incorporent d'autres éléments comme le phosphate, le magnésium, le carbonate ou d'autres éléments présents dans le BG11.

~~~~~

Enfin, un troisième objectif pendant ma thèse a été de déterminer la localisation de la Calcyanine dans les souches formant et ne formant pas les iACC.

# Chapitre 3 : Localisation cellulaire de la protéine Calcyanine

## I. Introduction

Nous avons voulu déterminer la localisation de la Calcyanine dans les cellules de cyanobactéries, en faisant l'hypothèse que cela pourrait nous aider à mieux cerner ses possibles fonctions (Giepmans et al. 2006). En effet, plusieurs localisations différentes pourraient être attendues : une localisation aux membranes nous indiquant que Ccya pourrait intervenir dans l'incorporation d'éléments ; une localisation diffuse ou bien localisée dans le cytoplasme nous indiquant qu'elle pourrait jouer un rôle « buffer », ou encore autour des carbonates et créer un compartiment. Plusieurs méthodes existent, mais la plus utilisée reste celle de la fusion de la protéine d'intérêt avec une protéine fluorescente. Cette stratégie consiste à créer une protéine chimère en couplant la protéine d'intérêt (Ccya) avec une protéine fluorescente comme la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein ; GFP), la protéine fluorescente jaune, (yellow protein (YFP) ou la protéine fluorescente cyan (Cyan Fluorescent Protein ; CFP) (Patterson, Day, et Piston 2001).

### A. Design des constructions et des plasmides

#### 1. Choix des protéines Ccya à fusionner

Pour ce travail, nous avons ciblé les protéines Calcyanine de trois souches : *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Synechococcus* sp. PCC 6312 et *Gloeomargarita lithophora*.

Les protéines de ces trois souches ont été choisies en particulier pour les raisons suivantes : (1) la répartition des carbonates est différente dans ces souches : *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Gloeomargarita lithophora* présentent les iACC réparties dans le cytoplasme alors que *Synechococcus* sp. PCC 6312 les présente réparties aux pôles et au septum (Karim Benzerara et al. 2014) ; (2) le domaine N-ter de la Calcyanine de ces souches est différent : le domaine N-ter des Ccya chez *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 montre une relativement forte homologie en séquence ce qui a conduit à le dénommer HMA-like, alors que le domaine N-ter de Ccya chez *Gloeomargarita lithophora* est très divergent, mais peut-être homologue au domaine HMA-like et a été nommé X ; (3) il a été démontré que la eGFP peut être utilisée chez *Cyanothece* sp. PCC 7425, c'est-à-dire qu'on peut séparer son signal du signal d'autofluorescence des cellules (Chenebault et al. 2020). A l'inverse chez

*Synechococcus* sp. PCC 6312, nous ne savons pas s'il est possible d'observer la fluorescence de la eGFP. Les plasmides ont été introduits par conjugaison. Chenebault et al. 2020 ont montré que la conjugaison était possible chez *Cyanothece* sp. PCC 7425, et j'ai mis en place la conjugaison chez *Synechococcus* sp. PCC 6312. Le biais de codon des séquences nucléotidiques des *ccyA* est d'origine, car nous souhaitions en premier lieu connaître la localisation des protéines CcyA dans leur souche d'origine.

## 2. Choix des souches dans lesquelles nous avons introduit les protéines de fusion

Pour ce travail, nous avons utilisé les quatre souches suivantes : *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Synechococcus* sp. PCC 6312, *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942. On suppose qu'introduire les protéines Ccyas<sub>6312</sub> et Ccyac<sub>7425</sub> dans leur souche respective permettrait d'obtenir une localisation proche du système non modifié, c'est-à-dire de la souche produisant la protéine CcyA. De plus, il serait aussi intéressant de savoir si la localisation de la protéine de Ccyag<sub>10eo</sub> est la même que la localisation des protéines Ccyas<sub>6312</sub> et Ccyac<sub>7425</sub> dans les souches *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Synechococcus* sp. PCC 6312 alors que le domaine N-ter est différent.

Concernant les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus elongatus* PCC 7942, on a voulu connaître la localisation des protéines Ccyas<sub>6312</sub>, Ccyac<sub>7425</sub> et Ccyag<sub>10eo</sub> dans deux souches ne formant pas d'iACC et ne possédant pas naturellement la protéine CcyA.

## 3. Choix de la protéine fluorescente utilisée

Pour cette stratégie, la protéine eGFP (enhanced green fluorescent protein) a été choisie pour être fusionnée à la Calcyanine. La eGFP est une variante de la protéine Gfp qui a été découverte chez la méduse *Aequorea victoria* (Tsien 1998), dont la longueur d'excitation est de 489 nm et la longueur d'émission de 508 nm (Su 2005).

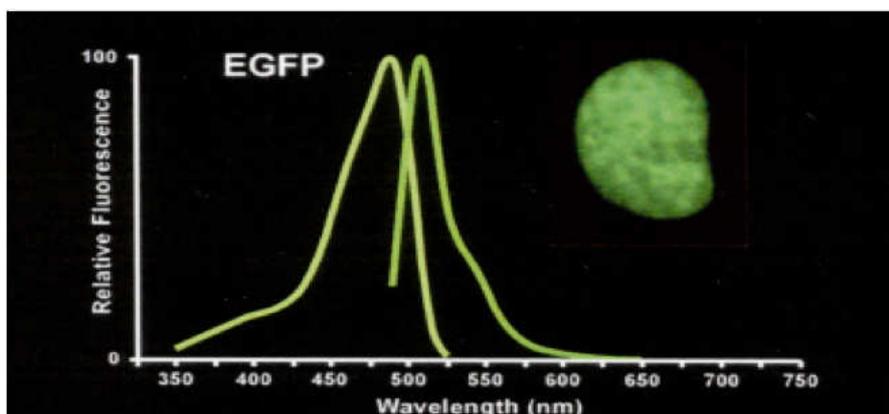


Figure 65 : Spectre d'excitation (en jaune, maximum à 489 nm) et d'émission (en vert, maximum à 508 nm) de la eGFP (Su 2005).

Des expériences ont montré que la fluorescence de la eGFP était visible chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 et chez *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Mazouni et al. 2004; Yokoo et al. 2015), malgré son autofluorescence et qu'elle permettait de détecter des protéines (comme FtsQ, FtsZ, ZipN) (Marbouty et al. 2009b; Marbouty et al. 2009; Marbouty et al. 2009a; Mazouni et al. 2004) qui se localisent dans la membrane ou au septum.

#### 4. Choix du vecteur d'expression

Pour produire la protéine chimère CcyA-eGFP, le plasmide d'expression pSB2A-Tac à large spectre d'hôte (Marraccini et al. 1993) a été utilisé. Ce plasmide a déjà été utilisé chez les souches *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechocystis* sp. 6714 et *Synechococcus* sp. PCC 6301 (Marraccini et al. 1993). Grâce au promoteur *tac*, l'expression du gène cloné est forte, constitutive et non dépendante de la lumière chez les cyanobactéries. De plus, le plasmide possède les gènes de résistance à la Cm, la Km et la Sp/Sm (Figure 66) (Marraccini et al. 1993). Pour exprimer la protéine fusion, on a fait le choix d'utiliser un vecteur d'expression plutôt que d'intégrer la séquence *ccyA-egfp* dans le génome des cyanobactéries. En effet, dans les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus elongatus* PCC 7942, des sites neutres ont été identifiés (Ng et al 2015; Englund et al. 2015; Cao et al. 2017) mais aucun site neutre n'est connu dans les deux souches *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Synechococcus* sp. PCC 6312. Par conséquent, l'utilisation d'un vecteur d'expression permettant de produire la protéine fusion dans différentes souches de cyanobactéries est la meilleure stratégie.

#### 5. Choix des emplacements relatifs aux gènes *egfp* et *ccyA*

Les constructions génétiques ont été faites de telle sorte qu'on puisse produire une protéine de fusion où la protéine eGFP est placée soit du côté N-terminal de la Calcyanine, soit du côté C-terminal. Il a été démontré que, parfois, l'ajout de la protéine GFP d'un côté peut altérer le repliement de la protéine de fusion et modifier la localisation naturelle de la protéine d'intérêt (Hanson et Ziegler 2004; Specht et al. 2017). Par conséquent, les deux versions ont été testées (Figure 66).

#### 6. Choix du linker

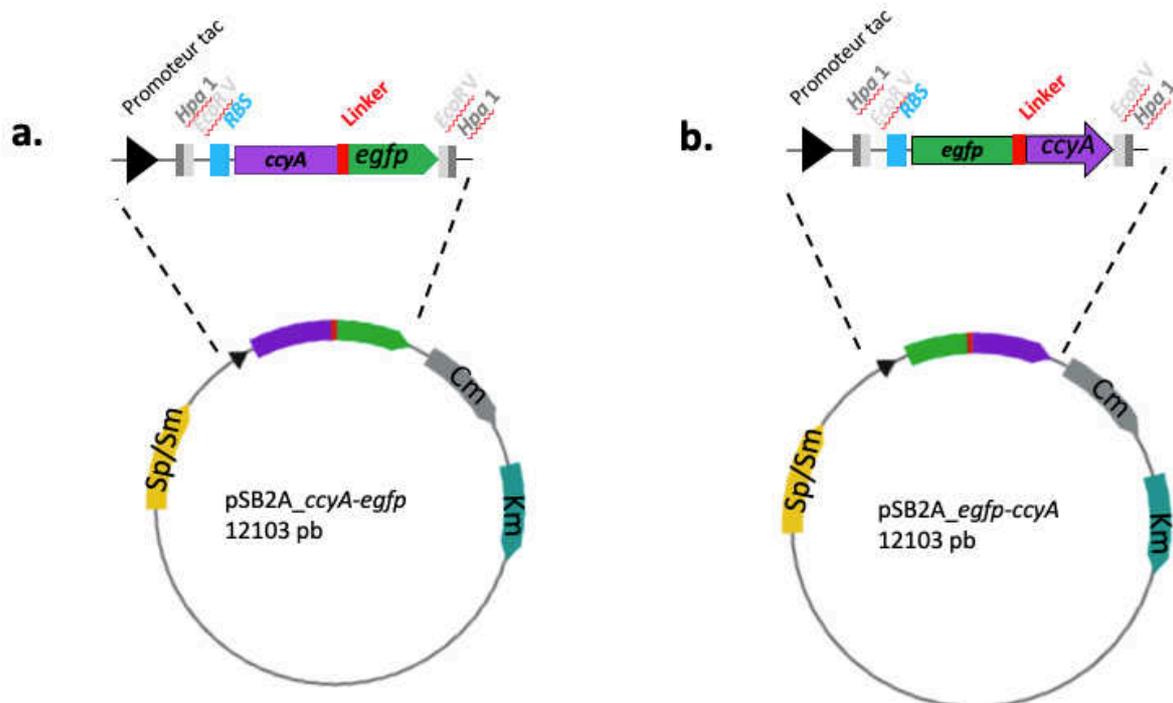
Un linker a été ajouté entre la protéine Calcyanine et la protéine eGFP. Un linker est une courte séquence d'acides aminés. Ces séquences sont retrouvées naturellement dans les protéines multi-domaines et permettent de maintenir les interactions entre différents domaines (Gokhale et Khosla 2000). L'absence de linker entre les deux protéines peut conduire à un mauvais repliement de la protéine fusion induisant une perte de fonction de la protéine d'intérêt (Zhao et al. 2008) ou encore une trop faible production de la protéine ne permettant pas sa détection (Chen et al. 2013). Les propriétés d'un linker dépendent de sa longueur, de son hydrophobicité, et des structures secondaires formées (Chen et al 2013).

La longueur moyenne d'un linker, calculée dans les protéines naturelles multi-domaines, est de 10 +/- 5.8 résidus d'acides aminés (George et Heringa 2002; Chen, Zaro, et Shen 2013); plus un linker est long, plus l'hydrophobicité diminue (George et Heringa 2002; Chen, Zaro, et Shen 2013). Les linkers naturels sont généralement composés de petits acides aminés (AA) polaires chargés et non chargés comme la thréonine (Thr), la sérine (Ser), la glycine (Gly), la proline (Pro), l'acide aspartique (Asp), la lysine (Lys), la glutamine (Gln), l'asparagine (Asn) et l'alanine (Ala). Certains AA augmentent la solubilité, d'autres la flexibilité (Chen et al. 2013). Les linkers sont classés en trois catégories (Chen et al. 2013) :

- Les flexibles sont généralement utilisés quand les domaines ont besoin d'un certain degré de mouvement. Ils permettent de garder aussi une certaine distance et/ou interaction entre les domaines. Ils sont souvent composés des acides aminés Gly, Ser et Thr. La séquence de linkers la plus utilisée est (GGGGS)<sub>n</sub>.
- Les rigides sont composés d'acides aminés adoptant une structure en hélice-alpha ou contiennent de multiples résidus de proline. Ces linkers sont utilisés quand une distance stricte entre les protéines est nécessaire.
- Les clivables : le linker est clivé *in vivo* pour donner des domaines indépendants. Ces linkers ne sont pas adaptés pour localiser des protéines.

En conséquence, nous avons privilégié l'addition d'un linker flexible (GGGGS)<sub>2</sub> à celle d'un linker solide car nous n'avons aucune information ni quant à la localisation de la Calcyanine (membranes, cytoplasme, compartiment intracellulaire, septum etc..), ni concernant ses partenaires protéiques potentiels ou encore si elle appartient à un complexe protéique.

Cependant, il faut noter que dans certains cas, l'utilisation d'un linker flexible n'a pas été concluante, conduisant à un faible taux d'expression de la protéine et/ou une perte de fonction et ainsi l'utilisation d'un linker rigide peut être préférable (Chen et al. 2013). De plus, des observations de protéines, comme Ftsz, FtsQ, ou CcmK, fusionnées avec la eGFP sans linker, montrent qu'elles se localisent aux bons emplacements (Marbouty et al. 2009a; Marbouty et al. 2009; Marbouty et al. 2009b).



## Figure 66 : Construction des plasmides à large spectre d'hôte permettant la production de la Calcyanine fusionnée à la GFP chez les cyanobactéries

Les séquences des gènes *ccyA* de *Gloeomargarita lithophora*, *Cyanothece* sp. PCC 7425 ou *Synechococcus* sp. PCC 6312 ont été clonées dans le plasmide d'expression pSB2A-tac (Marraccini et al. 1993) qui est basé sur le plasmide répliatif RSF1010. Il possède trois marqueurs de sélection de résistance à un antibiotique : à la streptomycine/spectinomycine ( $Sm^r/Sp^r$  de couleur jaune), au chloramphénicol ( $Cm^r$ ; en gris) et à la kanamycine ( $Km^r$  en bleu). Les gènes sont représentés par des flèches, dont le sens indique le sens de la transcription. La transcription du gène *ccyA* est dépendante du promoteur *tac*. La séquence codante pour la protéine fusion a été clonée en aval du promoteur *tac* (triangle noir) entre les sites de restriction *HpaI/EcoRV* (rectangles gris foncé et clair).

a. La phase codante pour la eGFP (en vert) a été fusionnée en amont du gène *ccyA* (flèche de couleur violette) afin de produire la protéine CcyA-GFP

b. La phase codante pour la eGFP (en vert) a été fusionnée en aval du gène *ccyA* (flèche de couleur violette) afin de produire la protéine GFP-CcyA

Entre les deux phases codantes, la séquence appelée linker (rectangle rouge) a été ajoutée pour créer un domaine flexible (GGGGSGGGGS) entre les deux protéines fusionnées.

## II. Manipulations génétiques

### A. Introduction des plasmides dans *E. coli*

Les plasmides ont d'abord été introduits par transformation dans différentes souches d'*E. coli* afin d'être introduits par la suite dans les souches de cyanobactéries par conjugaison. Des résultats différents ont été obtenus après transformation dans les souches *E. coli* utilisées selon les constructions introduites. Différentes souches d'*E. coli* ont été utilisées, comme NEB10 $\beta$  et TOP 10 qui sont des souches utilisées pour le clonage (Neuhold et al. 2020; Ortega-Ramos et al. 2014), et les souches Rosetta et C43 qui sont des souches utilisées en général pour l'expression de protéines (Tegel et al. 2010; Dumon-Seignovert et al. 2004). La souche C43 est spécialement utilisée pour l'expression de protéines toxiques et/ou membranaires (Dumon-Seignovert et al. 2004).

Toutes les souches, après transformation, ont été incubées à température ambiante. En règle générale, après une transformation, les souches *E. coli* sont incubées à 37°C ou 30°C toute la nuit et des clones apparaissent le lendemain ou le surlendemain (à 30°C). Cependant, dans ce cas, les souches *E. coli* ont été incubées à température ambiante (environ 20°C) comme c'est souvent le cas lorsque la protéine produite est toxique pour *E. coli*.

En effet, l'efficacité de transformation des souches TOP 10 et NEB10 $\beta$  est très élevée (10<sup>9</sup> cfu/ $\mu$ g), et l'efficacité de transformation des souches Rosetta et C43 est moindre, respectivement 2.10<sup>6</sup> cfu/ $\mu$ g et 10<sup>6</sup> cfu/ $\mu$ g (données trouvées à partir des sites internet des sociétés SigmaAldrich, .....) et après transformation dans ces 4 souches *E. coli*, très peu de clones ont été obtenus indiquant que l'ajout du plasmide pSB2A-tac exprimant la protéine fusion est toxique pour ces 4 souches *E. coli*.

Avec les souches TOP 10 et NEB10 $\beta$ , on remarque pour toutes les constructions, excepté pour les constructions CcyA<sub>S.6312</sub>-eGFP et eGFP-CcyA<sub>S.6312</sub> que peu, voire aucun clone n'a été obtenu. Des tapis cellulaires de petits clones ont été obtenus avec les constructions CcyA<sub>S.6312</sub>-eGFP et eGFP-CcyA<sub>S.6312</sub>. Ces tapis sont apparus après 5 et 3 jours d'incubation à température ambiante, ce qui est très long pour l'obtention de clones avec ces souches *E. coli*, puisque normalement 48h suffisent pour obtenir des grosses colonies. Ces observations montrent que la croissance des souches NEB10 $\beta$  et TOP 10 a été impactée (Tableau 14).

Avec la souche Rosetta, des clones sont apparus avec seulement deux constructions (CcyA<sub>Gloeo</sub>-eGFP et eGFP-CcyA<sub>C.7425</sub>) ; en revanche, avec certaines constructions (CcyA<sub>C.7425</sub>-eGFP), la transformation a été réalisée 2 ou 3 fois sans jamais donner de clones (Tableau 14). Avec la souche C43, des clones ont été obtenus avec toutes les constructions, excepté avec la construction eGFP-CcyA<sub>Gloeo</sub>. Pour les constructions CcyA<sub>Gloeo</sub>-eGFP, CcyA<sub>C.7425</sub>-eGFP et eGFP-CcyA<sub>S.6312</sub>, de nombreux clones ont été obtenus (entre 100 et 50) mais ceux-ci sont apparus après 7 et 5 jours d'incubation, ce qui est long (Tableau 14). Après plusieurs jours d'incubation, des clones faux positifs peuvent théoriquement apparaître. Par conséquent, des PCR ont été réalisées pour savoir si les clones apparaissant contenaient le plasmide (Figure 67).

Tous ces résultats montrent donc que la production de protéine de fusion CcyA-eGFP est toxique dans les souches *E. coli*, mais chaque construction a au moins pu être introduit dans une souche *E. coli*.

Tableau 14 : **Obtention des clones *E. coli* après transformation**

|                               | NEB10 $\beta$                             | Top10                                  | Rosetta               | C43                   |
|-------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| CcyA <sub>Gloeo</sub> -eGFP   | 3 clones                                  | 4 clones***                            | 50 clones             | ≈100 clones après **  |
| eGFP - CcyA <sub>Gloeo</sub>  | 0 clones                                  | 4 clones                               | 0 clone               | 0 clone               |
| CcyA <sub>C.7425</sub> -eGFP  | 5 clones                                  | 0 clone                                | 0 clone               | ≈100 clones après **  |
| eGFP -CcyA <sub>C.7425</sub>  | Gros clones et petits clones*             | 0 clone                                | ≈100 clones après *** | 2 clones              |
| CcyA <sub>S.6312</sub> -eGFP  | Tapis cellulaire ***                      | Tapis cellulaire de très petits clones | 0 clone               | Clones très petits ** |
| eGFP - CcyA <sub>S.6312</sub> | Tapis cellulaire de très petits clones ** | Tapis cellulaire de très petits ****   | 0 clone               | ≈ 50 clones ***       |

\* Hétérogénéité de clones : obtention de gros clones et de petits clones

\*\* clones obtenus après 7 jours d'incubation à température ambiante

\*\*\* clones obtenus après 5 jours d'incubation à température ambiante

\*\*\*\* clones obtenus après 3 jours d'incubation à température ambiante

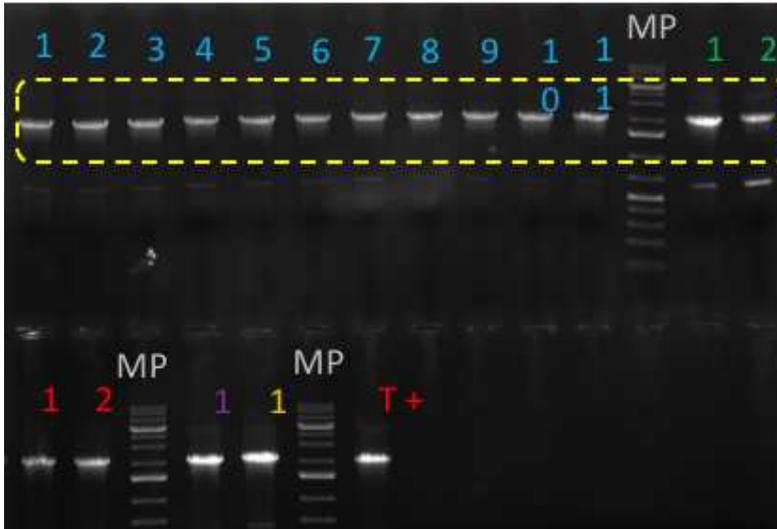
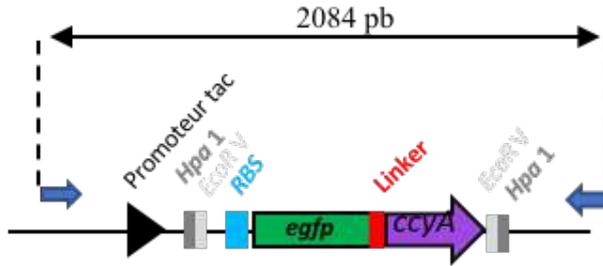


Figure 67 : Vérification par PCR de la présence des divers plasmides pSB2A-Tac\_*CcyA-egfp* ou pSB2A-Tac\_*CcyA-egfp* après transformation dans différentes souches d'*E. coli*.

Les amorces (Taq pR pSB2A-Tac\_Fw et Cm pSB2A-Tac\_Rv) utilisées sont représentées par des flèches bleues sur le schéma a.

**Puits 1 à 11** : PCR vérifiant la présence de *ccyA*<sub>G10c0</sub>-*egfp* en aval du promoteur tac dans 11 transformants de la souche Rosetta

**Puits 1 et 2** : PCR vérifiant la présence de *ccyA*<sub>G10c0</sub>-*egfp* en aval du promoteur tac dans 2 transformants de la souche *E. coli* C43.

**Puits 1 et 2** : PCR vérifiant la présence de *egfp-ccyA*<sub>C.7425</sub> en aval du promoteur tac dans 2 transformants de la souche *E. coli* C43.

**Puit 1** : PCR vérifiant la présence de *egfp-ccyA*<sub>S.6312</sub> en aval du promoteur tac dans un transformant *E. coli* C43.

**Puit 1** : PCR vérifiant la présence de *ccyA*<sub>S.6312</sub>-*egfp* en aval du promoteur dans un transformant *E. coli* TOP10.

**T +** : témoin positif PCR à partir de la construction *ccyA*<sub>G10c0</sub>-*egfp* synthétisée par Genecust.

**MP** : marqueur GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo Scientific). La taille attendue varie avec les diverses versions de *ccyA* :

*egfp-ccyA*<sub>S.6312</sub> : 2087 pb

*ccyA*<sub>S.6312</sub>-*egfp* : 2084 pb

*egfp-ccyA*<sub>C.7425</sub> : 2159 pb

*ccyA*<sub>G10c0</sub>-*egfp* : 2054 pb

## B. Introduction des plasmides dans divers châssis cyanobactériens

Les souches TOP 10 et NEB10 $\beta$  sont les deux souches couramment utilisées au laboratoire pour réaliser des clonages mais aussi pour introduire des plasmides dans les cyanobactéries par conjugaison. A l'inverse, il n'a jamais été démontré que les souches Rosetta ou C43 pouvaient aussi être utilisées pour la conjugaison avec des cyanobactéries.

Après obtention de transformant *E. coli*, les constructions eGfp-Ccyas.6312 et Ccyas.6312-eGFP (présentes respectivement dans les souches *E. coli* C43 et TOP 10) ont été introduites dans la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312 et les constructions Ccyac.7425-eGFP et CcyaGloeo-eGFP (présentes respectivement dans les souches *E. coli* C43 et Rosetta), ont été introduites dans *S. elongatus* PCC 7942 par conjugaison. Le même nombre de conjuguants (environ 15/boîte) obtenus après insertion des constructions eGfp-Ccyas.6312 et Ccyas.6312-eGFP, montrent qu'aucune version *ccyA*<sub>S.6312</sub> avec la *egfp* clonée en N-ter ou en C-ter n'induit de toxicité dans la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312. En revanche, le nombre de conjuguants obtenus avec la souche *S. elongatus* PCC 7942, varient : beaucoup de clones (plus de 200 clones) ont poussé avec la construction CcyaGloeo-eGFP ; mais seulement une cinquantaine ont poussé avec la construction Ccyac.7425-eGFP.

Aucune construction n'a encore été introduite ni dans la souche *Cyanothece* sp. PCC 7425, ni dans la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Concernant la nomenclature, les mutants ont été nommés ainsi : S.7942\_CcyaC.7425-eGFP, ce qui signifie que dans la protéine de fusion produite dans la souche de *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942, la GFP se trouve dans la partie-Cter.

### 1. Localisation de la Calcyanine chez *Synechococcus* sp. PCC 6312

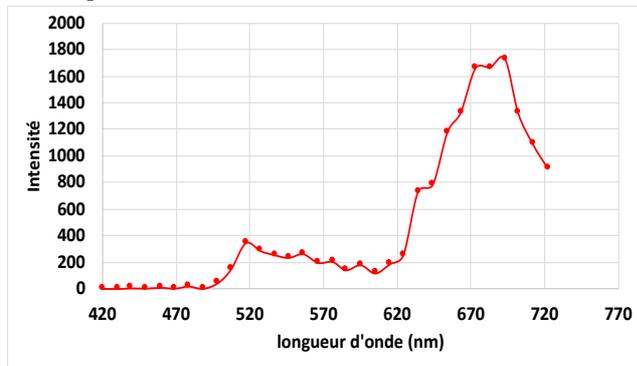
Les cyanobactéries sont autofluorescentes du fait qu'elles contiennent un certain nombre de pigments, notamment la chlorophylle (Kaňa et al. 2009; Yokoo et al. 2015). Cette autofluorescence peut interférer avec celle de la eGFP dans le vert (Zhou et al. 2005; Yokoo, et al. 2015). Il est donc périlleux de simplement mesurer l'intensité de la fluorescence dans le vert et de l'attribuer à l'eGFP puisque les souches sauvages peuvent aussi émettre dans cette gamme de longueur d'onde. En revanche, la forme du spectre de l'eGFP et de l'autofluorescence des cyanobactéries sont possiblement différentes. Ainsi, afin d'être plus discriminant, nous avons donc mesuré les spectres d'émission de fluorescence en parallèle des images, obtenant ainsi des données hyperspectrales. Pour analyser ces données, nous avons dans un premier temps acquis le spectre d'autofluorescence de la souche wt.

Nous constatons comme évoqué ci-dessus, que le spectre d'autofluorescence des souches sauvages s'étend bien dans le vert (Figure 68) à 507 nm, là où l'eGFP émet aussi de la fluorescence (Figure 68). De plus, nous avons mesuré le spectre de fluorescence de la eGFP (Figure 68) et ce grâce à l'analyse de bactéries contaminantes non cyanobactériennes et non autofluorescentes mais ayant incorporées les constructions et produisant la eGFP,

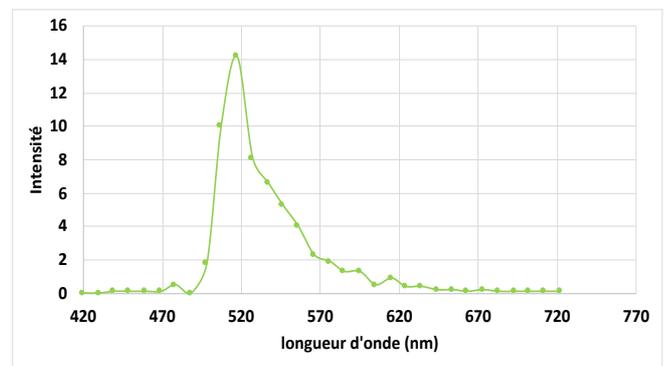
Puis nous avons acquis des données hyperspectrales sur les mutants (un spectre d'émission par pixel). L'analyse des données consiste à ajuster les spectres d'émission de chacun des pixels

de l'image en faisant la combinaison linéaire des deux spectres donnés en entrée : celui de l'autofluorescence des sauvages et celui de l'eGFP. Ceci permet de cartographier ces deux composants. Nous avons vérifié que les résidus (écart de la donnée au fit) étaient faibles. L'utilisation de cette stratégie sous-entend que l'on n'a pas de variation spatiale du spectre d'autofluorescence indépendant de la sonde eGFP.

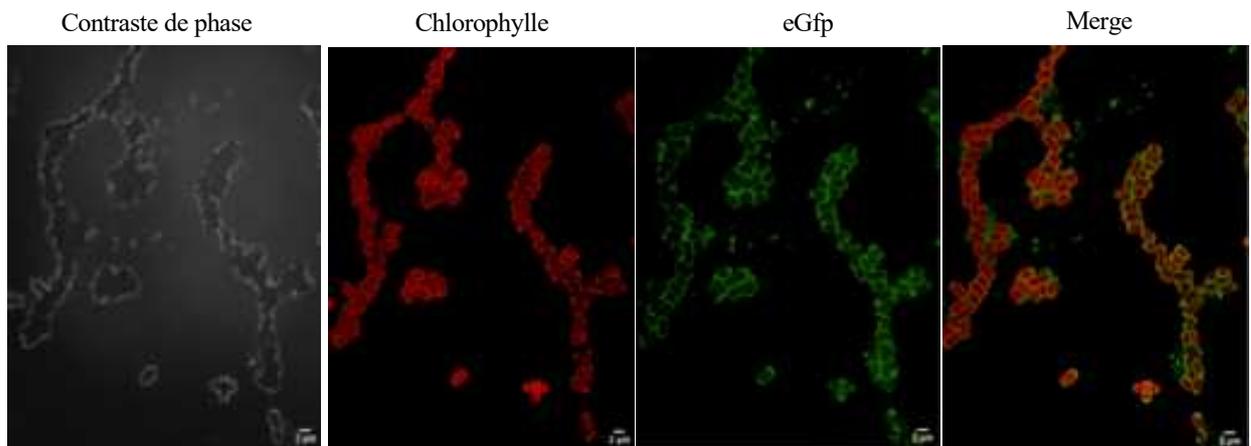
**a.** Spectre d'auto- fluorescence de la souche S. PCC 6312



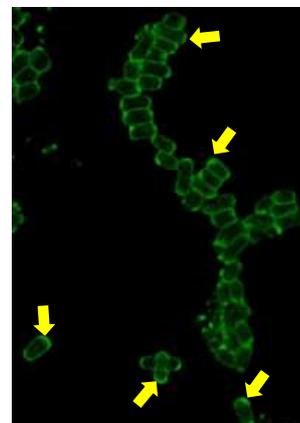
Spectre de la eGFP : référence



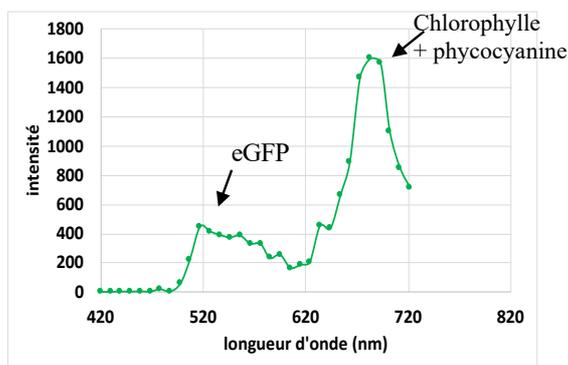
**b.**

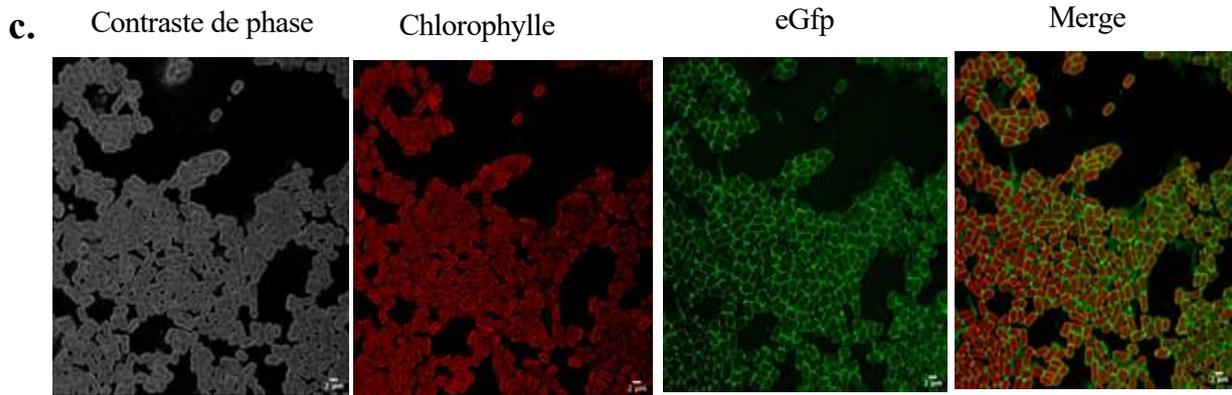


zoom



Spectre de fluorescence du mutant eGFP-Ccya<sub>s.6312</sub>





Spectre de fluorescence du mutant *Ccya<sub>S.6312</sub>-eGFP*

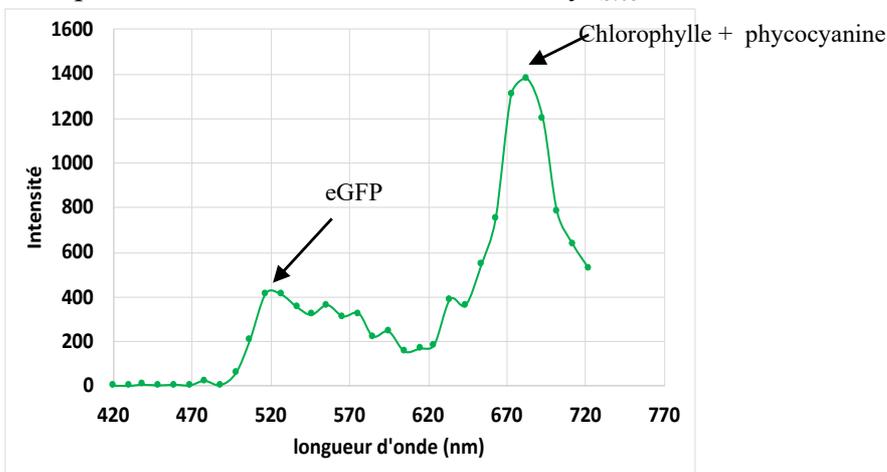


Figure 68 : **Analyses hyperspectrales en microscopie confocale à balayage laser de la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312.**

en a. spectre d'autofluorescence de la souche sauvage et spectre de la eGFP produite dans une bactérie contaminante non autofluorescente.

En b. Images montrant des paquets de cellules en contraste de phase ; cartographie du signal de fluorescence associé aux cellules sauvages (nommé « chlorophylle ») et cartographie du signal associé à l'eGfp (les flèches jaunes indiquent une fluorescence plus importante de la eGFP aux pôles). Ces 2 images sont obtenues par décomposition de la donnée hyperspectrale selon les 2 spectres de référence montrés en a. La superposition des 2 cartographies est montrée dans l'onglet « merge ». Spectre de fluorescence du mutant *S.6312\_eGFP-Ccya<sub>S.6312</sub>*

En c. images et spectre de fluorescence du mutant *S.6312\_Ccya<sub>S.6312</sub>-eGfp*.

La barre d'échelle représente 2 µm

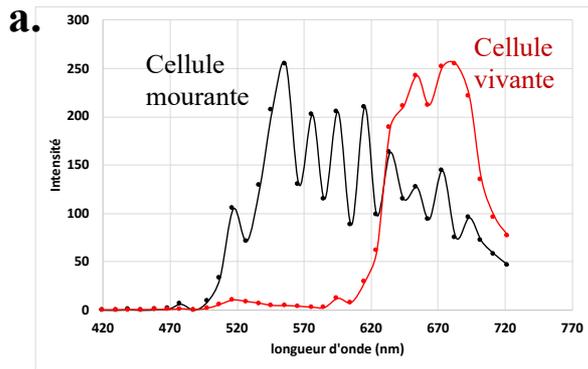
Les deux versions de la protéine fusion se localisent à la périphérie des cellules, vraisemblablement à la membrane. Dans certaines cellules, elles montrent une fluorescence plus marquée aux pôles chez *Synechococcus* sp. PCC 6312. Une même localisation est observée entre les deux mutants *S.6312\_eGfp-Ccya<sub>S.6312</sub>* et *S.6312\_Ccya<sub>S.6312</sub>-eGFP* montrant que la présence de la eGfp en C-ter ou N-ter de la protéine *Ccya<sub>S.6312</sub>* n'induit pas de changement de repliement, d'adressage ou d'interaction avec d'autres protéines. Ces observations ne permettent pas d'être certain de la localisation de la protéine *Ccya*, car il manque un témoin : celui de la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312 produisant la eGFP seule, afin de s'assurer que la eGFP seule ne se localise pas à la membrane ou aux pôles. Elles ne permettent pas non plus

de dire si la protéine Calcyanine de *Synechococcus* sp. PCC 6312 est réellement intégrée dans la membrane ou située au niveau de la membrane *via* une interaction avec une protéine membranaire.

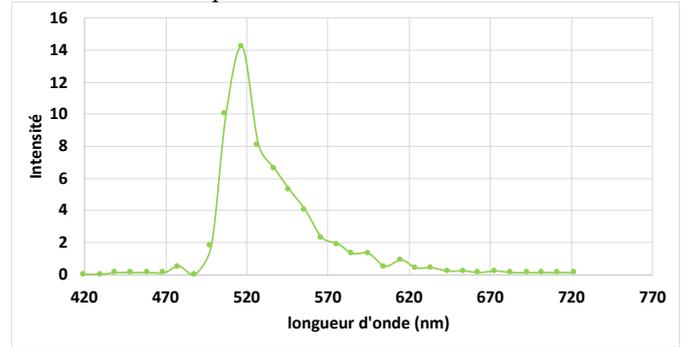
## **2. Localisation de la Calcyanine chez *Synechococcus elongatus* PCC 7942**

La même stratégie a été utilisée pour discriminer la fluorescence naturelle de la souche sauvage (WT) de la fluorescence de la eGFP. Nous avons détecté des variations dans le spectre d'autofluorescence de la souche wt selon qu'il a été mesuré sur une cellule vivante (ici cela signifie que l'on voit un signal significatif d'émission dans le rouge) ou sur une cellule mourante (ici cela signifie que l'on ne voit presque pas de fluorescence dans le rouge). Dans ce deuxième cas, on voit relativement plus de fluorescence dans le vert que dans le rouge par rapport à la cellule vivante. Pour traiter les données hyperspectrales acquises sur les mutants eGFP, on peut utiliser comme spectre en entrée soit celui de la eGFP, soit celui d'une cellule dite « vivante », soit celui d'une cellule dite « mourante ».

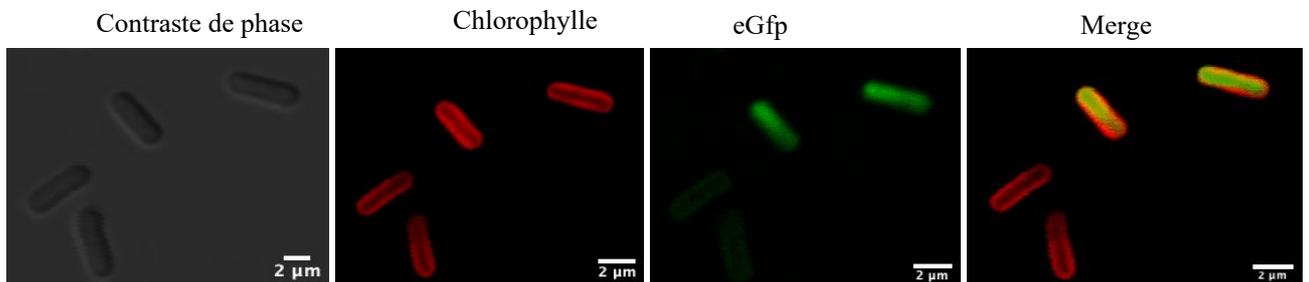
Spectre d'auto-fluorescence de la souche *S. elongatus* PCC 7942



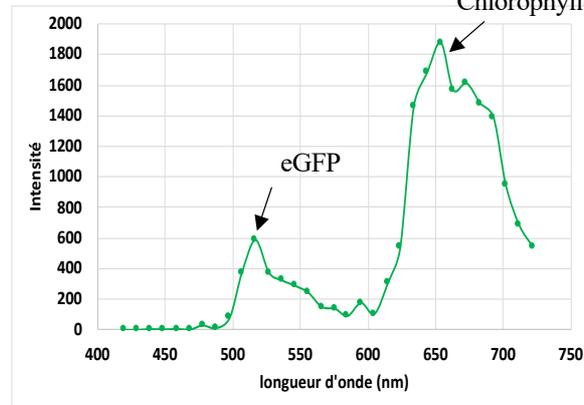
Spectre de la eGFP : référence



**b.**



Spectre de fluorescence du mutant *S.7942\_Ccya<sub>Gloco</sub>-eGFP*  
Chlorophylle + phycocyanine



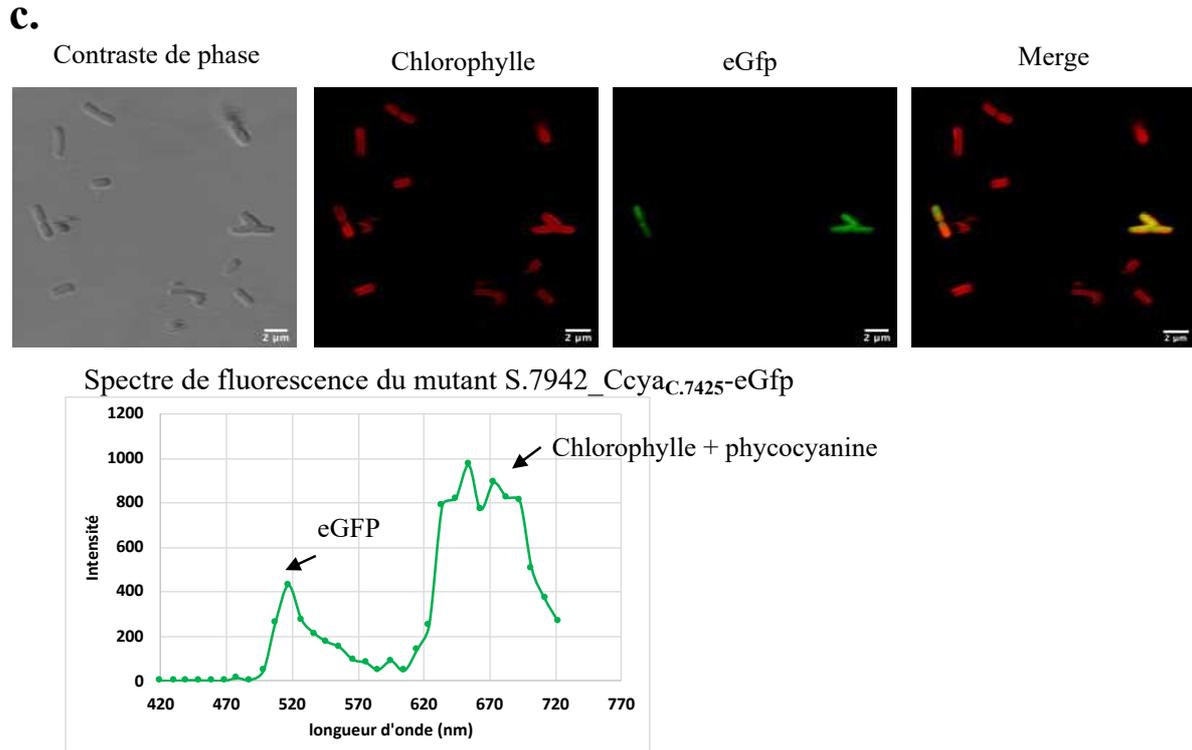


Figure 69 : **Analyses hyperspectrales en microscopie confocale à balayage laser de la souche *Synechococcus elongatus* PCC 7942.**

en a. spectre d'autofluorescence de la souche sauvage et spectre de la eGFP produite dans une bactérie contaminante non autofluorescente.

En b. Images montrant des paquets de cellules en contraste de phase ; cartographie du signal de fluorescence associé aux cellules sauvages (nommé « chlorophylle ») et cartographie du signal associé à la eGfp. Ces 2 images sont obtenues par décomposition de la donnée hyperspectrale selon les 2 spectres de référence montrés en a. La superposition des 2 cartographies est montrée dans l'onglet « merge ». Spectre de fluorescence du mutant S.7942\_CcyaGloeo-eGFP

En c. images et spectre de fluorescence du mutant S.7942\_CcyaC.7425-eGfp.

La barre d'échelle représente 2 µm.

Chez *S elongatus* PCC 7942 qui ne possède pas à l'état sauvage le gène *ccyA* dans son génome, un signal de type eGFP est observé dans le cytoplasme de quelques cellules des mutants S.7942\_CcyaC.7425-eGFP et S.7942\_CcyaGloeo-eGFP.

Cependant, il est difficile de dire si cette localisation de la protéine Ccya couplée à la protéine fusion eGFP est la même que la protéine Ccya seule introduite dans la souche *S. elongatus* sp. PCC 7942. Pour savoir notamment si cette localisation cytoplasmique est induite par la présence du gène *egfp* cloné en C-ter, il faudrait regarder les mutants sur-exprimant le gène *ccyA* avec le gène *egfp* cloné en N-ter.

Cette localisation dans le cytoplasme de la protéine de fusion pourrait aussi s'expliquer par le fait que cette souche n'est pas l'hôte naturel de la Calcyanine et qu'ainsi il lui manque des protéines partenaires pour que celle-ci se localise comme dans l'hôte d'origine.

En conclusion, chez la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312, souche formant les iACC, il semblerait que la protéine Calcyanine soit située au niveau des membranes et/ou aux pôles

cellulaires. En revanche, chez *Synechococcus elongatus* PCC 7942, souche ne formant pas d'iACC, il semble que la protéine de fusion soit située dans le cytoplasme.

### III. Discussion

La souche *Synechococcus* sp. PCC 6312 appartient à un clade bien distinct d'autres souches de cyanobactéries formant les iACC aux pôles et au septum (Benzerara et al. 2014; De Wever et al. 2019). Cette distribution des carbonates semble liée à la division cellulaire et des résultats de microscopies électroniques suggèrent que les carbonates se forment au niveau du septum chez *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 (souches formant elles aussi les iACC aux pôles) (Li et al. 2016). Plusieurs protéines se localisent au niveau du septum lors de la division cellulaire chez les bactéries et la plus importante d'entre elles est FtsZ, qui forme un anneau de polymère au niveau du septum (Adams et Errington 2009). D'autres protéines intervenant aussi dans la division cellulaire comme, ZipN et SepF (situées au septum) (Marbouty et al. 2009; Marbouty et al. 2009a), DivIVA (située aux pôles) ou encore MinCDE et FtSQ (situées à la membrane) (Marbouty et al. 2009a; Mazouni et al. 2004) pourraient aussi interagir avec la protéine Calcyanine.

Il serait intéressant de savoir si ces protéines situées au septum et à la membrane (a) se colocalisent avec la protéine Calcyanine et (2) si elles interagissent physiquement entre elles. Il serait possible de colocaliser des protéines en les couplant avec des protéines fluorescentes différentes (TerBush et al. 2018).

Concernant l'identification de partenaires possibles avec la protéine Calcyanine, plusieurs techniques existent, comme celle de la co-immunoprécipitation (Salim et al. 2002). Le principe de cette technique est développé dans la partie « perspectives générales ».

La localisation de la protéine de fusion Ccya est diffuse dans le cytoplasme de la souche *S. elongatus* PCC 7942. Il est difficile de dire si cette localisation est la conséquence de l'ajout de la protéine fusion eGFP ou si elle est similaire à la localisation de la protéine Calcyanine sans la eGFP dans cette souche.

Si cette localisation est similaire, donc dans le cytoplasme, cette protéine pourrait par exemple lier le calcium le rendant moins disponible pour la cellule, induisant une diminution de la croissance ou bien former des structures particulières délétères pour la souche, non visibles au CEMOVIS. Si cette localisation est faussée par l'ajout du gène *egfp*, dans ce cas il est nécessaire d'utiliser d'autres techniques pour en connaître sa localisation (point discuté ci-dessous).

Enfin, cette localisation cytoplasmique peut être expliquée par une possible absence de partenaire de la Ccya, ce qui pourrait ainsi empêcher l'ancrage de Ccya dans la cellule.

## IV. Perspectives

D'autres techniques pourraient être utilisées pour connaître la localisation de la Calcyanine chez *S. elongatus* PCC 7942 ou chez les autres souches de cyanobactéries :

- L'immunofluorescence (Spech et al. 2017), avec l'utilisation d'un anticorps. Un anticorps spécifique à la Calcyanine montrerait le résultat le plus fiable. A défaut, nous pourrions utiliser un anticorps Anti-Histidine. Les gènes *ccyA*<sub>Gloeo</sub> et *ccyA*<sub>S.11701</sub> ont été clonés avec un tag His (c'est-à-dire 6 AA histidines) du côté N-ter ou du côté C-ter dans un plasmide d'expression pET pour être exprimés et purifiés dans les souches *E. coli* BL21 et C43. Les séquences His-*ccyA* et *ccyA*-His pourraient être clonées dans le plasmide d'expression pSB2A-Tac ou pFC1 permettant l'expression dans les cyanobactéries. Puis un anticorps anti-His serait utilisé pour déterminer la localisation. Comme la Gfp, le tag Histidine peut impacter le repliement de la Calcyanine car une séquence y est rajoutée mais ce tag est plus petit que la protéine eGFP, donc pourrait moins impacter le repliement.
- L'utilisation d'acides aminés fluorescents : le principe est de substituer un AA de la protéine à étudier par un autre AA non naturel fluorescent (ex Coumarin). Cette stratégie minimise les risques de mauvais repliement de la protéine (Specht et al. 2017; Charbon et al. 2011). Une autre alternative serait d'incorporer l'AA fluorescent non naturel sous forme de tag en N-ter ou C-ter (Specht et al. 2017).
- La stratégie chimio-enzymatique : une enzyme va déclencher la fluorescence d'une courte étiquette préalablement clonée avant ou après la protéine d'intérêt (Specht et al. 2017). Cette stratégie a déjà été utilisée pour localiser les protéines Tar, CheA, FtsZ et FtsA sur cellules *E. coli* vivantes et fixées (Ho et Tirrell 2016).
- Des techniques de microscopie à l'échelle nanométrique permettraient d'obtenir des images en haute résolution et ainsi permettraient de localiser très précisément la protéine dans la cellule (Chenebault et al. 2020 ; Tuson et al. 2016)

De plus, avec ces constructions, on pourrait regarder la localisation des protéines *CcyA*<sub>Gloeo</sub>, *CcyA*<sub>S.6312</sub>, *CcyA*<sub>C.7425</sub> chez *E. coli*. En effet, durant mon stage de M2 il était apparu que la protéine *CcyA* de *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 exprimée chez *E. coli* était cytoplasmique alors que la protéine *CcyA* de *Gloeomargarita lithophora* exprimée chez *E. coli* était membranaire (Görge 2017).

Enfin, les observations dans la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312 semblent montrer une localisation au niveau des membranes et dans quelques cellules au niveau des pôles. Il serait donc intéressant de connaître la localisation chez une souche formant les iACC réparties dans le cytoplasme comme *Cyanothece* sp. PCC 7425 ou encore chez une souche présentant un domaine N-ter différent du domaine HMA-like, comme la souche *Gloeomargarita lithophora*. Mais aussi d'introduire les constructions permettant de produire les protéines Calcyanines de *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Gloeomargarita lithophora* dans la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312 afin de savoir si ces protéines se localiseraient aussi à la membrane ou seraient réparties dans le cytoplasme (localisation naturelle des iACC chez *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Gloeomargarita lithophora*).



# Matériels et Méthodes

## I. Les souches utilisées, leurs conditions de culture et leur conservation

### A. Les souches de cyanobactéries et d'*Escherichia coli*

Les souches de cyanobactéries nommées PCC proviennent de la collection de l'Institut Pasteur (Pasteur Collection Cyanobacteria). *Gloeomargarita lithophora* ne provient pas de collection : elle a été isolée à partir de microbialites du lac Alchichica au Mexique par (Couradeau et al. 2012). Elle est disponible dans les collections CCAP (strain 1437/1) et du Museum National d'Histoire Naturelle à Paris (PMC 919.15) (Moreira et al. 2017).

Tableau 15 : Listes des souches de cyanobactéries étudiées

| Souches                                                  | ACC + | Calcyanine<br>(présence et domaines) |              | Localisation des<br>iACC  | Sélectionnées<br>pour la<br>génétique |
|----------------------------------------------------------|-------|--------------------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------------------|
| <i>Synechocystis</i> sp.<br>PCC 6803                     | non   | non                                  |              |                           | oui                                   |
| <i>Synechococcus</i><br><i>elongatus</i> PCC<br>7942     | non   | non                                  |              |                           | oui                                   |
| <i>Synechococcus</i> sp.<br>PCC 6312                     | oui   | oui                                  | HMA-<br>Gly3 | Aux pôles et au<br>septum | oui                                   |
| <i>Cyanothece</i> sp.<br>PCC 7425                        | oui   | oui                                  | HMA-<br>Gly3 | Dispersées                | oui                                   |
| <i>Synechococcus</i><br><i>Calcipolaris</i> PCC<br>11701 | oui   | oui                                  | HMA-<br>Gly3 | Aux pôles et au<br>septum | non                                   |
| <i>Gloeomargarita</i><br><i>lithophora</i>               | oui   | oui                                  | X-Gly3       | Dispersées                | non                                   |
| <i>Synechococcus</i> sp.<br>PCC 6716                     | oui   | oui                                  | HMA-<br>Gly3 | Aux pôles et au<br>septum | non                                   |
| <i>Synechococcus</i> sp.<br>PCC 6717                     | oui   | oui                                  | HMA-<br>Gly3 | Aux pôles et au<br>septum | non                                   |
| <i>Neosynechococcus</i><br><i>sphagnicola</i><br>sy1     | oui   | oui                                  | HMA-<br>Gly3 | Dispersées                | non                                   |

ACC + : souches formant des iACC

Tableau 16 : Souches d'*Escherichia coli* utilisées

| Souches                      | Génotype                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Intérêt                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Provenance               |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| <i>E. coli</i> TOP 10        | F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> )<br>φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i><br>Δ( <i>ara-leu</i> ) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> )<br><i>endA1</i> <i>nupG</i> λ-                                                                                                           | Utilisation pour le clonage de <i>ccyA</i> dans les plasmides et l'amplification de plasmides                                                                                                                                                                                                                                                          | Invitrogen™              |
| <i>E. coli</i> NEB10β        | Δ( <i>ara-leu</i> ) 7697 <i>araD139</i> <i>fhuA</i> Δ <i>lacX74</i><br><i>galK16</i> <i>galE15</i> <i>e14-</i> φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i><br><i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>rph</i><br><i>spoT1</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ).                                                                      | Utilisation pour le clonage de <i>ccyA</i> dans les plasmides et l'amplification de plasmides                                                                                                                                                                                                                                                          | New England BioLabs® Inc |
| <i>E. coli</i> C43           | F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>hsdS</i> <sub>B</sub> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup></i> <i>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) (DE3)<br><br>La souche C43(DE3) dérive de la souche C41(DE3) dérivant elle-même de la souche BL21(DE3)                                                                                                           | Classiquement sert pour amplifier des plasmides portant les gènes toxiques pour <i>E.coli</i> ou codant pour des protéines membranaires et permet l'expression des gènes de fusion correspondant<br><br>Ici a servi pour maintenir et réaliser le transfert des plasmides pSBT <i>ac ccyA-egfp</i> et pSBT <i>ac egfp-ccyA</i> dans les cyanobactéries | Invitrogen™              |
| <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) | <i>E. coli</i> str. B<br>F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lon?</i> <i>hsdS</i> <sub>B</sub> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup></i> <i>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> )<br>λ(DE3 [ <i>lacI</i> <i>lacUV5-T7p07</i> <i>ind1</i> <i>sam7</i> <i>nin5</i> ])<br>[ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <i>proL</i> <i>ori<sub>p15A</sub></i> ](Cm <sup>R</sup> ) | Amplification des plasmides portant le gène fusion <i>ccyA-egfp</i> et transfert par conjugaison dans les cyanobactéries                                                                                                                                                                                                                               | Invitrogen™              |
| <i>E. coli</i> CM404         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Contient le plasmide mobilisation prK2013 (Km <sup>R</sup> ), utilisé lors des conjugaisons.                                                                                                                                                                                                                                                           |                          |

## B. Les conditions de culture

Les souches de cyanobactéries utilisées comme *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 6312, *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701, *Gloeomargarita lithophora*, *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Neosynechococcus sphagnicola* Sy1, *Synechococcus* sp. PCC 6717 et *Synechococcus* sp. PCC 6716 ont été cultivées en milieu liquide dans trois types de milieux : le BG11 ; le milieu minéral appelé MM qui est du BG11 enrichi en carbonate ; ou bien du MM enrichi en carbonate et en calcium (MM++) (Tableau 17). Pour les croissances sur milieu solide de l'agar Difco à 10g/L a été ajouté.

Toutes les souches de cyanobactéries utilisées ont été cultivées sous un éclairage provenant de néons émettant une lumière de qualité « cool white. » *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 6312, *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701 et *Cyanothece* sp. PCC 7425 ont été cultivées sur milieu solide ou en milieu liquide en lumière continue à 2000/2500 lux, et *Gloeomargarita lithophora* et *Neosynechococcus sphagnicola* Sy1 ont été cultivées à 700/500 lux. Les cultures liquides sont agitées en permanence dans les incubateurs éclairés infors (140 rpm).

Les mutants de *Synechocystis* sp. PCC 6803 et de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 possédant des plasmides d'expression de *ccyA* dérivés du pFC1 ou pC ont été cultivés avec 5 µg/mL de Streptomycine/Spectinomycine (Sm/Sp) tandis que ceux de *Synechococcus* sp. PCC 6312 et *Cyanothece* sp. PCC 7425 ont été cultivés avec 3 µg/mL de Sm.

La densité optique pour évaluer la croissance a été mesurée à 750 nm avec différents spectromètres : UVICON-SECOMAN et Prim du fournisseur Secoman selon les expériences .

Tableau 17 : Composition des milieux de culture -BG11, MM, MM++-

| BG11                                                | mM                | MM                                                  | mM    | MM ++                                               | mM    |
|-----------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------|-------|-----------------------------------------------------|-------|
| NaNO <sub>3</sub>                                   | 17,66             | NaNO <sub>3</sub>                                   | 17,66 | NaNO <sub>3</sub>                                   | 17,66 |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O | 0,230             | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O | 0,230 | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O | 0,230 |
| MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O               | 0,304             | MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O               | 0,304 | MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O               | 0,304 |
| CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O               | 0,250 ou<br>0,050 | CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O               | 0,250 | CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O               | 2,5   |
| Acide citrique anhydre                              | 0,031             | Acide citrique                                      | 0,031 | Acide citrique                                      | 0,031 |
| Fer ammonium citrate                                | 0,022             | Fer ammonium citrate                                | 0,016 | Fer ammonium citrate                                | 0,016 |
| IDRANAL                                             | 0,003             | EDTA                                                | 0,003 | EDTA                                                | 0,003 |
| NaHCO <sub>3</sub>                                  | 0,476             | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                     | 1,903 | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                     | 1,903 |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 0,046             | HEPES                                               | 2     | HEPES                                               | 2     |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                | 0,009,1           | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 0,046 | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 0,046 |

|                                                       |         |                                                         |         |                                                         |             |
|-------------------------------------------------------|---------|---------------------------------------------------------|---------|---------------------------------------------------------|-------------|
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                  | 0,0007  | MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                    | 0,009,1 | MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                    | 0,009,1     |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O  | 0,0019  | ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                   | 0,0007  | ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                   | 0,007       |
| CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O                 | 0,00049 | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .<br>2H <sub>2</sub> O | 0,0019  | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .<br>2H <sub>2</sub> O | 0,0019      |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O | 0,00027 | CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O                   | 0,00049 | CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O                   | 0,0004<br>9 |
|                                                       |         | Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O    | 0,0027  | Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub><br>O | 0,0027      |
|                                                       |         |                                                         |         | NaHCO <sub>3</sub>                                      | 9,523       |

Les souches d'*Escherichia coli*, TOP 10, NEB10 β, C43 et Rosetta ont été cultivées à 37°C, 30°C ou bien à température ambiante dans du LB et en présence d'antibiotiques adéquats selon le plasmide ; Sm/Sp 25/75 µg/mL, Kanamycine 50 µg/mL, ampicilline 100 µg/mL.

Les densités optiques ont été prises avec différents spectromètres à 750 nm (UVICON-SECOMAN et Prim du fournisseur Secoman).

### C. La congélation

Les souches d'*E. coli* ont été congelées à -80°C, avec du glycérol à 20%. Les souches de cyanobactéries ont été cultivées jusqu'à forte densité puis congelées dans de l'azote liquide avec ajout de 90 µl de DMSO pour 1710 µl de culture concentrée. Toutes les souches sont répertoriées dans la souchothèque du laboratoire.

## II. Construction et vérification des plasmides

### A. Les plasmides utilisés

Le tableau 18 regroupe les plasmides de clonage et d'expression utilisés pour construire les cassettes de délétion et les cassettes d'expression.

Tableau 18 : Plasmides utilisés et construction des cassettes de délétion et d'expression de *ccyA*

| Plasmides utilisés pour les constructions                              | Caractéristiques                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Référence/Provenance                        |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| pUC-18                                                                 | Vecteur de clonage Amp <sup>r</sup> , utilisé pour construire la cassette de délétion du <i>ccyA</i> chez <i>Synechococcus</i> PCC 6312                                                                                                                                                                                                                                   |                                             |
| pΔccyA <sub>C.7425</sub>                                               | Vecteur de clonage pEX Amp <sup>r</sup> , utilisé pour construire la cassette de délétion du <i>ccyA</i> chez <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425, contenant les régions d'homologie a et b entourant le site <i>Sma</i> I                                                                                                                                                     | Société Genecust                            |
| pUC4K                                                                  | Vecteur de clonage à partir duquel la cassette Km a été récupérée                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                             |
| pFC1 (appelé pT)                                                       | Plasmide d'expression Sm <sup>r</sup> /Spr <sup>r</sup> /Cm <sup>r</sup> contenant le gène répresseur thermosensible Ci857, provenant du bactériophage lambda, permettant la thermorégulation du promoteur ( <i>pR</i> ). A 30°C, la protéine n'est pas produite, à 34°C elle l'est moyennement et à 39°C le répresseur est dénaturé, la protéine est fortement produite. | (Mermet-Bouvier and Chauvat 1994)           |
| pFC1ΔCi857 (appelé pC)                                                 | Plasmide d'expression Sm <sup>r</sup> /Spr <sup>r</sup> /Cm <sup>r</sup> dont le gène répresseur thermosensible Ci857 a été tronqué via l'enzyme <i>Psi</i> I. Le promoteur <i>pR</i> n'est plus régulé et la protéine est fortement produite.                                                                                                                            | (Veaudor, Cassier-Chauvat, et Chauvat 2019) |
| pSB2A-Tac                                                              | Plasmide d'expression Sm <sup>r</sup> /Spr <sup>r</sup> /Cm <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup> , contenant le promoteur Tac. L'expression de la protéine est forte et constitutive.                                                                                                                                                                                            | (Marraccini et al. 1993)                    |
| Construction des cassettes de <u>délétion</u> pour le gène <i>ccyA</i> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                             |
|                                                                        | Caractéristiques                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                             |
| pΔccyA <sub>S.6312</sub> ::Sp <sup>r</sup> /Sm <sup>r</sup>            | Amp <sup>r</sup> /Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup> , Plasmide utilisé pour la suppression du <i>ccyA</i> chez <i>Synechococcus</i> PCC 6312, <i>ccyA</i> remplacé par la Sp/Sm                                                                                                                                                                                            |                                             |
| pΔccyA <sub>C.7525</sub> ::Sp <sup>r</sup> /Sm <sup>r</sup>            | Amp <sup>r</sup> /Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup> , Plasmide utilisé pour la suppression du <i>ccyA</i> chez <i>Cyanothece</i> PCC 7425, <i>ccyA</i> remplacé par la Sp/Sm                                                                                                                                                                                               |                                             |

|                                            |                                                                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pΔccyA <sub>C.7525</sub> ::Km <sup>r</sup> | Amp <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup> , Plasmide utilisé pour la suppression du <i>ccyA</i> chez <i>Cyanothece</i> PCC 7425, <i>ccyA</i> remplacé par la Km                                        |
|                                            |                                                                                                                                                                                                |
| Nom des cassettes d'expression             | Caractéristiques                                                                                                                                                                               |
| pT- <i>ccyA</i> <sub>S.11701</sub>         | Gène <i>ccyA</i> de <i>Synechococcus calcipolaris</i> PCC 11701 dans le vecteur pFC1 entre les sites de restriction <i>Nde</i> 1 et <i>Eco</i> R1                                              |
| pT- <i>ccyA</i> <sub>Gloeo</sub>           | Gène <i>ccyA</i> de <i>Gloeomargarita lithophora</i> dans le vecteur pFC1 entre les sites de restriction <i>Nde</i> 1 et <i>Eco</i> R1                                                         |
| pT- <i>ccyA</i> <sub>C.7425</sub>          | Gène <i>ccyA</i> de <i>Cyanothece</i> PCC 7425 dans le vecteur pFC1 entre les sites de restriction <i>Nde</i> 1 et <i>Eco</i> R1                                                               |
| pT- <i>ccyA</i> <sub>S.6312</sub>          | Gène <i>ccyA</i> de <i>Synechococcus</i> PCC 6312 dans le vecteur pFC1 entre les sites de restriction <i>Nde</i> 1 et <i>Eco</i> R1                                                            |
| pT                                         | Vecteur pT sans gène cloné                                                                                                                                                                     |
| pC- <i>ccyA</i> <sub>S.11701</sub>         | Gène <i>ccyA</i> de <i>Synechococcus calcipolaris</i> PCC 11701 cloné dans le vecteur pFC1-Δ <i>cl</i> <sub>857</sub> constitutif entre les sites de restriction <i>Nde</i> 1 et <i>Eco</i> R1 |
| pC- <i>ccyA</i> <sub>Gloeo</sub>           | Gène <i>ccyA</i> de <i>Gloeomargarita lithophora</i> cloné dans le vecteur pFC1-Δ <i>cl</i> <sub>857</sub> constitutif entre les sites de restriction <i>Nde</i> 1 et <i>Eco</i> R1            |
| pC- <i>ccyA</i> <sub>C.7425</sub>          | Gène <i>ccyA</i> de <i>Cyanothece sp.</i> PCC 7425 cloné dans le vecteur pFC1-Δ <i>cl</i> <sub>857</sub> constitutif entre les sites de restriction <i>Nde</i> 1 et <i>Eco</i> R1              |
| pC- <i>ccyA</i> <sub>S.6312</sub>          | Gène <i>ccyA</i> de <i>Synechococcus sp.</i> PCC 6312 cloné dans le vecteur pFC1-Δ <i>cl</i> <sub>857</sub> constitutif entre les sites de restriction <i>Nde</i> 1 et <i>Eco</i> R1           |
| pC                                         | Vecteur pC constitutif sans gène cloné entre les sites de restriction <i>Nde</i> 1 et <i>Eco</i> R1                                                                                            |
| CcyA <sub>Gloeo</sub> -eGFP                | Clonage du gène <i>ccyA</i> de <i>Gloeomargarita lithophora</i> en N-ter et du gène de la <i>egfp</i> en C-ter dans le plasmide pSB2A-Tac                                                      |
| eGFP-CcyA <sub>Gloeo</sub>                 | Clonage du gène <i>ccyA</i> de <i>Gloeomargarita lithophora</i> en C-ter et du gène de la <i>egfp</i> en N-ter dans le plasmide pSB2A-Tac                                                      |
| CcyA <sub>C.7425</sub> -eGFP               | Clonage du gène <i>ccyA</i> de <i>Cyanothece</i> PCC 7425 en N-ter et du gène de la <i>egfp</i> en C-ter dans le plasmide pSB2A-Tac                                                            |
| eGFP-CcyA <sub>C.7425</sub>                | Clonage du gène <i>ccyA</i> de <i>Cyanothece</i> PCC 7425 en C-ter et du gène de la <i>egfp</i> en N-ter dans le plasmide pSB2A-Tac                                                            |

|                              |                                                                                                                                        |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ccya <sub>S.6312</sub> -eGFP | Clonage du gène <i>ccyA</i> de <i>Synechococcus</i> PCC 6312 en N-ter et du gène de la <i>egfp</i> en C-ter dans le plasmide pSB2A-Tac |
| eGFP-Ccya <sub>S.6312</sub>  | Clonage du gène <i>ccyA</i> de <i>Synechococcus</i> PCC 6312 en C-ter et du gène de la <i>egfp</i> en N-ter dans le plasmide pSB2A-Tac |

## B. Extraction, purification et concentration des ADN

### 1. Extraction et purification des plasmides à partir de souches d'*Escherichia coli*

Tous les plasmides ont été extraits et purifiés à partir du protocole du kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure en suivant les instructions du fournisseur (Macherey-Nagel).

### 2. Purification des produits de PCR

Les produits de PCR ont tous été purifiés grâce au kit QIAquick PCR Purification en suivant les instructions du fournisseur (Qiagen).

### 3. Purification des ADN après digestion

Les plasmides comme pFC1 et pFC1ΔcI<sub>857</sub>, après digestion par des enzymes de restriction, ont été purifiés via le protocole de purification d'ADN en présence d'éthanol : 1/10<sup>ème</sup> du volume de sodium acétate est ajouté à l'ADN, puis posé sur glace pendant 5 min. 2,5 fois le volume d'éthanol 100% y est ajouté ; la solution est ensuite laissée toute la nuit à -20°C. L'ADN est centrifugé 30 min à 14 rpm à 4°C. Le surnageant est enlevé et l'ADN est repris puis centrifugé 30 min à 14 rpm à 4°C avec 500 µL d'éthanol 70%. L'ADN est ensuite repris avec du tampon d'élution.

Certains ADN ont été purifiés sur gel grâce au kit NucleoSpin, Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel. Les ADN ont migré sur gel 0,8% d'agarose pour bien séparer le gène d'intérêt du plasmide dont les tailles sont différentes puis les gènes ont été purifiés selon les recommandations du fournisseur.

## 4. Concentration d'ADN

La concentration de tous les ADN (ADN plasmidiques ou produits PCR) a été mesurée grâce au NanoDrop (ThermoFischer Scientific).

### C. Obtention des fragments d'ADN et vérification des plasmides par PCR

#### 1. Par Polymerase Chain Reaction

##### a) Taq polymérase

Les amplifications d'ADN ont été réalisées par la Taq polymérase recombinante (EP0402 ; ThermoScientific) afin de valider les mutants d'*E. coli* ou de cyanobactéries. La préparation du milieu réactionnel a été faite suivant le protocole du fournisseur.

Tableau 19 : Programme de la Taq polymérase, recombinante

| Cycles de la Taq polymérase, recombinante |                  |        |                  |
|-------------------------------------------|------------------|--------|------------------|
| Étapes de cycle                           | Température (°C) | Temps  | Nombres de cycle |
| Dénaturation de l'ADN                     | 94               | 3 min  | 1                |
| Dénaturation<br>Hybridation<br>Élongation | 94               | 45 s   | 35               |
|                                           | x                | 30 s   |                  |
|                                           | 72               | x s    |                  |
| Élongation finale                         | 72               | 10 min | 1                |
|                                           | 4°C              | ∞      |                  |

x signifie que la température d'hybridation et le temps d'élongation sont dépendants de la séquence à amplifier

## b) Phusion polymérase

Les amplifications d'ADN, pour le clonage ou le séquençage, ont été réalisées par la Phusion ADN polymerase (F530S ; ThermoScientific). La préparation du milieu réactionnel a été faite suivant le protocole du fournisseur.

Tableau 20 : Programme de la Phusion polymérase

| Cycles de la Phusion AND polymérase       |                  |        |                  |
|-------------------------------------------|------------------|--------|------------------|
| Étapes de cycle                           | Température (°C) | Temps  | Nombres de cycle |
| Dénaturation de l'ADN                     | 98               | 30 s   | 1                |
| Dénaturation<br>Hybridation<br>Élongation | 98               | 10 s   | 35               |
|                                           | x                | 30 s   |                  |
|                                           | 72               | x s    |                  |
| Élongation finale                         | 72               | 10 min | 1                |
|                                           | 4°C              | ∞      |                  |

x signifie que la température d'hybridation et le temps d'élongation sont dépendants de la séquence à amplifier

## c) PCR sur colonies à partir de cellules d'*Escherichia coli* et de cyanobactéries

La colonie isolée d'intérêt a été reprise dans 50 µL d'H<sub>2</sub>O MiliQ. Puis les cellules ont été lysées grâce au programme de lyse. Le mix a ensuite été centrifugé, et 10 µL du surnageant ont été récupérés et mélangés dans le mix réactionnel.

Tableau 21 : Programme de la lyse cellulaire

| Étape 1 | Étape 2 | Étape 3 | Étape 4 | Étape 5 |     |
|---------|---------|---------|---------|---------|-----|
| 96°C    | 50°C    | 96°C    | 45°C    | 96°C    | 4°C |
| 5 min   | 1min30  | 1min30  | 1 min   | 1 min   | ∞   |

**d) Vérification des clones d'*Escherichia coli* et de cyanobactéries**

Après chaque transformation et/ou conjugaison dans les souches d'*Escherichia coli* et de cyanobactéries, les clones obtenus ont été vérifiés par PCR pour ensuite être séquencés.

**Tableau 22 : Amorces utilisées pour tester les clones obtenus après électroporation ou transformation naturelle chez *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312**

| nom                                                                                             | Séquence 5'- 3'                      | Localisation de l'amorce                                           | Programme PCR                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Amorces utilisées sur les clones obtenus après transformation de <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425 |                                      |                                                                    |                                                                               |
| 7425 Fw                                                                                         | ATGACATCCACC<br>TCTGTGAA             | Sur le début du gène <i>ccyA</i> de <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425 | Taq polymérase ;<br>hybridation : 56°C ;<br>élongation : 1 min 50             |
| 7425 Rv                                                                                         | AAGCTTCAGCCT<br>GGATGATT             | Sur la fin du gène <i>ccyA</i> de <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425   |                                                                               |
| Km_int_Fw                                                                                       | CTTGCTCGAGGC<br>CGCGATTAAATT<br>CCAA | Dans le gène Km                                                    | + 7425 Rv : Taq<br>polymérase ;<br>hybridation : 5°C ;<br>élongation : 1min20 |

|                                                                                                    |                                          |                                               |                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Km_int_Rv                                                                                          | TCGTGAAGAAG<br>GTGTTGCTGACT<br>CATAC     | Dans le gène Km                               | + 7425 Fw : Taq<br>polymérase ;<br>hybridation : 5°C ;<br>élongation : 1min20 |
| Amorces utilisées sur les clones obtenus après transformation de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312 |                                          |                                               |                                                                               |
| 6312_seqUP_Fw                                                                                      | GGATATTGCCG<br>ACTTAGCCGGA<br>CA         | Sur la région<br>d'homologie C (Figure<br>40) | Taq polymérase ;<br>hybridation : 65°C ;<br>élongation : 1 min 40             |
| Sm/Sm_Rv                                                                                           | GCGTGCATAAT<br>AAGCCCTACAC<br>AAATTGGGAG | A la fin du gène Sm/Sm                        |                                                                               |
| Sm/Sp_Fw                                                                                           | GCGCTCACGCA<br>ACTGGTCCAG                | Au début du gène<br>Sm/Sp                     | Taq polymérase ;<br>hybridation : 65°C ;<br>élongation : 1 min 40             |
| 6312_seqDOWN_Rv                                                                                    | TCAACTCGGTGA<br>TAGACCGTTTGT<br>ACTGC    | Sur la région<br>d'homologie D (Figure<br>40) |                                                                               |

Tableau 23 : Amorces utilisées pour la vérification après construction et transformation dans *E. coli* des plasmides de délétion pAccyAc.7525::Sp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup>, pAccyAc.7525::Km<sup>r</sup>, pAccyAs.6312::Sp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup>

| Nom              | Séquence 5'-3'                        | Localisation des amorces         | Programme PCR                                                    |
|------------------|---------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Km_A9_Fw         | GAGCCATATT<br>CAACGGGAA<br>ACGT       | Sur le gène Km                   | + pEX-A_Rv, Taq ;<br>hybridation : 65°C ;<br>élongation 1 min 30 |
| Km_R9_Rv         | GAGCCATATT<br>CAACGGGAA<br>ACGT       | Sur le gène Km                   | + pEX-A_Fw, Taq ;<br>hybridation : 65°C ;<br>élongation 1 min 30 |
| pEX-A_Fw         | GGAGCAGAC<br>AAGCCCGTCA<br>GG         | Avant la séquence<br>en amont a. | Taq ; hybridation : 65°C ;<br>élongation : 2 min                 |
| pEX-A_Rv         | GCCGGAAGC<br>ATAAAGTGT<br>AAAGCCTG    | Après la séquence<br>en amont b. |                                                                  |
| 6312_seqUP_Fw    | GGATATTGCC<br>GACTTAGCCG<br>GACA      | Sur la séquence c.               | Taq ; hybridation : 69°C ;<br>élongation 2 min                   |
| 6312_seqDOWN_Rv  | TCAACTCGGT<br>GATAGACCG<br>TTTGTACTGC | Sur la séquence d.               |                                                                  |
| Sp/Sp Fw         | GCGCTCACGC<br>AACTGGTCCA<br>G         | Sur le gène Sp/Sm                | Taq ; hybridation : 53°C ;<br>élongation : 1 min 40              |
| 7425.seq.homo Rv | TTCATTTCTG<br>CATAACCCAG              | Sur la région<br>d'homologie b.  |                                                                  |

|                  |                                             |                                                                                            |                                                     |
|------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Sp/Sm Rv         | CTCCAATTT<br>GTGTAGGGC<br>TTATTATGCA<br>CGC | Sur le gène Sp/Sm                                                                          | Taq ; hybridation : 53°C ;<br>élongation : 1 min 40 |
| 7425.seq.homo Fw | TACTTCCACA<br>TCCTAGAATC                    | Sur la région<br>d'homologie a.                                                            |                                                     |
| KmHincII-Fw      | ACCTGCAGGG<br>GGGGGGGGG<br>AAAGCCAC         | Récupération de la<br>cassette Km à partir<br>du pUC4K et ajout<br>des sites <i>HincII</i> | Taq ; hybridation : 60°C ;<br>élongation : 1 min 45 |
| KmHincII-Rv      | GGCGCTGAGG<br>TCTGCCT<br>CGTGAAGAA<br>G     |                                                                                            |                                                     |

Tableau 24 : Amorces utilisées pour les PCR sur le plasmide pSB2A-Tac-Ccya-eGFP

| nom                        | Séquence 5'- 3'             | Localisation sur<br>le plasmide                                | Programme<br>PCR                                                       |
|----------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Taq pR<br>pSB2A-<br>Tac_Fw | CGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTT  | Sur le plasmide<br>pSB2A-Tac en<br>amont du<br>promoteur       | Taq<br>polymérase ;<br>hybridation :<br>64°C<br>Élongation :<br>2min30 |
| Cm<br>pSB2A-<br>Tac_Rv     | TAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCG | Sur le plasmide<br>pSB2A-Tac sur<br>le gène<br>chloramphénicol |                                                                        |

Concernant les souches d'*Escherichia coli* et de cyanobactéries transformées ou conjuguées avec les plasmides d'expression (Tableau 28), les amorces utilisées sont dans le Tableau 25 : pFC1 Fw et pFC1 Rv.

Tableau 25 : amorces utilisées pour le séquençage et/ou la construction des cassettes d'expression du *ccyA*<sub>S.6312</sub>, *ccyA*<sub>C.7425</sub>, *ccyA*<sub>S.11701</sub>, *ccyA*<sub>Gloeo</sub> dans les souches *Synechococcus* sp. PCC 6312, *Cyanotheca* sp. PCC 7425, *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus elongatus* PCC 7942

| nom            | Séquence 5' - 3'                                       | Localisation des amorces                           | Programme PCR                                    |
|----------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| pFC1 PRA1 (Fw) | GGCGACGTGC<br>GTCCTCAAGC                               | Sur le plasmide pFC1, en amont du promoteur        | Phusion ; hybridation : 54°C ; élongation : 40 s |
| pFC1 RER1 (Rv) | GTGTAACAAG<br>GGTGAACAC                                | Sur le plasmide pFC1, sur le gène chloramphénicole |                                                  |
| 7425 Fw        | ATGACATCCA<br>CCTCTGTGAA                               | Sur le début du gène <i>ccyA</i> <sub>C.7425</sub> | Phusion ; hybridation : 55°C ; élongation : 35 s |
| 7425 Rv        | AAGCTTCAGC<br>CTGGATGATT                               | Sur la fin du gène <i>ccyA</i> <sub>C.7425</sub>   |                                                  |
| 6312 Fw        | ATGAGCAGCA<br>CATCCCCATC<br>CTCT                       | Sur le début du gène <i>ccyA</i> <sub>S.6312</sub> | Phusion ; hybridation : 65°C ; élongation : 35 s |
| 6312 Rv        | CGCAATCGTC<br>TCAGTAC<br>TCCGAACAAA                    | Sur la fin du gène <i>ccyA</i> <sub>S.6312</sub>   |                                                  |
| 7425_Nde1_Fw   | TTCAGTGAGG<br>CAGCCCAT<br>ATGACATCC<br>ACCTCTGTGA<br>A | Ajout du site <i>Nde1</i> en amont du <i>ccyA</i>  | Phusion ; hybridation : 65°C ; élongation : 35 s |
| 7425_EcoR1_Rv  | CGATGCCCAA<br>CTTCTAG                                  | Ajout du site <i>EcoR1</i> en aval du <i>ccyA</i>  |                                                  |

|                        |                                                                        |                                                      |                                                     |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|                        | AAGAATTCAA<br>GCTTCAGCCT<br>GGATGATT                                   |                                                      |                                                     |
| 6312_gene_Nde1<br>_Fw  | CCTGGCAGTT<br>GGCCCCTCCA<br>TATG<br>AGCAGCACAT<br>CCCCATCCTC<br>TA     | Ajout du site <i>Nde1</i> en<br>amont du <i>ccyA</i> | Phusion ; hybridation :<br>65°C ; élongation : 40 s |
| 6312_gene_EcoR<br>1_Rv | ATTACCGCTC<br>TTTAGAG<br>GGAATTCCGC<br>AATCGTCTCA<br>GTACTCCGAA<br>CAA | Ajout du site <i>EcoR1</i> en<br>aval du <i>ccyA</i> |                                                     |

## D. Construction des plasmides

### 1. Digestion enzymatique et ligation

Certains plasmides ont été construits via le principe de digestion/ligation. Les digestions par restriction enzymatique ont été réalisées en suivant les recommandations du fournisseur (New England BioLabs) selon l'enzyme utilisée.

Tableau 26 : **Enzymes de digestion utilisées**

| Enzymes             | <i>Nde1</i> | <i>EcoR1</i> | <i>Sma1</i> | <i>pVUII</i> | <i>HincII</i> | <i>Hpa1</i> |
|---------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|---------------|-------------|
| Tampons             | CutSmart    | CutSmart     | CutSmart    | CutSmart     | CutSmart      | CutSmart    |
| °C<br>d'activation  | 37 °C       | 37°C         | 37°C        | 37°C         | 37°C          | 37°C        |
| Temps de la<br>lyse | 10 h        | 10h          | 2h          | 2h           | 2h            | 2h          |

|                                   |                                                                      |          |                          |                                                                                                           |                                                 |           |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------|
| Plasmide digéré ou produit de PCR | pC, pT et pΔccyA <sub>S.6312</sub> ::S <sup>r</sup> /Sm <sup>r</sup> | pC et pT | pΔccyA <sub>C.7425</sub> | pΔccyA <sub>C.7425</sub> ::Sp <sup>r</sup> /Sm <sup>r</sup> et pΔccyA <sub>C.7425</sub> ::Km <sup>r</sup> | Séquence Km récupérée par PCR à partir du pUC4K | pSB2A-Tac |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------|

### a) Clonage des cassettes de délétion de *ccyA*

Concernant le clonage du plasmide pΔccyA<sub>C.7425</sub>::Km<sup>r</sup> : le plasmide pΔccyA<sub>C.7425</sub> a été synthétisé par la société GENECUST. Il contient les régions d'homologie a et b séparées par le site de restriction *Sma*I. Ce plasmide a été digéré par l'enzyme *Sma*I. La cassette kanamycine (contenant le promoteur, le site A initiateur, le RBS ainsi que le gène conférant la résistance à la Km) a été récupérée par PCR grâce à des amorces spécifiques KmHincII-Fw et KmHincII-Rv, permettant d'ajouter les sites de restriction *Hinc*II de part et d'autre de la cassette.

### b) Clonage des cassettes d'expression du *ccyA*

Les plasmides d'expression pFC1 (pT) et pFC1ΔcI<sub>857</sub> (pC) ont été d'abord digérés par l'enzyme *Nde*I, puis l'ADN a été purifié via le protocole de purification d'ADN en présence d'éthanol, puis digéré une seconde fois par l'enzyme *Eco*R1 et enfin purifié à nouveau en présence d'éthanol.

Les 2 gènes *ccyA*<sub>Gloeo</sub> et *ccyA*<sub>S.11701</sub> ont été synthétisés et clonés dans les plasmides de clonage pUC-Sp entre les sites de restriction *Nde*I et *Eco*R1 par la société GENECUST. Les séquences des deux gènes avaient été optimisées avec le biais de codon de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Une double digestion par les enzymes *Nde*I et *Eco*R1 a été réalisée puis les gènes ont été purifiés sur gel.

Les 2 gènes *ccyA*<sub>S.6312</sub> et *ccyA*<sub>C.7425</sub> ont été récupérés par PCR sur les cellules de cyanobactéries, en utilisant des amorces spécifiques (Tableau 25). Les fragments d'ADN ont ensuite été purifiés par le kit QIAquick PCR Purification. Via des PCR (Tableau 25), des sites de restriction *Nde*I et *Eco*R1 ont été ajoutés de part et d'autre des 2 gènes *ccyA*<sub>S.6312</sub> et *ccyA*<sub>C.7425</sub>. Une double digestion par les enzymes *Nde*I et *Eco*R1 a été réalisée et les ADN ont été purifiés par le kit QIAquick PCR Purification.

Après la digestion enzymatique, les ligations ont été réalisées avec le kit Quick Ligation (New England Biolabs) en suivant les recommandations du fournisseur. Les séquences des 2 gènes *ccyA*<sub>S.6312</sub> et *ccyA*<sub>C.7425</sub> n'ont pas été optimisées pour l'expression dans *Synechocystis* sp. PCC 6803.

### c) Clonage des cassettes d'expression du gène fusion *ccyA-egfp*

Les gènes *ccyA<sub>S.6312</sub>* et *ccyA<sub>C.7425</sub>* et *ccyA<sub>Gloeo</sub>*, ainsi que le gène codant pour la protéine eGFP ont été clonés dans le plasmide d'expression pSB2A-Tac, entre les sites de restriction *EcoRV* et *Hpa1*. Deux versions de chaque construction ont été réalisées avec le gène *ccyA* cloné en N-ter ou en C-ter. Entre le *ccyA* et le gène *egfp* un linker flexible a été ajouté ; celui-ci est composé de glycine et de sérine : GGGGSGGGGS (Figure 66). Le biais de codon utilisé pour la séquence nucléotidique du linker est celui de *Synechocystis* sp. PCC 6803, optimisant ainsi son expression dans les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Les séquences des gènes *ccyA<sub>S.6312</sub>* et *ccyA<sub>C.7425</sub>* et *ccyA<sub>Gloeo</sub>* n'ont pas été optimisées : les séquences d'origine ont été gardées.

### d) Linéarisation des plasmides pour les expériences de transformation

Les plasmides pΔ*ccyA<sub>C.7425</sub>*::Sp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup> et pΔ*ccyA<sub>C.7425</sub>*::Km<sup>r</sup> ont été linéarisés par l'enzyme de restriction *PvuII* et le plasmide pΔ*ccyA<sub>S.6312</sub>*::Sp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup> a été linéarisé par l'enzyme *NdeI*.

## 2. Assemblage des cassettes de délétion par la technique Gibson

Les clonages par assemblage d'ADN ont été réalisés avec le kit NEB HiFi DNA Assembly Cloning Kit (New England BioLabs) selon le protocole du fournisseur.

**Tableau 27 : amorces utilisées pour la construction des cassettes de délétion p $\Delta$ ccyA<sub>S.6312</sub>::Sp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup> et p $\Delta$ ccyA<sub>C.7425</sub>::Sp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup> du gène *ccyA* chez *Synechococcus* sp. PCC 6312 et *Cyanothece* sp. PCC 7425 par la technique Gibson**

| Nom                         | Séquence 5'- 3'                                        | Localisation des amorces                                                                            | Programme                                         |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 6312_seqUP_Fw               | GGATATTGCCGACTTAGCC<br>GGACA                           | Permet de récupérer la région d'homologie c à partir du génome de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312 | Phusion ; hybridation : 69 °C ; élongation : 15 s |
| 6312_seqUP_Rv               | AGAGGATGGGGATGTGCTG<br>CTCAT                           |                                                                                                     |                                                   |
| 6312_seqDOWN_Fw             | GTAAGGAGACGATTGCGCC<br>TCTAAAGAG                       | Permet de récupérer la région d'homologie d à partir du génome de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312 | Phusion ; hybridation : 69 °C ; élongation : 15 s |
| 6312_seqDOWN_Rv             | TCAACTCGGTGATAGACCG<br>TTTGTACTGC                      |                                                                                                     |                                                   |
| 6312_overlap_seqUP_Sp/Sm_Fw | ATGAGCAGCACATCCCCAT<br>CCTCTGCGCTCACGCAACTG<br>GTCCA   | permet de créer un chevauchement entre la région c et la séquence Sm/Sp                             | Phusion ; hybridation : 62°C ; élongation : 20 s  |
| 6312_Sp/Sm_overlap_Down_Rv  | CTTTAGAGGCGCAATCGTCT<br>CAGTACCTCCCAATTTGTGT<br>AGGGCT | permet de créer un chevauchement entre la région d et la séquence Sm/Sp                             |                                                   |

|                               |                                                                       |                                                                          |                                                                            |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 6312_overlappUC18_U<br>P_Fw   | ATGCCTGCAGGTCGACTCTA<br>GAGGATC<br>CCCGGATATTGCCGACTTAG<br>CCGGACA    | permet de créer un chevauchement entre la région c et le plasmide pUC-18 | + 6312_seqUP_Rv ;<br>Phusion ; hybridation :<br>69°C ; élongation : 10 s   |
| 6312_overlappUC18_D<br>OWN_Rv | CATGATTACGAATTCGAGCT<br>CGGTACCC<br>TCAACTCGGTGATAGACCG<br>TTTGTACTGC | permet de créer un chevauchement entre la région d et le plasmide pUC-18 | + 6312_seqDOWN_Fw ;<br>Phusion ; hybridation :<br>69°C ; élongation : 10 s |
| Sm/Sp_Fw_overlap<br>pEX7425   | ATTACCGGACGCTTACGGCT<br>CCGCCCCGCGCTC<br>ACGCAACTGGTCCAG              | Permet de créer un chevauchement entre la séquence Sm/Sp et la région a  | Phusion ; hybridation :<br>59°C ; élongation : 35 s                        |

Le mix contient une exonucléase (digestion sur le côté 5') afin que les chevauchements créés s'apparient entre eux ; puis une ADN polymérase synthétise le reste de la séquence et une ligase va joindre ensemble les séquences (Gibson et al. 2009).

Les plasmides p $\Delta$ ccyA<sub>S.6312</sub>::Sp<sup>f</sup>/Sm<sup>r</sup> et p $\Delta$ ccyA<sub>C.7425</sub>::Sp<sup>f</sup>/Sm<sup>r</sup> ont été assemblés par cette méthode.

En utilisant des amorces spécifiques, les régions d'homologie c et d ont été récupérées sur le génome de la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312.

Puis par d'autres amorces spécifiques, des chevauchements de 30 nt ont été créés entre les séquences à assembler.

## E. Vérification des plasmides par séquençage

Les séquençages des gènes clonés dans les plasmides de délétion et d'expression ont été réalisés avec le kit Mix2seq, en suivant les recommandations du fournisseur.

## III. Obtention des mutants d'*Escherichia coli* et de cyanobactéries

### A. La transformation

#### 1. Chez *Escherichia coli*

Les souches d'*Escherichia coli* utilisées sont chimiocompétentes. 20 ng à 40 ng d'ADN sont mélangés dans 50 µL de cellules compétentes, puis incubés 30 minutes sur glace. Un choc thermique est ensuite réalisé, pendant 45 secondes à 42°C. Puis les cellules sont incubées 2-3 minutes sur glace. 300 µL de SOC sont ajoutés aux cellules qui sont ensuite incubées à 30°C ou à 37°C, selon le plasmide transformé, sous agitation pendant 2 à 3 h. 100 µl de cellules sont ensuite étalés sur boîte de pétri contenant du LB et l'antibiotique (Km 50 µg/L, Amp 100 µg/L, Sp/Sm 25/75 µg/L) adéquat. Puis les cellules sont incubées à 37°C toute une nuit ou à température ambiante pendant 72 h selon le plasmide introduit.

#### 2. Chez les cyanobactéries

##### a) Transformation naturelle

Plusieurs tests de transformation naturelle ont été réalisés chez *Synechococcus* sp. PCC 6312 et *Cyanothece* sp. PCC 7425 afin d'introduire la cassette de délétion.

Pour une des conditions testées, un stress sans phosphate a été réalisé. Avant transformation, les cellules ont été cultivées pendant 20h en milieu liquide, 2000 lux, 30°C dans du BG11 ou MM sans phosphate.

Les conditions testées sont dans le tableau (Chapitre 1, Tableau 5).

## b) Transformation par électroporation

Les tentatives d'électroporation ont été réalisées avec l'appareil MicroPulser electroporator Biorad. Les paramètres de cet appareil permettent l'électroporation de 200 à 3000 volts, 600  $\Omega$ , 10  $\mu\text{F}$ , de 1 à 4 millisecondes, accompagnée de plusieurs pulses. Les plasmides p $\Delta\text{ccyA}_{C.7425}::\text{Sp}^r/\text{Sm}^r$ , p $\Delta\text{ccyA}_{C.7425}::\text{Km}^r$  ont été linéarisés par l'enzyme de restriction *PvuII* et le plasmide p $\Delta\text{ccyA}_{S.6312}::\text{Sp}^r/\text{Sm}^r$  a été linéarisé par l'enzyme *NdeI*. Après digestion, les plasmides ont été purifiés en présence d'éthanol ou par le kit QIAquick PCR Purification. Les plasmides ont été repris dans 1mM HEPES. Les cultures cellulaires ont été lavées 3 fois : centrifugation 5000 rpm, pendant 15 min à 20°C et reprises dans de l'HEPES 1mM pour obtenir  $10^9$  cell /mL. Un lavage avec du NaCl (0,12 M) et de l'EDTA (0,05M) a été réalisé dans une des conditions testées pour la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312. Dans une cuve d'électroporation (Gene MicroPulser Cuvettes, 0,2 cm gap), stockée à 4°C, 50  $\mu\text{l}$  ou 100  $\mu\text{l}$  de culture cellulaire y ont été placés. Après électroporation, les cellules sont placées dans du milieu de culture BG11 pour cultiver *Synechococcus* sp. PCC 6312 et MM++ pour cultiver *Cyanothece* sp. PCC 7425, dans 1 mL ou 1,5 mL de milieu pour permettre la régénération cellulaire à 2000 lux, 30°C, avec ou sans agitation pendant 24 h à 72 h. Après régénération, 100  $\mu\text{l}$  de culture cellulaire sont étalés sur boîte de Pétri avec différentes concentrations en antibiotique. Les conditions testées sont listées dans le tableau (Chapitre 1, Tableau 6).

## B. La conjugaison

Les plasmides d'expression du gène *ccyA* et de la protéine fusion CcyA-eGFP ont été introduits par conjugaison dans les souches de cyanobactéries suivantes : *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 6312 et *Cyanothece* sp. PCC 7425. Les souches sont cultivées jusqu'en phase exponentielle (entre 0,5 et 1,5 de D.O selon les souches), les cultures sont centrifugées 25 min à 5000 rpm, puis reprises dans du milieu de culture pour avoir  $10^7$  cellules/mL. En parallèle, les souches *E. coli* (contenant le plasmide à introduire) -TOP10, NEB10 $\beta$ , Rosetta ou C43- et la souche *E. coli* CM404 (contenant le plasmide mobilisateur -prK2013- permettant la conjugaison) ont été cultivées à 30°C ou 37°C toute la nuit avec les antibiotiques Sp 75  $\mu\text{l}/\text{mL}$  et Sm 25  $\mu\text{l}/\text{mL}$ . Les cultures *E. coli* sont, elles aussi, centrifugées, (5 min à 14 000 rpm) et reprises avec 800  $\mu\text{l}$  de LB. Sur boîtes de Pétri, sans antibiotique, contenant le milieu de culture pour la croissance des cyanobactéries (BG11 ou MM), 100  $\mu\text{l}$  de culture de cyanobactéries sont mélangés et déposés avec 30  $\mu\text{L}$  de culture de *E. coli* (TOP10, NEB10 $\beta$ , Rosetta ou C43) et 30  $\mu\text{L}$  de *E. coli* CM404. Les spots de culture sont placés en lumière continue 2000/2500 lux pendant 24h pour la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 et 48 h pour les souches *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 6312 et *Cyanothece* sp. PCC 7425. Puis les spots de culture sont repris et placés sur un nouveau milieu de culture -BG11 ou MM- avec antibiotiques, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Sp/Sm pour les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus elongatus* PCC 7942, et 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Sm pour les souches *Synechococcus* sp. PCC 6312 et *Cyanothece* sp. PCC 7425.

Tableau 28 : Mutants d'expression de *ccyA* seul ou couplé à la protéine eGFP dans les souches de cyanobactéries

| Mutants d'expression <i>ccyA</i>                          |                                      |                                                      |                                   |                                      |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
|                                                           | <i>Synechocystis</i><br>sp. PCC 6803 | <i>Synechococcus</i><br><i>elongatus</i> PCC<br>7942 | <i>Cyanothece</i> sp.<br>PCC 7425 | <i>Synechococcus</i><br>sp. PCC 6312 |
| pC- <i>ccyA</i> <sub>Gloeo</sub>                          | Oui                                  | Oui                                                  | NR                                | NR                                   |
| pT- <i>ccyA</i> <sub>Gloeo</sub>                          | Oui                                  | Oui                                                  | NR                                | NR                                   |
| pC- <i>ccyA</i> <sub>S.11701</sub>                        | Oui                                  | Oui                                                  | NR                                | NR                                   |
| pT- <i>ccyA</i> <sub>S.11701</sub>                        | Oui                                  | Oui                                                  | NR                                | NR                                   |
| pC- <i>ccyA</i> <sub>c.7425</sub>                         | Oui                                  | Oui                                                  | Oui                               | NR                                   |
| pT- <i>ccyA</i> <sub>c.7425</sub>                         | Oui                                  | Oui                                                  | Oui                               | NR                                   |
| pC- <i>ccyA</i> <sub>S.6312</sub>                         |                                      | Oui                                                  | NR                                | Oui                                  |
| pT- <i>ccyA</i> <sub>S.6312</sub>                         |                                      | Oui                                                  | NR                                | Oui                                  |
| Mutants d'expression <i>ccyA-egfp</i> ou <i>egfp-ccyA</i> |                                      |                                                      |                                   |                                      |
| <i>ccyA</i> <sub>Gloeo</sub> - <i>egfp</i>                | Oui                                  | Oui                                                  | NR                                | NR                                   |
| <i>egfp-ccyA</i> <sub>Gloeo</sub>                         | Oui                                  | Oui                                                  | NR                                | NR                                   |
| <i>ccyA</i> <sub>S.6312</sub> - <i>egfp</i>               | Oui                                  | Oui                                                  | NR                                | Oui                                  |
| <i>egfp-ccyA</i> <sub>S.6312</sub>                        | Oui                                  | Oui                                                  | NR                                | Oui                                  |
| <i>ccyA</i> <sub>c.7425</sub> - <i>egfp</i>               | Oui                                  | Oui                                                  | Oui                               | NR                                   |
| <i>egfp-ccyA</i> <sub>c.7425</sub>                        | Oui                                  | Oui                                                  | Oui                               | NR                                   |

NR : conjugaison non réalisée.

## IV. Analyses en microscopie et analyses chimiques

### A. CEMOVIS

50 mL de culture de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 WT, pC-*ccyA*<sub>Gloeo</sub> et pC-*ccyA*<sub>c.7425</sub> ont été incubés jusqu'à une D.O de 0,5 et centrifugés 10 min à 8000 rpm. Le culot a été repris dans 40 µl de dextran 20%. Un microlitre a été déposé dans une coupelle en or et vitrifié à l'aide d'un congélateur haute pression Baltec HPM010 (Abra-fluid, Widnau, Switzerland). Les échantillons vitrifiés ont été placés dans une cryo-chambre d'un ultramicrotome Leica à -140°C. Les coupelles en or contenant les échantillons vitrifiés ont été montées sur les broches en aluminium à l'aide d'une cryo glue, constituée d'un mélange d'éthanol : 2-propanol (=2 :3 v/v) (Chlanda et Sachse 2014). La cryo-chambre a été refroidie jusqu'à -160°C. A cette température la glue était assez froide pour résister aux contraintes développées lors de la coupe. Des coupes de ~ 50 nm d'épaisseur ont été obtenues grâce à l'utilisation d'un couteau en diamant de 35° et ont été collectées sur des grilles quantifoils couvertes par un film en carbone. Les grilles ont été conservées dans de l'azote liquide avant analyse. Le même protocole avait été utilisé par (Blondeau et al. 2018) pour réaliser des analyses CEMOVIS de cyanobactéries formant des iACC.

### B. Microscopie électronique à transmission (MET)

Les coupes CEMOVIS ont été observées à l'aide d'un MET FEI Tecnai F20 à 200 Kv. Les images ont été enregistrées avec une série de défocalisations variées.

### C. Microscope optique et confocal à balayage laser

Les cellules ont été placées entre lame et lamelle et observées avec le microscope LSM710 avec une barrette de 32 PMT. Les images fluorescentes ont été observées avec une longueur d'excitation de 488 nm et collectées avec une longueur d'onde d'émission de 509 nm.

### D. Microscopie électronique à balayage

Les échantillons ont été filtrés sur des filtres en polycarbonate Millipore d'un pouce de diamètre avec une taille de pore de 0,2 µm. Puis les échantillons ont été séchés et une couche de carbone a été déposée grâce au métalliseur Leica EM SCD500 afin de rendre la surface de l'échantillon conductrice. Le microscope électronique à balayage utilisé est un Zeiss Ultra 55

équipé d'un canon à émission de champs. Les observations ont été obtenues en mode ASB avec une distance de travail de 7,5 mm, une tension d'accélération de 15 kV, et un diaphragme de 60  $\mu\text{m}$ . Les cartographies chimiques ont été réalisées par spectrométrie des rayons x en dispersion d'énergie (EDXS) avec le même appareil dans les mêmes conditions. Le logiciel Bruker Esprit a été utilisé pour analyser les données d'EDXS.

### **E. Analyses par Scanning Transmission X-ray Microscopy (STXM)**

Les cultures de trois mutants S.7942 pC, S.7942 pC-*ccyA*<sub>Gloeo</sub> et S.7942 pC-*ccyA*<sub>S.6312</sub> ont été analysées au STXM au seuil L<sub>2,3</sub> du calcium. Les cellules ont été à nouveau suspendues dans de l'eau distillée et déposées sur une fenêtre en nitrure de silicium. Les analyses ont été réalisées sur la ligne HERMES au synchrotron SOLEIL. L'approche est détaillée dans le chapitre 2.

### **F. Analyses chimiques des solutions**

Le pH des cultures a été mesuré à partir de 0,5 mL de culture non filtré, avec une microélectrode (Fisherbrand).

La concentration en Ca dissous a été mesurée par ICP-AES (spectrométrie d'émission atomique par plasma), en utilisant un Thermo Scientific iACP 6200 ICP spectromètre d'émission sur la plateforme PARI de l'IPGP. 500  $\mu\text{L}$  ont été filtrés à 0,22  $\mu\text{m}$ . 50  $\mu\text{L}$  du filtrat ont été dilués dans 12 mL de HNO<sub>3</sub> 2%. La solution HNO<sub>3</sub> 2% a été analysée comme contrôle pour mesurer les contaminations de calcium dans la solution de HNO<sub>3</sub> 2%.

# Conclusion

A partir de 25 souches formant des inclusions de carbonates de calcium intracellulaires disponibles au laboratoire au début de ma thèse, j'ai sélectionné, selon plusieurs critères (la disponibilité du génome, la morphologie, la croissance en milieu liquide et solide, la résistance aux antibiotiques ...), deux souches pour une approche génétique : *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312.

Afin d'étudier la fonction du gène *ccyA* qui a été identifié comme marqueur de la formation des CaCO<sub>3</sub> chez des cyanobactéries par une approche bio-informatique de chercheurs de l'UPMC (Diop 2016; Isabelle Callebaut et al. 2020), j'ai utilisé plusieurs stratégies.

Dans un premier temps, j'ai tenté de déléter le gène *ccyA* de ces deux souches. Pour cela, j'ai construit des cassettes de délétion où le gène *ccyA* est remplacé par une cassette de résistance à un antibiotique et qui contient des plateformes d'homologie permettant la recombinaison homologue dans le chromosome. Deux méthodes d'introduction de l'ADN mutant dans ces deux souches (transformation naturelle et par électroporation) ont été infructueuses, bien que différents paramètres aient été utilisés. Pour l'instant, je ne peux pas conclure si la non-obtention de mutants de délétion est due à l'impossibilité de faire pénétrer la cassette de délétion dans son intégralité, ou due à une très faible efficacité des souches pour la recombinaison homologue et/ou si cela est dû au caractère essentiel à la viabilité cellulaire du gène *ccyA*.

La seconde stratégie mise en place a consisté à exprimer différentes versions du gène *ccyA* à partir d'un plasmide d'expression à large spectre d'hôte, dans deux souches de cyanobactéries modèles ne formant pas naturellement d'iACC : *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

Selon la version du gène exprimé, (1) la croissance de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 est ralentie par rapport à celle de la souche sauvage lorsqu'elle est cultivée avec 250 µM de calcium et (2) la croissance de *Synechocystis* sp. PCC 6803 et de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 est altérée si la concentration initiale de calcium dans le milieu de culture est faible (50 µM de Ca). A l'heure actuelle, il n'est pas déterminé si l'expression du gène *ccyA* induit la mort des cellules dans ces souches ne formant pas naturellement des iACC ou un ralentissement de leur métabolisme. Les résultats de microscopie (MEB et STXM) ont montré que les mutants de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 exprimant la séquence provenant de *Gloeomargarita lithophora* ou *Synechococcus* sp. PCC 6312 (S.7942 pC-*ccyA*<sub>Gloeo</sub> et S.7942 pC-*ccyA*<sub>S.6312</sub>) présentaient une quantité de calcium intracellulaire (notamment dans les polyphosphates) plus importante que la souche témoin S.7942 pC n'exprimant pas le gène *ccyA*. Ces résultats montrent que l'homéostasie du calcium est perturbée mais il n'est pas possible à ce stade de savoir si la Calcyanine incorpore le calcium, en agissant comme transporteur de calcium. Les observations par la méthode CEMOVIS des mutants S.7942 pC-*ccyA*<sub>Gloeo</sub> et S.7942 pC-*ccyA*<sub>C.7425</sub> ne montrent pas de formation de structures particulières dans les cellules mutantes par comparaison avec celles de la souche S.7942 pC. Il peut être souligné qu'un nombre plus important de cellules mortes ont été observées dans les mutants.

La troisième approche mise en place avait pour objectif de connaître la localisation de la Calcyanine chez les souches formant les iACC comme *Synechococcus* sp. PCC 6312 et chez des souches modèles ne formant pas d'iACC et facilement manipulables génétiquement comme *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Pour cela, des cassettes d'expression portées par des

plasmides réplcatifs permettant la production de la Calcyanine à fusionner à la eGFP ont été construites et introduites par conjugaison dans deux souches. Les premiers résultats semblent indiquer que chez la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312, la protéine Calcyanine est localisée à la membrane et/ou aux pôles des cellules. A l'inverse, Chez *Synechococcus elongatus* PCC 7942, les protéines CcyA<sub>Gloeo</sub> et CcyA<sub>C.7425</sub> semblent réparties de manière diffuse dans le cytoplasme. Cependant, d'autres observations doivent encore confirmer ces résultats.

Au final, la question reste entière concernant une possible fonction de ce gène dans le processus de formation de CaCO<sub>3</sub> chez certaines cyanobactéries. Mais ces premiers résultats semblent montrer un lien entre le gène *ccyA* et la formation de carbonates intracellulaires chez les cyanobactéries. Mais des outils de génétique variés sont désormais en place et des travaux ultérieurs pourront les mettre à profit pour avancer sur la compréhension de la fonction de cette protéine.

# Perspectives Générales

## Perspectives à court terme

- Délétion du gène *ccyA* dans la souche wt

La perspective la plus importante pour étudier la fonction du *ccyA* dans les souches formant les iACC est de le supprimer du génome de ces souches. J'ai identifié deux possibilités : (a) continuer l'approche de génétique sur les souches actuellement sélectionnées, *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 et/ou (b) tenter de supprimer le *ccyA* d'autres souches comme *Synechococcus* sp. PCC 6716, *Synechococcus* sp. PCC 6717 ou *Synechococcus calcipolaris* PCC 11701, qui d'après nos critères seraient de bonnes candidates pour des manipulations génétiques et qui seraient peut-être plus simples à manipuler. De plus, il a été identifié chez d'autres souches de cyanobactéries formant des iACC un domaine N-ter de la protéine Calcyanine différent des domaines HMA-like ou X. Il serait donc intéressant de supprimer ce gène de ces souches, afin de voir si ce gène, possédant des variabilités du domaine N-ter, a la même fonction.

- Sur-expression du gène *ccyA* dans des souches formant les iACC

Pour le moment nous ne savons pas si le gène *ccyA* est exprimé naturellement dans les souches formant les iACC. Par conséquent des mutants de sur-expression ont été obtenus à partir des souches *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 exprimant leur gène *ccyA* respectif dans le plasmide d'expression pFC1. Ces mutants n'ont pas encore été étudiés. Il serait intéressant de savoir si la sur-expression de ce gène induit un phénotype par exemple une augmentation/diminution de l'incorporation de calcium, une augmentation/diminution de la croissance selon différentes concentrations en calcium et/ou une augmentation/diminution du nombre de carbonates par cellule.

- Déterminer la localisation de la Calcyanine

La perspective à court terme est de connaître la localisation de la protéine Ccyac.7425 chez la souche *Cyanothece* sp. PCC 7425 avec la même stratégie utilisée pour connaître la localisation de la Ccyas.6312 dans *Synechococcus* sp. PCC 6312 (chapitre 3). A plus ou moins long terme, il sera nécessaire de connaître la localisation de la protéine Calcyanine chez les souches possédant des domaines différents du domaine HMA-like, comme *Gloeomargarita lithophora*.

- Mesurer et suivre l'expression du gène *ccyA* dans des souches formant les iACC et des partenaires

Actuellement on ne sait pas si le gène *ccyA* est exprimé dans les souches formant les iACC et s'il l'est, quel est son taux d'expression. Il serait donc indispensable de savoir (1) s'il est exprimé, (2) dans quelle(s) condition(s), et (3) si son expression change selon différentes concentrations en calcium, en carbonate et/ou en baryum et en strontium (une souche, comme *Gloeomargarita lithophora* incorpore préférentiellement le baryum et le strontium en présence de calcium). Pour cette expérience, aucune délétion ni suppression de gène n'est à réaliser, le suivi d'expression du gène se fait par des RT-PCR et dans le chapitre 1, j'ai montré que des PCR pouvaient être réalisées sur différentes souches, dont *Gloeomargarita lithophora* qui incorpore préférentiellement le baryum et le strontium (Cam et al. 2016).

De plus, la technique RNAseq permettrait de suivre l'expression de l'ensemble des gènes et en particulier les gènes voisins du *ccyA* pour savoir s'il y a de la co-expression.

- Déterminer la structure de la Calcyanine

Actuellement une approche biochimique *in vitro* est en cours dans le cadre d'une thèse au laboratoire de l'IMPMC, dans l'équipe BIOMIN. Cette approche consiste à produire la Calcyanine chez *E. coli* afin de la purifier et d'étudier (1) la structure entière ou la structure des domaines par cristallographie, cryo-MET ou RMN (Lengyel et al. 2014) et (2) les interactions de cette protéine avec le calcium, le strontium, le baryum et/ou du carbonate.

### Perspectives à long terme

- Délétion du *ccyA* chez *Gloeomargarita lithophora*

Par rapport au phénotype de biominéralisation des CaCO<sub>3</sub>, cette souche est unique. En effet, elle se trouve éloignée phylogénétiquement des souches formant les iACC (Figure 7). Parmi la variabilité du domaine N-ter, elle est la seule à posséder le domaine X et enfin elle seule incorpore préférentiellement le baryum et le strontium en présence de calcium (Cam et al. 2016). Cependant, *Gloeomargarita lithophora* n'est pas la meilleure candidate pour des manipulations génétiques. Elle pousse lentement en milieu liquide, ainsi que sur milieu solide et elle ne forme pas de colonies isolées sur boîte mais surtout elle est très contaminée. Par conséquent avant d'envisager de la manipuler génétiquement, il faudrait (1) la décontaminer et (2) trouver les bonnes conditions de culture pour augmenter sa croissance en milieux liquide et solide et l'inciter à faire des colonies isolées sur boîte. Toutefois, si aucune condition ne permet d'induire la formation de colonies isolées, une seconde stratégie serait de sélectionner les mutants en milieu liquide. Mais cette stratégie n'a jamais été utilisée et il sera nécessaire de la mettre en place.

- Connaître la fonction des domaines de la Calcyanine

Le domaine HMA-like présent dans la Calcyanine de certaines souches possède des motifs bien conservés et partagés avec ceux des domaines HMA, comme deux hélices alpha et quatre brins bêta (Diop 2016). Cependant, des régions détectées dans les domaines HMA canoniques ne sont pas retrouvées dans le HMA-like de la Calcyanine ou sont différentes ; comme le site actif liant les métaux CxxC du domaine HMA, mais dont les cystéines ont été remplacées par les acides aminés acide aspartique et tyrosine dans le domaine HMA-like, ou encore l'ajout d'un élément de structure qui n'est pas présent dans les domaines HMA et à côté duquel se trouve une histidine hautement conservée. Le domaine (glycine-zipper)<sup>3</sup> est un domaine inconnu de par ces trois motifs répétés riches en glycine.

Il serait donc intéressant de comprendre quelles sont les fonctions de ces éléments de structure dans ces différents domaines. L'étude de ces fonctions pourrait se faire via une approche biochimique permettant de connaître la structure de la Calcyanine et par l'approche génétique qui consisterait à muter ces domaines et à observer les phénotypes qui en résulteraient.

- Le gène *ccyA* a-t-il la même fonction chez toutes les souches de cyanobactéries formant les iACC ?

A long terme, il serait intéressant de savoir si les *ccyA* sont interchangeables. C'est-à-dire si la fonction du gène *ccyA* reste la même dans la souche d'origine et dans une autre souche formant des iACC dont le *ccyA* aurait été supprimé, ou si des capacités nouvelles seraient amenées, comme la capacité de la souche *G. lithophora*, à incorporer sélectivement le baryum et le strontium. Cette capacité si elle est liée au *ccyA* peut-elle être transmise ? La réponse à cette question serait utile pour développer des stratégies de bio-remédiation avec des souches modifiées.

- Identifier les partenaires de *ccyA*

Pour comprendre la fonction de la Calcyanine, il est indispensable de savoir si cette protéine interagit physiquement avec d'autres protéines et d'identifier ces dernières. Une stratégie serait d'utiliser la co-immunoprécipitation (Salim et al. 2002). Cette technique consiste à récupérer les protéines totales puis à identifier la protéine d'intérêt avec un anticorps spécifique (si aucun anticorps spécifique de la protéine n'existe, il est possible d'introduire la séquence codante de la protéine portant un tag, qui sera reconnue par un anticorps spécifique de ce tag). Des étapes de purification sont ensuite réalisées. Le complexe protéique migre ensuite sur gel SDS-page (gel dénaturant les protéines) selon la taille des protéines. Enfin, un séquençage par spectrométrie de masse permet d'identifier les protéines qui étaient liées à la Calcyanine.

- Identifier d'autres gènes marqueurs de la biominéralisation du CaCO<sub>3</sub>

D'après la comparaison des génomes entre les souches formant et ne formant pas d'iACC, d'autres clusters « intermédiaires », donc des séquences protéiques ont été identifiées chez quelques souches formant des iACC mais non chez les souches ne formant pas d'iACC (Figure 8, en introduction). Dont 18 séquences protéiques identifiées uniquement entre les 3 souches

formant les iACC aux pôles et au septum et partagées avec *Cyanothece* sp. PCC 7425 qui forme les iACC réparties dans le cytoplasme. Et 14 séquences présentes uniquement chez les 3 souches formant les iACC aux pôles et au septum.

Ces gènes pourraient aussi être des gènes marqueurs de la formation de  $\text{CaCO}_3$  chez certaines souches de cyanobactéries.

Certaines techniques pourraient permettre d'identifier ces autres gènes marqueurs : comme la mutagenèse aléatoire. Le principe serait de muter, de façon aléatoire, tout le génome des souches formant les iACC et d'identifier quel(s) mutant(s) ne forme plus d'iACC ou n'incorpore plus de calcium. Plusieurs stratégies sont possibles pour muter aléatoirement le génome : l'exposition aux ultraviolets (Anthony et al. 2015), ou encore l'insertion d'un plasmide portant des transposases codant des transposons qui sont des séquences connues qui s'insèrent dans le génome (Breton, Mohapatra, et Haldenwang 2006).

Ensuite, une comparaison entre génome(s) mutant(s) et génome sauvage montrerait quels sont les gènes rendus non fonctionnels. Cependant, la difficulté première serait, avant de muter aléatoirement les génomes, de mettre en place un crible permettant une comparaison et une identification rapides des mutants encore « biominéralisants », ainsi que des mutants devenus non « biominéralisants » avec bien sûr la difficulté à cultiver des mutants devenus non « biominéralisants » mais encore viables, dans le cas où cette capacité serait vitale pour la culture des souches. En effet, des milliers voir des millions de mutants seraient générés, et il est donc impossible de tous les regarder au MEB ou de faire un suivi de l'incorporation du calcium grâce à la chimie des solutions. Ce crible pourrait se faire sur des microplaques, où chaque puits contiendrait un mutant. Il pourrait se baser sur la capacité d'incorporation du calcium qui est liée à la capacité de formation de  $\text{CaCO}_3$ , et un réactif (par exemple la Calcéine) colorant le calcium en solution pourrait être utilisé ; si les mutants n'incorporent plus de calcium, celui-ci resté en solution se complexera avec le réactif, changeant ainsi de couleur et indiquant quels mutants n'incorporent plus de calcium.



## Bibliographie

- Adams et Errington. 2009. « Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the z ring ». *Nature reviews microbiology* 7 (9): 642-53. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2198>.
- Almeida, Boschmann Martens, Ceccon Lanes, et Marins. 2017. « Improved genetic transformation of *synechococcus elongatus* pcc 7942 using linear dna fragments in association with a dnase inhibitor ». *Biotechnology research and innovation* 1 (1): 123-28. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.09.001>.
- Anantharaman, Koonin, et Aravind. 2001. « Tram, a predicted rna-binding domain, common to trna uracil methylation and adenine thiolation enzymes ». *Fems microbiology letters* 197 (2): 215-21. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10606.x>.
- Anthony, Raghavan Rangamaran, Gopal, Shivasankarasubbiah, Thilagam, Dhassiah, Padinjattayil, et al. 2015. « Ultraviolet and 5' fluorodeoxyuridine induced random mutagenesis in *chlorella vulgaris* and its impact on fatty acid profile: a new insight on lipid-metabolizing genes and structural characterization of related proteins ». *Marine biotechnology* 17 (1): 66-80. <https://doi.org/10.1007/s10126-014-9597-5>.
- Balasubramanian, Ramakrishnan, Shen, Bryant et Golbeck. 2006. « Regulatory roles for isca and sufa in iron homeostasis and redox stress responses in the cyanobacterium *synechococcus* sp. Strain pcc 7002 ». *Journal of bacteriology* 188 (9): 3182-91. <https://doi.org/10.1128/jb.188.9.3182-3191.2006>.
- Bandyopadhyay, Anindita, Elvitigala, Liberton, et Pakrasi. 2013. « Variations in the rhythms of respiration and nitrogen fixation in members of the unicellular diazotrophic cyanobacterial genus *cyanothece* ». *Plant physiology* 161 (3): 1334-46. <https://doi.org/10.1104/pp.112.208231>.
- Bandyopadhyay, Anindita, Elvitigala, Welsh, Stöckel, Liberton, Min, Sherman, et Pakrasi. 2011. « Novel metabolic attributes of the genus *cyanothece*, comprising a group of unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria ». *Mbio* 2 (5). <https://doi.org/10.1128/mbio.00214-11>.
- Barten, roland, et holger lill. 1995. « dna-uptake in the naturally competent cyanobacterium, *synechocystis* sp. Pcc 6803 ». *Fems microbiology letters* 129 (1): 83-87. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07561.x>.
- Behler, Vijay, Hess, et Akhtar. 2018. « Crispr-based technologies for metabolic engineering in cyanobacteria ». *Trends in biotechnology* 36 (10): 996-1010. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.011>.

- Benzerara, Yoon, Tyliczszak, Constantz, Spormann, et Brown. 2004. « Scanning transmission x-ray microscopy study of microbial calcification ». *Geobiology* 2 (4): 249-59. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4677.2004.00039.x>.
- Benzerara, Skouri-Panet, Li, Férard, Gugger, Laurent, Couradeau, Ragon, Cosmidis, Menguy, Margaret-Oliver, Tavera, Lopez-Garcia et Moreira, 2014. « Intracellular calcium carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria ». *Proceedings of the national academy of sciences* 111 (30): 10933-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403510111>.
- Bhaya, Bianco, Bryant, Grossman. 2000. « Type iv pilus biogenesis and motility in the cyanobacterium *synechocystis* sp. Pcc6803 ». *Molecular microbiology* 37 (4): 941-51. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02068.x>.
- Billi, Friedmann, Helm, et Potts. 2001. « Gene transfer to the desiccation-tolerant cyanobacterium *chroococcidiopsis* ». *Journal of bacteriology* 183 (7): 2298-2305. <https://doi.org/10.1128/jb.183.7.2298-2305.2001>.
- Blondeau, Sachse, Boulogne, Gillet, Guigner, Skouri-Panet, Poinsot, Ferard, Miot, Benzerara. 2018. « Amorphous calcium carbonate granules form within an intracellular compartment in calcifying cyanobacteria ». *Frontiers in microbiology* 9 (août): 1768. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01768>.
- Brahmsha, 1996. « A genetic manipulation system for oceanic cyanobacteria of the genus *synechococcus*. » *applied and environmental microbiology* 62 (5): 1747-51.
- Breton, Le, Mohapatra, et Haldenwang. 2006. « In vivo random mutagenesis of *bacillus subtilis* by use of *tnylb-1*, a mariner-based transposon ». *Applied and environmental microbiology* 72 (1): 327-33. <https://doi.org/10.1128/aem.72.1.327-333.2006>.
- Callebaut, Labesse, Durand, Poupon, Canard, Chomilier, Henrissat, et Mornon. 1997. « Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (hca): current status and perspectives ». *Cellular and molecular life sciences cmls* 53 (8): 621-45. <https://doi.org/10.1007/s000180050082>.
- Callebaut, Duprat, Moreira, et Benzerara. *In prep*, 2020.
- Cam, Benzerara, Georgelin, Jaber, Lambert, Poinsot, Skouri-Panet, Moreira, Lopez-Garcia, Raimbault, Cordier, Jézéquel, 2018. « Cyanobacterial formation of intracellular calcium carbonates in undersaturated solutions ». *Geobiology* 16 (1): 49-61. <https://doi.org/10.1111/gbi.12261>.
- Cam, Benzerara, Georgelin, Jaber, Lambert, Poinsot, Skouri-Panet, et Cordier. 2016. « Selective uptake of alkaline earth metals by cyanobacteria forming intracellular carbonates ». *Environmental science & technology* 50 (21): 11654-62. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02872>.
- Cao, Li, Xia, Wei, Guo, Li, et Wang. 2017. « Arabidopsis based toolkit for gene expression and metabolic robustness improvement in *synechococcus elongatus* ». *Scientific reports*

- 7 (1): 18059. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17035-4>.
- Cassier-chauvat, Veaudor, et Chauvat. 2016. « Comparative genomics of dna recombination and repair in cyanobacteria: biotechnological implications ». *Frontiers in microbiology* 7 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01809>.
  - Charbon, Brustad, Scott, Wang, Løbner-Olesen, Schultz, Jacobs-Wagner, et Chapman. 2011. « Subcellular protein localization by using a genetically encoded fluorescent amino acid ». *Chembiochem* 12 (12): 1818-21. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100282>.
  - Chauvat, De vries, Van der ende, et Van arkel. 1986. « A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium synechocystis pcc 6803 ». *Molecular and general genetics mgg* 204 (1): 185-91. <https://doi.org/10.1007/bf00330208>.
  - Chen, Zaro, et Shen. 2013. « Fusion protein linkers: property, design and functionality ». *Advanced drug delivery reviews*, editor's collection 2013, 65 (10): 1357-69. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039>.
  - Chenebault, Diaz-Santos, Kammerscheit, Görgen, Ilioaia, Streckaite, Gall, Robert, Marcon, Buisson, Benzerara, Sassi, Cassier-Chauvat et Chauvat, 2020. « A genetic toolbox for the new model cyanobacterium cyanotheca pcc 7425: a case study for the photosynthetic production of limonene ». *Frontiers in microbiology* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586601>.
  - Chlanda et Sachse. 2014. « Cryo-electron microscopy of vitreous sections ». *Methods in molecular biology (clifton, n.j.)* 1117: 193-214. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-776-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-776-1_10).
  - Cogley, Zerweck, Reyes, Mody, Seludo-Unson, Jaeger, Weerasuriya, et Navankasattusas. 1993. « Construction of shuttle plasmids which can be efficiently mobilized from escherichia coli into the chromatically adapting cyanobacterium, fremyella diplosiphon ». *Plasmid* 30 (2): 90-105. <https://doi.org/10.1006/plas.1993.1037>.
  - Couradeau, Benzerara, Gérard, Moreira, Bernard, Brown, et Lopez-Garcia. 2012. « An early-branching microbialite cyanobacterium forms intracellular carbonates ». *Science* 336 (6080): 459-62. <https://doi.org/10.1126/science.1216171>.
  - De Marothy et Elofsson. 2015. « Marginally hydrophobic transmembrane  $\alpha$ -helices shaping membrane protein folding: marginally hydrophobic transmembrane  $\alpha$ -helices ». *Protein science* 24 (7): 1057-74. <https://doi.org/10.1002/pro.2698>.
  - De Wever, Benzerara, Coutaud, Caumes, Poinot, Skouri-Panet, Laurent, Duprat, et Gugger. 2019. « Evidence of high ca uptake by cyanobacteria forming intracellular ca CO<sub>3</sub> and impact on their growth ». *Geobiology* 17 (6): 676-90. <https://doi.org/10.1111/gbi.12358>.
  - Dimasi et Gower. 2014. *Biom mineralization sourcebook: characterization of biominerals and biomimetic materials*. Crc press.

- Diop, sey dina issa. 2016. « Caractérisation des domaines orphelins au sein des protéomes. Application à l'étude de mécanismes de biominéralisation intracellulaire chez les cyanobactéries. » raport, master 2.
- Dittmann, Neilan, Erhard, Von Döhren, et Börner. 1997. « Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *microcystis aeruginosa* pcc 7806 ». *Molecular microbiology* 26 (4): 779-87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6131982.x>.
- Domain, Houot, Chauvat, et Cassier-Chauvat. 2004. « Function and regulation of the cyanobacterial genes *lexa*, *reca* and *ruvb*: *lexa* is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation ». *Molecular microbiology* 53 (1): 65-80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04100.x>.
- Dumon-seignovert, Cariot, et Vuillard. 2004. « The toxicity of recombinant proteins in *escherichia coli*: a comparison of overexpression in *bl21(de3)*, *c41(de3)*, and *c43(de3)* ». *Protein expression and purification* 37 (1): 203-6. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.04.025>.
- Dvořák, Hindák, Hašler, Hindáková, et Pouličková. 2014. « Morphological and molecular studies of *neosynechococcus sphagnicola*, gen. Et sp. Nov. (cyanobacteria, synechococcales) ». *Phytotaxa* 170 (1): 024. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.170.1.3>.
- Eltsov et Dubochet. 2005. « Fine structure of the *deinococcus radiodurans* nucleoid revealed by cryoelectron microscopy of vitreous sections ». *Journal of bacteriology* 187 (23): 8047-54. <https://doi.org/10.1128/jb.187.23.8047-8054.2005>.
- Englund, Andersen-Ranberg, Miao, Hamberger, Lindberg. 2015. « Metabolic engineering of *synechocystis* sp. Pcc 6803 for production of the plant diterpenoid manoyl oxide ». *Acs synthetic biology* 4 (12): 1270-78. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00070>.
- Ericson et Björk. 1986. « Pleiotropic effects induced by modification deficiency next to the anticodon of *trna* from *salmonella typhimurium* lt2. » *journal of bacteriology* 166 (3): 1013-21. <https://doi.org/10.1128/jb.166.3.1013-1021.1986>.
- Flores 2008. « Gene transfer to cyanobacteria in the laboratory and in nature ».
- Flores et Wolk. 1985. « Identification of facultatively heterotrophic, n<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria able to receive plasmid vectors from *escherichia coli* by conjugation. » *journal of bacteriology* 162 (3): 1339-41.
- Fujita, Takahashi, Chuganji, et Matsubara. 1992. « The *nifh*-like (*frxc*) gene is involved in the biosynthesis of chlorophyll in the filamentous cyanobacterium *plectonema boryanum* ». *Plant and cell physiology* 33 (1): 81-92. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078224>.

- George et Eringa. 2002. « an analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding ». *Protein engineering, design and selection* 15 (11): 871-79. <https://doi.org/10.1093/protein/15.11.871>.
- Gibson, Young, Chuang, Venter, Hutchison, et Smith. 2009. « Enzymatic assembly of dna molecules up to several hundred kilobases ». *Nature methods* 6 (5): 343-45. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.
- Giepmans, Adams, Ellisman, et Tsien. 2006. « The fluorescent toolbox for assessing protein location and function ». *Science* 312 (5771): 217-24. <https://doi.org/10.1126/science.1124618>.
- Gokhale et Khosla. 2000. « Role of linkers in communication between protein modules ». *Current opinion in chemical biology* 4 (1): 22-27. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(99\)00046-0](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(99)00046-0).
- Görgen, sigrid. 2017. « Processus moléculaires de la formation de carbonates de calcium par les cyanobacteries : études d'un gène candidat ». *Master 2*, 2017.
- Griese, Lange, et Soppa. 2011. « Ploidy in cyanobacteria ». *Fems microbiology letters* 323 (2): 124-31. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02368.x>.
- Guiry 2012. « How many species of algae are there? » *journal of phycology* 48 (5): 1057-63. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x>.
- Hanson et Ziegler. 2004. « Fusion of green fluorescent protein to the c-terminus of granulysin alters its intracellular localization in comparison to the native molecule ». *Journal of negative results in biomedicine* 3 (1): 2. <https://doi.org/10.1186/1477-5751-3-2>.
- Hassidim, Schwarz, Lieman-Hurwitz, Marco, Ronen-Tarazi, et Kaplan. 1992. « A cyanobacterial gene encoding peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ». *Plant physiology* 100 (4): 1982-86. <https://doi.org/10.1104/pp.100.4.1982>.
- Heap, Ehsaan, Cooksley, Ng, Cartman, Winzer, et Minton. 2012. « Integration of dna into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker ». *Nucleic acids research* 40 (8): e59-e59. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1321>.
- Heidorn, Camsund, Huang, Lindberg, Oliveira, Stensjö, et Lindblad. 2011. « Chapter twenty-four - synthetic biology in cyanobacteria: engineering and analyzing novel functions ». In *methods in enzymology*, édité par chris voigt, 497:539-79. Synthetic biology, part a. Academic press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385075-1.00024-x>.
- Herdman, 2015. « Form- synechococcus ». In *bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, 1-7. Chichester, uk: john wiley & sons, ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00422>.
- Ho et Tirrell. 2016. « Chemoenzymatic labeling of proteins for imaging in bacterial cells ». *Journal of the american chemical society* 138 (46): 15098-101.

<https://doi.org/10.1021/jacs.6b07067>.

- Houssen, Koehnke, Zollman, Vendome, Raab, Smith, Naismith, et Jaspars. 2012. « The discovery of new cyanobactins from *cyanotheca* pcc 7425 defines a new signature for processing of patellamides ». *Chembiochem* 13 (18): 2683-89. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200661>.
- Iwai, Katoh, Katayama, et Ikeuchi. 2004. « Improved genetic transformation of the thermophilic cyanobacterium, *thermosynechococcus elongatus* bp-1 ». *Plant and cell physiology* 45 (2): 171-75. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch015>.
- Jaiswal, Sengupta, Sohoni, Sengupta, Phadnavis, Pakrasi, et Wangikar. 2018. « Genome features and biochemical characteristics of a robust, fast growing and naturally transformable cyanobacterium *synechococcus elongatus* pcc 11801 isolated from india ». *Scientific reports* 8 (1): 16632. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34872-z>.
- Kammerscheit, Chauvat, et Cassier-Chauvat. 2019. « First in vivo evidence that glutathione-s-transferase operates in photo-oxidative stress in cyanobacteria ». *Frontiers in microbiology* 10 (août): 1899. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01899>.
- Kaňa, Prášil, Komárek, Papageorgiou, et Govindjee. 2009. « Spectral characteristic of fluorescence induction in a model cyanobacterium, *synechococcus* sp. (pcc 7942) ». *Biochimica et biophysica acta (bba) - bioenergetics* 1787 (10): 1170-78. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.04.013>.
- Kaneko, Sato, Kotani, Tanaka, Asamizu, Nakamura, Miyajima, et al. 1996. « Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *synechocystis* sp. Strain pcc6803. Ii. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions ». *Dna research* 3 (3): 109-36. <https://doi.org/10.1093/dnares/3.3.109>.
- Kim, Chamberlain, et Bowie. 2004. « Membrane channel structure of helicobacter pylori vacuolating toxin: role of multiple gxxxg motifs in cylindrical channels ». *Proceedings of the national academy of sciences* 101 (16): 5988-91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308694101>.
- Koksharova et Wolk. 2002. « Genetic tools for cyanobacteria ». *Applied microbiology and biotechnology* 58 (2): 123-37. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0864-9>.
- Komarek et Komarek j. 1976. « Taxonomic review of the genera *synechocystis* sauv. 1892, *synechococcus* naeg-1849, and *cyanotheca* gen. Nov. (cyanophyceae). » *taxonomic review of the genera synechocystis sauv. 1892, synechococcus naeg-1849, and cyanotheca gen. Nov. (cyanophyceae)*.
- Koshla, Yushchuk, Ostash, Dacyuk, Myronovskiy, Jäger, Süßmuth, et al. 2019. « Gene *miaa* for post-transcriptional modification of *trnaxx* is important for morphological and metabolic differentiation in *streptomyces* ». *Molecular microbiology* 112 (1): 249-65. <https://doi.org/10.1111/mmi.14266>.

- Kreps, Ferino, Mosrin, Gerits, Mergeay et Thuriaux. 1990. « Conjugative transfer and autonomous replication of a promiscuous incq plasmid in the cyanobacterium *synechocystis pcc 6803* ». *Molecular and general genetics mgg* 221 (1): 129-33. <https://doi.org/10.1007/bf00280378>.
- Labarre, Chauvat, et Thuriaux. 1989. « Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *synechocystis* strain pcc 6803. » *journal of bacteriology* 171 (6): 3449-57. <https://doi.org/10.1128/jb.171.6.3449-3457.1989>.
- Lengyel, Hnath, Storms, et Wohlfarth. 2014. « Towards an integrative structural biology approach: combining cryo-tem, x-ray crystallography, and nmr ». *Journal of structural and functional genomics* 15 (3): 117-24. <https://doi.org/10.1007/s10969-014-9179-9>.
- Li, Ma, Liao, Liu, Lu, Chen, Ye, et Ding. 2018. « Ultrasound-induced *escherichia coli* o157:h7 cell death exhibits physical disruption and biochemical apoptosis ». *Frontiers in microbiology* 9 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02486>.
- Li, Oliver, Cam, Boudier, Blondeau, Leroy, Cosmidis, Skouri-Panet, Guigner, Férard, Poinot, Moreira, Lopez-Garcia, Cassier-Chauvat, Chauvat et Benzerara 2016. « biomineralization patterns of intracellular carbonatogenesis in cyanobacteria: molecular hypotheses ». *Minerals* 6 (1): 10. <https://doi.org/10.3390/min6010010>.
- Liberton, Bandyopadhyay, et Pakrasi. 2019. « Enhanced nitrogen fixation in a *glx*-deficient strain of cyanobacterium sp. Strain atcc 51142, a unicellular nitrogen-fixing cyanobacterium ». *Applied and environmental microbiology* 85 (7). <https://doi.org/10.1128/aem.02887-18>.
- Lindberg, Schütz, Happe, et Lindblad. 2002. « A hydrogen-producing, hydrogenase-free mutant strain of *nostoc punctiforme* atcc 29133 ». *International journal of hydrogen energy, biohydrogen* 2002, 27 (11): 1291-96. [https://doi.org/10.1016/s0360-3199\(02\)00121-0](https://doi.org/10.1016/s0360-3199(02)00121-0).
- Loera-Quezada, Leyva-González, López-Arredondo, et Herrera-Estrella. 2015. « Phosphite cannot be used as a phosphorus source but is non-toxic for microalgae ». *Plant science* 231 (février): 124-30. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.11.015>.
- Ludwig, Heimbucher, Gregor, Czerny, et Schmetterer. 2008. « Transformation and gene replacement in the facultatively chemoheterotrophic, unicellular cyanobacterium *synechocystis* sp. Pcc6714 by electroporation ». *Applied microbiology and biotechnology* 78 (4): 729-35. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1356-y>.
- Lyra, Halme, Torsti, Tenkanen, et Sivonen. 2000. « Site-specific restriction endonucleases in cyanobacteria ». *Journal of applied microbiology* 89 (6): 979-91. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01206.x>.
- Marbouty, Mazouni, Saguez, Cassier-Chauvat, et Chauvat. 2009. « Characterization of the *synechocystis* strain pcc 6803 penicillin-binding proteins and cytokinetic proteins *ftsq* and *ftsw* and their network of interactions with *zipn* ». *Journal of bacteriology* 191

(16): 5123-33. <https://doi.org/10.1128/jb.00620-09>.

- Marbouty, Saguez, Cassier-Chauvat, et Chauvat. 2009a. « Zipn, an ftsa-like orchestrator of divisome assembly in the model cyanobacterium *synechocystis* pcc6803 ». *Molecular microbiology* 74 (2): 409-20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06873.x>.
- Marbouty, sahuez, Cassier-Chauvat et Chauvat, 2009b. « Characterization of the ftsz-interacting septal proteins sepf and ftn6 in the spherical-celled cyanobacterium *synechocystis* strain pcc 6803 ». *Journal of bacteriology* 191 (19): 6178-85. <https://doi.org/10.1128/jb.00723-09>.
- Marraccini, Bulteau, Cassier-Chauvat, Mermet-Bouvier, et Chauvat. 1993. « A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *synechococcus* and *synechocystis* ». *Plant molecular biology* 23 (4): 905-9. <https://doi.org/10.1007/bf00021546>.
- Martin, Gupta, Ninan, Perry, et Van duyne. 2012. « The survival motor neuron protein forms soluble glycine zipper oligomers ». *Structure* 20 (11): 1929-39. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.08.024>.
- Matelska, Steczkiewicz, et Ginalski. 2017. « Comprehensive classification of the pin domain-like superfamily ». *Nucleic acids research* 45 (12): 6995-7020. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx494>.
- Matsunaga, Takeyama, et Nakamura. 1990. « Characterization of cryptic plasmids from marine cyanobacteria and construction of a hybrid plasmid potentially capable of transformation of marine cyanobacterium, *synechococcus* sp., and its transformation ». *Applied biochemistry and biotechnology* 24 (1): 151-60. <https://doi.org/10.1007/bf02920241>.
- Mazouni, Domain, Cassier-Chauvat, et Chauvat. 2004. « Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: ftsz, zipn and mincde ». *Molecular microbiology* 52 (4): 1145-58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04042.x>.
- McClain, Iwamoto, Cao, Vinion-Dubiel, Li, Szabo, Shao, et Cover. 2003. « Essential role of a g xxx g motif for membrane channel formation by *helicobacter pylori* vacuolating toxin ». *Journal of biological chemistry* 278 (14): 12101-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.m212595200>.
- Meene, Hohmann-Marriott, Vermaas, et Roberson. 2006. « The three-dimensional structure of the cyanobacterium *synechocystis* sp. Pcc 6803 ». *Archives of microbiology* 184 (5): 259-70. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0027-y>.
- Mehta, Benzerara, Kocar, Chapon 2019. « Sequestration of radionuclides radium-226 and strontium-90 by cyanobacteria forming intracellular calcium carbonates ». *Environmental science & technology* 53 (21): 12639-47. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03982>.

- Mermet-bouvier, Cassier-chauvat, Marraccini, et Chauvat. 1993. « Transfer and replication of rsf1010-derived plasmids in several cyanobacteria of the generasynechocystis andsynechococcus ». *Current microbiology* 27 (6): 323-27. <https://doi.org/10.1007/bf01568955>.
- Mermet-bouvier et Chauvat. 1994. « A conditional expression vector for the cyanobacteriasynechocystis sp. Strains pcc6803 and pcc6714 orsynechococcus sp. Strains pcc7942 and pcc6301 ». *Current microbiology* 28 (3): 145-48. <https://doi.org/10.1007/bf01571055>.
- Min et Sherman. 2010. « Genetic transformation and mutagenesis via single-stranded dna in the unicellular, diazotrophic cyanobacteria of the genus cyanothece ». *Applied and environmental microbiology* 76 (22): 7641-45. <https://doi.org/10.1128/aem.01456-10>.
- Miyagishima, Wolk, et Osteryoung. 2005. « Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses ». *Molecular microbiology* 56 (1): 126-43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04548.x>.
- Moreira, Tavera, Benzerara, Skouri-Panet, Couradeau, Gérard, Loussert Fonta, Novelo, Zivanovic, et López-García. 2017. « Description of gloemargarita lithophora gen. Nov., sp. Nov., a thylakoid-bearing basal-branching cyanobacterium with intracellular carbonates, and proposal for gloemargaritales ord. Nov. » *international journal of systematic and evolutionary microbiology* 67 (3): 653-58. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001679>.
- Moser, Zarka, et Kallas. 1993. « Characterization of a restriction barrier and electrotransformation of the cyanobacterium nostoc pcc 7121 ». *Archives of microbiology* 160 (3): 229-37. <https://doi.org/10.1007/bf00249129>.
- Mühlenhoff et Chauvat. 1996. « Gene transfer and manipulation in the thermophilic cyanobacteriumsynechococcus elongatus ». *Molecular and general genetics mgg* 252 (1): 93-100. <https://doi.org/10.1007/bf02173209>.
- Murry et Wolk. 1991. « Identification and initial utilization of a portion of the smaller plasmid ofanabaena variabilis atcc 29413 capable of replication inanabaena sp. Strain m-131 ». *Molecular and general genetics mgg* 227 (1): 113-19. <https://doi.org/10.1007/bf00260715>.
- Nabout, Da Silva Rocha, Carneiro, et Sant'anna. 2013. « How many species of cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number ». *Biodiversity and conservation* 22 (12): 2907-18. <https://doi.org/10.1007/s10531-013-0561-x>.
- Nakasugi, Svenson, et Neilan. 2006. « The competence gene, comf, from synechocystis sp. Strain pcc 6803 is involved in natural transformation, phototactic motility and piliation ». *Microbiology*, 152 (12): 3623-31. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29189-0>.
- Neuhold, Radakovics, Lehner, Weissmann, Garcia, Romero, Berrow, et Stolt-Bergner.

2020. « Goldenbac: a simple, highly efficient, and widely applicable system for construction of multi-gene expression vectors for use with the baculovirus expression vector system ». *Bmc biotechnology* 20 (1): 26. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00616-z>.

- Ng, Berla, et Pakrasi. 2015. « Fine-tuning of photoautotrophic protein production by combining promoters and neutral sites in the cyanobacterium *synechocystis* sp. Strain pcc 6803 ». *Applied and environmental microbiology* 81 (19): 6857-63. <https://doi.org/10.1128/aem.01349-15>.
- Nies, Mielke, Pochert, et Lamparter. 2019. « Natural transformation of the filamentous cyanobacterium *phormidium lacuna* ». *Biorxiv*, décembre, 870006. <https://doi.org/10.1101/870006>.
- Nowaczyk, Mieseler, Sczibilanski, Ikeuchi, et Rögner. 2012. « Deletion of psbj leads to accumulation of psb27-psb28 photosystem ii complexes in *thermosynechococcus elongatus* ». *Biochimica et biophysica acta (bba) - bioenergetics* 1817 (8): 1339-45. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.017>.
- Obst, Dynes, Lawrence, Swerhone, Benzerara, Karunakaran, Kaznatcheev, Tyliczszak, et Hitchcock. 2009. « Precipitation of amorphous  $\text{CaCO}_3$  (aragonite-like) by cyanobacteria: a stxm study of the influence of eps on the nucleation process ». *Geochimica et cosmochimica acta* 73 (14): 4180-98. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2009.04.013>.
- Onai, Morishita, Kaneko, Tabata, et Ishiura. 2004. « Natural transformation of the thermophilic cyanobacterium *thermosynechococcus elongatus* bp-1: a simple and efficient method for gene transfer ». *Molecular genetics and genomics* 271 (1): 50-59. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0953-9>.
- Ortega-Ramos, Jittawuttipoka, Saenkham, Czarnecka-Kwasiborski, Bottin, Cassier-Chauvat, et Chauvat. 2014. « Engineering *synechocystis* pcc6803 for hydrogen production: influence on the tolerance to oxidative and sugar stresses ». *Plos one* 9 (2): e89372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089372>.
- Patterson, Day, et Piston. 2001. « Fluorescent protein spectra ». *Journal of cell science* 114 (5): 837-38.
- Pei, Sisu, Frankish, Howald, Habegger, Mu, Harte, et al. 2012. « The gencode pseudogene resource ». *Genome biology* 13 (9): r51. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r51>.
- Poncelet, Cassier-Chauvat, Leschelle, Bottin, et Chauvat. 1998. « Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *synechocystis* pcc6803 by plasmid shuffling ». *Molecular microbiology* 28 (4): 813-21. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00844.x>.
- Ponce-toledo, Deschamps, López-garcía, Zivanovic, Benzerara, et Moreira. 2017. « An early-branching freshwater cyanobacterium at the origin of plastids ». *Current biology*

27 (3): 386-91. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.056>.

- Raven, 2013. « The evolution of autotrophy in relation to phosphorus requirement ». *Journal of experimental botany* 64 (13): 4023-46. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert306>.
- Rebehmed, Quintus, Mornon, et Callebaut. 2016. « The respective roles of polar/nonpolar binary patterns and amino acid composition in protein regular secondary structures explored exhaustively using hydrophobic cluster analysis ». *Proteins: structure, function, and bioinformatics* 84 (5): 624-38. <https://doi.org/10.1002/prot.25012>.
- Riding, 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>.
- Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman, et Stanier. 1979. « Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria ». *Microbiology*, 111 (1): 1-61. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>.
- Rivas-Lamelo, Benzerara, Lefèvre, Monteil, Jézéquel, Menguy, Viollier, Guyot, Férard, Poinot, Skouri-Panet, Trcera, Miot, Duprat 2017. « Magnetotactic bacteria as a new model for p sequestration in the ferruginous lake pavin ». *Geochemical perspectives letters* 5: 35-41. <https://doi.org/10.7185/geochemlet.1743>.
- Roberts, Belfort, Bestor, Bhagwat, Bickle, Bitinaite, Blumenthal, et al. 2003. « A nomenclature for restriction enzymes, dna methyltransferases, homing endonucleases and their genes ». *Nucleic acids research* 31 (7): 1805-12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg274>.
- Robertson, Tezuka, et Watanabe. 2001. « Phylogenetic analyses of synechococcus strains (cyanobacteria) using sequences of 16s rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. » *international journal of systematic and evolutionary microbiology* 51 (3): 861-71. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-861>.
- Rouhiainen, Paulin, Suomalainen, Hyytiäinen, Buikema, Haselkorn, et Sivonen. 2000. « Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in anabaena strain 90 ». *Molecular microbiology* 37 (1): 156-67. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01982.x>.
- Ruffing, Jensen, et Strickland. 2016. « Genetic tools for advancement of synechococcus sp. Pcc 7002 as a cyanobacterial chassis ». *Microbial cell factories* 15 (1): 190. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0584-6>.
- Russ et Engelman. 2000. « The gxxxg motif: a framework for transmembrane helix-helix association ». *Journal of molecular biology* 296 (3): 911-19. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3489>.
- Sacko, Barnes, Greene, et Lee. 2020. « Survivability of wild-type and genetically engineered *thermosynechococcus elongatus* bpl with different temperature

conditions ». *Applied biosafety*, janvier, 153567601989664.  
<https://doi.org/10.1177/1535676019896640>.

- Salim, Fenton, Bacha, Urien-Rodriguez, Bonnert, Skynner, Watts, Kerby, Heald, Beer, McAllister, Guest, 2002. « Oligomerization of g-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation ». *Journal of biological chemistry* 277 (18): 15482-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.m201539200>.
- Schulze, López, Tillich, et Frohme. 2011. « A simple viability analysis for unicellular cyanobacteria using a new autofluorescence assay, automated microscopy, and imagej ». *Bmc biotechnology* 11 (novembre): 118. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-118>.
- Seki, Nitta, et Kaneko. 2014. « Observation of polyphosphate bodies and dna during the cell division cycle of *synechococcus elongatus pcc 7942* ». *Plant biology* 16 (1): 258-63. <https://doi.org/10.1111/plb.12008>.
- Senes, Engel, et Gegrado. 2004. « Folding of helical membrane proteins: the role of polar, gxxxg-like and proline motifs ». *Current opinion in structural biology* 14 (4): 465-79. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.07.007>.
- Senes, Gerstein, et Engelman. 2000. « Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the gxxxg motif occurs frequently and in association with  $\beta$ -branched residues at neighboring positions ». *Journal of molecular biology* 296 (3): 921-36. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3488>.
- Shemarova et Nesterov. 2014. «  $ca^{2+}$  signaling in prokaryotes ». *Microbiology* 83 (5): 431-37. <https://doi.org/10.1134/s0026261714050233>.
- Shestakov et Khyen. 1970. « Evidence for genetic transformation in blue-green alga *anacystis nidulans* ». *Molecular and general genetics mgg* 107 (4): 372-75. <https://doi.org/10.1007/bf00441199>.
- Smith, Barupala, Stemmler, et Rosenzweig. 2015. « A new metal binding domain involved in cadmium, cobalt and zinc transport ». *Nature chemical biology* 11 (9): 678-84. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1863>.
- Smith, Smith, et Rosenzweig. 2014. « Diversity of the metal-transporting p1b-type atpases ». *Jbic journal of biological inorganic chemistry* 19 (6): 947-60. <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1129-2>.
- Sode, Tatara, Ogawa, et Matsunaga. 1992. « Maintenance of broad host range vector pkt230 in marine unicellular cyanobacteria ». *Fems microbiology letters* 99 (1): 73-78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05544.x>.
- Sode, Tatara, Takeyama, Burgess, et Matsunaga. 1992. « Conjugative gene transfer in marine cyanobacteria: *synechococcus* sp., *synechocystis* sp. And *pseudanabaena* sp. » *applied microbiology and biotechnology* 37 (3): 369-73. <https://doi.org/10.1007/bf00210994>.

- Soucy, Huang, et Gogarten. 2015. « Horizontal gene transfer: building the web of life ». *Nature reviews genetics* 16 (8): 472-82. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>.
- Specht, Braselmann, et Palmer. 2017. « A critical and comparative review of fluorescent tools for live-cell imaging ». *Annual review of physiology* 79 (1): 93-117. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034055>.
- Springstein, Nies, et Dagan. 2020. « Natural competence in *chlorogloeopsis fritschii* pcc 6912 and other ramified cyanobacteria ». Preprint. *Evolutionary biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.19.162503>.
- Stucken, Ilhan, Roettger, Dagan, et Martin. 2012. « Transformation and conjugal transfer of foreign genes into the filamentous multicellular cyanobacteria (subsection v) *fischerella* and *chlorogloeopsis* ». *Current microbiology* 65 (5): 552-60. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0193-5>.
- Stucken, Koch, et Dagan. 2013. « Cyanobacterial defense mechanisms against foreign dna transfer and their impact on genetic engineering ». *Biological research* 46 (4): 373-82. <https://doi.org/10.4067/s0716-97602013000400009>.
- Su, 2005. « Fluorescent proteins as tools to aid protein production ». *Microbial cell factories* 4 (1): 12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-12>.
- Tandon, Jin, et Huang. 2017. « A promising approach to enhance microalgae productivity by exogenous supply of vitamins ». *Microbial cell factories* 16 (1): 219. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0834-2>.
- Targowla, 2019. « Structural and functional study of calcyanin, a protein involved in the intracellular biomineralization of calcium carbonates by cyanobacteria, using *gloeomargarita lithophora* as a case-study. » *master 2*, 2019.
- Tegel, Tourle, Ottosson, et Persson. 2010. « Increased levels of recombinant human proteins with the *escherichia coli* strain rosetta(de3) ». *Protein expression and purification* 69 (2): 159-67. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.08.017>.
- Terbush, Maccready, Chen, Ducat, et Osteryoung. 2018. « Conserved dynamics of chloroplast cytoskeletal ftsz proteins across photosynthetic lineages ». *Plant physiology* 176 (1): 295-306. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00558>.
- Thiel et Poo. 1989. « Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. » *journal of bacteriology* 171 (10): 5743-46. <https://doi.org/10.1128/jb.171.10.5743-5746.1989>.
- Thiel, 1994. « Genetic analysis of cyanobacteria ». In *the molecular biology of cyanobacteria*, édité par donald a. Bryant, 581-611. Advances in photosynthesis. Dordrecht: springer netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0227-8\\_19](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0227-8_19).
- Tong, Nakashima, Shibasaka, Katsuhara, et Kasamo. 2002. « A novel histidine-rich cpx-atpase from the filamentous cyanobacterium *oscillatoria brevis* related to multiple-

heavy-metal cotolerance ». *Journal of bacteriology* 184 (18): 5027-35. <https://doi.org/10.1128/jb.184.18.5027-5035.2002>.

- Torrecilla, Leganés, Bonilla, et Fernández-Piñas. 2000. « Use of recombinant aequorin to study calcium homeostasis and monitor calcium transients in response to heat and cold shock in cyanobacteria ». *Plant physiology* 123 (1): 161-76. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.161>.
- Toyomizu, Suzuki, Kawata, Kojima, et Akiba. 2001. « Effective transformation of the cyanobacterium *spirulina platensis* using electroporation ». *Journal of applied phycology* 13 (3): 209-14. <https://doi.org/10.1023/a:1011182613761>.
- Tsien, 1998. « The green fluorescent protein ». *Annual review of biochemistry* 67 (1): 509-44. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>.
- Tsinoremas, Kutach, Strayer, et Golden. 1994. « Efficient gene transfer in *synechococcus* sp. Strains pcc 7942 and pcc 6301 by interspecies conjugation and chromosomal recombination. » *journal of bacteriology* 176 (21): 6764-68. <https://doi.org/10.1128/jb.176.21.6764-6768.1994>.
- Tsujimoto, Kotani, Nonaka, Miyahara, Hiraide, et Fujita. 2015. « Transformation of the cyanobacterium *leptolyngbya boryana* by electroporation ». *Bio-protocol* 5 (24). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1690>.
- Tuson, Aliaj, Brandes, Simmons, et Biteen. 2016. « Addressing the requirements of high-sensitivity single-molecule imaging of low-copy-number proteins in bacteria ». *Chemphyschem* 17 (10): 1435-40. <https://doi.org/10.1002/cphc.201600035>.
- Vachhani, Iyer, et Tuli. 1993. « A mobilizable shuttle vector for the cyanobacterium *plectonema boryanum* ». *Microbiology*, 139 (3): 569-73. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-3-569>.
- Varman, Yu, You, et Tang. 2013. « Photoautotrophic production of d-lactic acid in an engineered cyanobacterium ». *Microbial cell factories* 12 (1): 117. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-117>.
- Veaudor, Cassier-Chauvat, et Chauvat. 2019. « Genomics of urea transport and catabolism in cyanobacteria: biotechnological implications ». *Frontiers in microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02052>.
- Verkhatsky et Parpura. 2014. « Calcium signalling and calcium channels: evolution and general principles ». *European journal of pharmacology* 739 (septembre): 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.013>.
- Vermaas, 1996. « Molecular genetics of the cyanobacterium *synechocystis* sp. Pcc 6803: principles and possible biotechnology applications ». *Journal of applied phycology* 8 (4-5): 263-73. <https://doi.org/10.1007/bf02178569>.
- Wang, Yu, Zhang, et Meldrum. 2015. « Premethylation of foreign dna improves

integrative transformation efficiency in *synechocystis* sp. Strain pcc 6803 ». *Applied and environmental microbiology* 81 (24): 8500-8506. <https://doi.org/10.1128/aem.02575-15>.

- Wang, Luan, et Lu. 2019. « Systematic identification of a neutral site on chromosome of *synechococcus* sp. Pcc7002, a promising photosynthetic chassis strain ». *Journal of biotechnology* 295 (avril): 37-40. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.02.007>.
- Waterbury, 1986. « Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *synechococcus* ». *Photosynthetic picoplankton*, 71-120.
- Wendt et Pakrasi. 2019. « Genomics approaches to deciphering natural transformation in cyanobacteria ». *Frontiers in microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01259>.
- Wolk, Vonshak, Kehoe, et Elhai. 1984. « Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria ». *Proceedings of the national academy of sciences* 81 (5): 1561-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.5.1561>.
- Yokoo, Hood, et Savage. 2015. « Live-cell imaging of cyanobacteria ». *Photosynthesis research* 126 (1): 33-46. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0049-x>.
- Zang, Liu, Liu, Arunakumara, et Zhang. 2007. « Optimum conditions for transformation of *synechocystis* sp. Pcc 6803 ». *Journal of microbiology (seoul, korea)* 45 (3): 241-45.
- Zhao, Gan, Shen, et Bryant. 2015. « Rfpa, rfpb, and rfpc are the master control elements of far-red light photoacclimation (farlip) ». *Frontiers in microbiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01303>.
- Zhao, Yao, Xue, Wang, Xiong, et Liu. 2008. « Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon- $\alpha$ 2b fusion protein by linker engineering ». *Protein expression and purification* 61 (1): 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.04.013>.
- Zhou, Carranco, Vitha, et Hall. 2005. « The dark side of green fluorescent protein ». *New phytologist* 168 (2): 313-22. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01489.x>.



# ANNEXE

| <b>Influenced or induced CaCO<sub>3</sub> mineralization</b>                                                                |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                             |                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <b>Organism name and origin</b>                                                                                             | <b>Biomineralised phase</b>     | <b>Observations</b>                                                                                                                                                                                                                                                               | <b>Techniques used</b>                                                      | <b>Influenced or induced calcium mineralization</b> | <b>Interpretations, involved genes, hypotheses</b>                                                                                                                                                                                                                               | <b>References</b>         |
| <b>Actinobacteria (Gram+)</b>                                                                                               |                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                             |                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                           |
| <i>Nesterenkonia halobius</i><br>CCM2591<br>other name:<br><i>Micrococcus halobius</i><br>Unrefined solar salt Chiba, Japan | Calcite, aragonite and dolomite | Calcite, aragonite and dolomite were precipitated in different quantities, depending on the salinity of the medium and the incubation time. The quantity and size of the precipitates decreased with increasing salt concentration and increased with incubation time (>30 days). | Culture in liquid media with various salt concentrations<br>XRD, HRTEM, EDX | Induced and influenced                              | Biological activity and/or chemical process may explain carbonate precipitation by <i>N. halobius</i> .<br>Metabolic activity (i.e., production of CO <sub>2</sub> and ammonium may lead to the creation of a local supersaturation that induces precipitation. Other mechanisms | Rivadeneira et al. (2000) |

|                                                                                                                   |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                  |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
|                                                                                                                   |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                  |         | must also be involved, since pseudoidiomorphic twined crystals of aragonite in cavities of the bioliths and acicular microcrystal in some of the biolite coatings were observed by TEM.                                                                                                                                                                                                                  |                   |
| <b><i>Actinobacterium brevibacterium linens</i> BS258</b><br><b>Sediments collected from the China Yellow Sea</b> | Calcite | Precipitation and dissolution are possible. Dissolution and precipitation of calcite depend on the Ca concentration in the medium. Unexpectedly, the formed calcite around the colony could be dissolved to some extent when increasing the concentration of Ca <sup>2+</sup> in the media.<br>The expression of three carbonic anhydrases was significantly up-regulated along with the increase of Ca <sup>2+</sup> concentration and the extent of calcite dissolution. Increasing concentration of Ca <sup>2+</sup> induced quorum sensing (QS), ribosome synthesis, sugar and AA transport | Isolation from sediments;<br>Genome sequencing;<br>SEM; TEM;<br>EDS; FITR;<br>qRT-PCR;<br>RNAseq | Induced | It regulates some of its metabolic pathways to switch to a cooperative lifestyle in the presence of Ca to obtain nutrients and achieve higher microbial density. Notably, most up-regulated genes related to QS were found to encode peptide/nickel ABC transporters, which suggested that nickel uptake and its associated urease stimulation were essential to boost CaCO <sub>3</sub> mineralization. | Zhu et al. (2017) |

|                                                                                                     |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                           |         |                                                                                                                                                            |                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
|                                                                                                     |                  | pathways including encode peptide/nickel ABC transporters).                                                                                                                                                                                                            |                                                           |         |                                                                                                                                                            |                     |
| <b><i>Rhodococcus erythropolis</i> TN24F<br/>Inland from San Pedro de Atacama in Northern Chile</b> | Monohydrocalcite | Increase of the pH from 7.4 to 9.07 during the 7 first days of the culture. Production of ammonium in the medium. It precipitates carbonates. A decrease of the soluble Ca concentration was observed (~95%) while the Mg concentration decreased only by ~4% on day 7 | 16S rDNA sequencing; Urease activity assay; SEM, EDX, XRD | Induced | The formation of monohydrocalcite is directly related to the removal of soluble calcium. It depends on the biological activity of this haloterant activity | Arias et al. (2017) |
| <b>Cyanobacteria (Gram-)</b>                                                                        |                  |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                           |         |                                                                                                                                                            |                     |

|                                                                                              |                              |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                       |                   |                                                                                                                                                                                                 |                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| <p><b><i>Schizothrix</i> sp.</b><br/> <b>Marine Bahmian stromatholites</b></p>               | <p>Calcite and Aragonite</p> | <p>Aragonite needles embedded within a matrix of EPS in lithified layers of a stromatholite.<br/> Presence of rhombohedral calcite crystals in the unlithified layers or in laboratory cultures</p> | <p>Laboratory cultures, <i>in vitro</i> CaCO<sub>3</sub> nucleation experiment on agarose beads; FT-IR, SEM EDAX.</p> | <p>Influenced</p> | <p>The biochemical composition of EPS (presence of uronic acid and/or acidic proteins) influences the precipitation, composition, and CaCO<sub>3</sub> polymorphism.</p>                        | <p>Kawagushi and Decho (2002)</p>        |
| <p><b><i>Synechococcus</i> strain GL24</b><br/> <b>Fayetteville Green Lake, New York</b></p> | <p>Calcite</p>               | <p>S-layer surrounding cells act as a template for carbonate mineral formation. Only two proteins are present in the S-Layer</p>                                                                    | <p>Laboratory cultures, Freeze fracture and-etching , SEM, TEM, EDS, SDS-PAGE</p>                                     | <p>Influenced</p> | <p>The S-layer acts as a template for fine-grain calcite formation by providing discrete, regularly arranged nucleation sites for the critical initial events in the mineralization process</p> | <p>Schultze-Lam and Beveridge (1992)</p> |

|                                                                                                                                                                    |                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                 |                   |                                                                                                                                                                                                                                                          |                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| <p><i>Synechococcus leopolensis</i> PCC 7942<br/> <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942<br/> <i>Anacystis nidulans</i> R2<br/> <b>Fresh water Porto Rico</b></p> | <p>Aragonite-like and calcite</p> | <p>The nucleation of the amorphous aragonite-like CaCO<sub>3</sub> was found to take place within the tightly bound EPS produced by the cyanobacteria very close to the cell wall. The amount of Ca<sup>2+</sup> adsorbed per volume of EPS was almost independent of the nutrient level.</p> <p>There is temporal and spatial evolution of calcite nucleation on the surface of <i>S. leopoliensis</i></p> <p>The amount of aragonite-like CaCO<sub>3</sub> precipitated on the cell surface was found to be dependent on the culture growth phase: cells in the exponential growth phase adsorbed large amounts of Ca within the EPS and mediated ACC nucleation, while cells in the stationary phase neither adsorbed large amounts of Ca<sup>2+</sup> nor mediated the formation of aragonite-like CaCO<sub>3</sub>.</p> | <p>STXM, FIB milled sections, SVD, XRD, TEM</p> | <p>Influenced</p> | <p>Precipitation of an x-ray amorphous CaCO<sub>3</sub> layer (aragonite-like) by <i>Synechococcus</i> PCC 7942 may serve as a protection mechanism against uncontrolled precipitation of a thermodynamically stable phase calcite on their surface.</p> | <p>Obst et al. (2009)</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|

|                                                                                            |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                     |                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| <p><b><i>Synechocystis</i><br/>PCC 6803<br/>Lake in Berkeley<br/>California</b></p>        | <p>CaCO<sub>3</sub><br/>precipitation</p>        | <p>When cultured in medium with a high Ca<sup>2+</sup> concentration, the calcification rate of cells grown under photoautotrophic conditions was 100 times higher than that in cells grown under heterotrophic conditions. Inactivation of the unique Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger (slr1336) significantly increased the calcification rate and stimulated the expression levels of CCM-related genes, especially <i>cmpA</i>, which encodes the BCT1 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter which has a Ca<sup>2+</sup>-binding site. The net HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake rate and the BCT1 transporter supported photosynthetic rate in the slr1336 mutant were significantly higher than in the wild type.</p> | <p>Atomic absorption spectroscopy,<br/>Gene inactivation,<br/>qRT-PCR,<br/>Western blot,<br/>CA assay,<br/>MIMS</p> | <p>Induced</p>       | <p>The photosynthesis plays a significant role in the process of calcification outside the cells. A single Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (Slr1336) controls the Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange reaction. A higher HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in the mutant of this exchanger increases the pH of the microenvironment around the cells to promote the calcification process.</p> | <p>Jiang et al. (2013)</p> |
| <p><b><i>Synechococcus</i><br/>PCC 7177<br/>Surface seawater from Sanya Bay, China</b></p> | <p>Aragonite and Amorphous calcium carbonate</p> | <p>ACC and aragonite were evident in the lysate of cells infected by viruses, which differed substantially from the lack of calcification in the non-infected culture.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <p>Laboratory culture, podovirus infection, TEM, SEM, SAED, XRD</p>                                                 | <p>Virus-induced</p> | <p>Viral lysis of cyanobacteria creates a calcification environment where carbonate is the dominant inorganic carbon species. Numerous virus particles available in lysate may coprecipitate with the calcium carbonate.</p>                                                                                                                                                                               | <p>Xu et al. (2019)</p>    |

|                                                                                                                                            |                     |  |                                                         |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--|---------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <p><b>bacteria (cyanobacteria, Alpha &amp; Gamma proteobacteria) in lacustrine carbonate microbialites in Lake Alchichica (Mexico)</b></p> | <p>microbialite</p> |  | <p>comparative metagenomic analysis of microbialite</p> | <p>induced and influenced</p> | <p>Metabolisms operating in microbialite formation: anoxygenic photosynthesis, sulfide oxidation, oxygenic photosynthesis and nitrogen fixation. Functional genes related with microbialite formation such as carbohydrate metabolisms and cell wall biogenesis were abundant. Carbohydrate metabolism is involved in carbon uptake and utilization and participate in the metabolims of various saccharides.</p> | <p>Saghai et al. (2016)</p> |
| <p><b>Firmicutes (Gram +)</b></p>                                                                                                          |                     |  |                                                         |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                             |

|                                                              |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                           |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                          |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| <p><b><i>Bacillus licheniformis</i></b><br/><b>DB1-9</b></p> | <p>Elongate calcite crystal &amp; dumbbell-shaped calcite aragonite</p> | <p>Precipitation of rhombohedral, dumbbell-shaped, and elongated calcite crystals. Aragonite appears in the form of mineral aggregates. There is a close relationship between the presence of bacteria and the minerals. Precipitates within the EPS have a poor crystallinity; pH values increased, CA and ammonia are released. The presence of Mg<sup>2+</sup> ions and some organic functional groups can affect the morphology of mineral precipitates</p> | <p>16S sequencing, cultivation, Amino Acid Composition in EPS, XRD, FTIR, SEM, EDS EDAX , HTREM, STEM</p> | <p>Influenced and induced</p> | <p>pH values increase mainly as a result of the combination effect of CA and ammonia released by the cells. CA can catalyze the hydration reaction of carbon dioxide to release abundant bicarbonate and carbonate ions; these can then elevate the supersaturation state of the liquid culture medium with calcium carbonates, and promote the precipitation of polymorphs of calcium carbonate.</p> | <p>Han et al. (2018)</p> |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|

|                                                                                                               |                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                        |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <p><b><i>Bacillus licheniformis</i> SRB2</b><br/> <b>Sludge sample of Moshui River, Qingdao, China</b></p>    | <p>Calcite, vaterite, monohydrocalcite,</p>           | <p>Extracellular biomineralization on extracellular polymeric substance<br/> Cells release ammonia and CA to increase the pH values and elevate the concentrations of HCO<sup>-</sup> and CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ions, thus promoting the bio-precipitation of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions.<br/> CaCO<sub>3</sub> particles gradually grow and are piled together to form the carbonate mineral shell; then cells are wrapped but are still alive due to a hole present in the terminal of the shell that enabled the bacterium to exchange with the environment</p> | <p>16S sequencing, Cultivation, CA assay, SEM, EDS, XRD</p>                            | <p>Influenced and induced</p> | <p>Cells release ammonia and CA increasing pH values and elevates the concentration of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, inducing CaCO<sub>3</sub> precipitation. Moreover, the negatively charged amino acids favor precipitation.</p> | <p>Zhao et al. (2019)</p>                           |
| <p><b><i>Bacillus pasteurii</i></b><br/> <b>other name <i>Sporosarcina pasteurii</i> MTCC 1761</b></p>        | <p>Calcite</p>                                        | <p>The mutant (Bp M-3) obtained by UV mutagenesis and screening shows an increased urease activity, calcite precipitation, and survival at higher pH. The Bp M-3 mutant was assigned an accession number MTCC5428</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <p>UV mutagenesis, Urease activity assay, EPS measurement SEM-EDX and XRD analysis</p> | <p>Induced</p>                | <p>The mutant has a higher urease activity than the wild-type strain and produces more calcite</p>                                                                                                                                                                 | <p>Achal et al. (2009); Bachmeier et al. (2002)</p> |
| <p><b><i>Bacillus sphaericus</i> group isolates</b><br/> <b>Garden fill and soils from Ghent, Belgium</b></p> | <p>Calcite, vaterite, amorphous calcium carbonate</p> | <p>Strain-specific calcification occurred during ureolytic microbial carbonate precipitation. The specificity is mainly due to differences in</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <p>Isolation from soils, PCR-GGE, XRD, Urease activity assay</p>                       | <p>Induced</p>                | <p>The mineralization is linked to the (calcium-dependent) urease activity</p>                                                                                                                                                                                     | <p>Hammes et al. (2003)</p>                         |

|                                                                                                 |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                          |                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
|                                                                                                 |         | urease expression and the response to calcium.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                          |                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                      |
| <b><i>Bacillus subtilis</i> 168</b><br><b>Model strain, mutant of <i>B.subtilis</i> Marburg</b> | Calcite | Dead cells as well as their cell-wall fraction can template calcite nucleation. Nucleating properties were kept even when the cell wall fraction are heated up to 100°C. <i>etfA</i> deletion results in the impairment of CaCO <sub>3</sub> precipitation by the biofilm. The mutant accumulated less dipicolinic acid than the WT strain and no teichoic acids | FITR, SEM, XRD, FAME analysis, DPA assay | Influenced induced | The exact molecular drivers were not identified but nucleating properties were kept even when the cell wall fraction was heated up to 100°C, indicating that active components were heat resistant. Further experiments are necessary. The phospholipids membrane composition have a role in calcite precipitation. The metabolism of fatty acids in the wild type strain consumes protons and favors extracellular CaCO <sub>3</sub> precipitation | Perito et al. (2014) |

|                                                                                          |                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                         |                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <p><b><i>Bacillus subtilis</i> J2</b><br/>oil degradation bacterium</p>                  | <p>Calcite and aragonite</p>                           | <p>Can release NH<sub>3</sub> in the culture medium and increase the pH. Carbonic anhydrase releases carbonate and bicarbonate ions that not only increased pH but also elevated carbonate supersaturation. Mg has an important role in the precipitation of aragonite calcite (only at a Mg/Ca molar ratio of 3).</p> | <p>16S rDNA sequencig, Laboratory cultivation with various concentrations of Mg; SEM, EDS, FTIR, XRD, DTGHR, TEM, SAED, FITR/ ultra-thin slices, HRTEM , SAED, STEM</p> | <p>Induced</p> | <p>It plays an important role in the formation of aragonite and calcite. Anhydrase carbonic activity promotes the precipitation of calcium carbonates EPS contain abundant acidic amino acids such as glutamic acid and aspartic acid and act as nucleation sites for carbonate mineral phases in supersaturated solutions</p>                                                                                           | <p>Han et al. (2019)</p>         |
| <p><b><i>Halobacillus trueperi</i> ATCC 700077</b><br/>The Great Salt Lake, Utah, US</p> | <p>Calcite, magnesium calcite and monohydrocalcite</p> | <p>Precipitation of carbonatogenesis observed at all salts concentrations assayed. The quantity and size of biomineralized deposits decreased with increasing salts concentration. The time required for precipitation increased with salt concentration</p>                                                           | <p>Culture in liquid and solid media XRD, SEM</p>                                                                                                                       | <p>Induced</p> | <p>An excess of salts and high concentrations of magnesium ions have been reported to negatively influence calcium carbonate precipitation. Hypothesis: the mechanism of carbonate crystal formation by <i>H. trueperi</i> involves the adsorption of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> and the production of CO<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ions (which increases pH) during the metabolization of</p> | <p>Rivadeneira et al. (2004)</p> |

|                                                                                                             |                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                  |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
|                                                                                                             |                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                  |         | the nitrogenated organic materials. This could lead to the creation of a local supersaturation with carbonates at the cell surface, inducing their precipitation.                                                                                                                                                                     |                      |
| <b><i>Proteobacteria</i></b><br><b>(Gram-)</b>                                                              |                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                  |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                      |
| <b><i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2</b><br><b>Seawater sediment around the isle of Borkum (North Sea)</b> | Aragonite and high magnesium calcite | Formation of crystals within the biofilm. During the incubation time, the nucleated crystals underwent considerable changes in morphology and size (spindle structures, to large micritic porous cement unit). This sequence of carbonate nucleation, growth, and cementation was observed during growth in liquid and agar media. Exponential decline of crystal abundance with increasing CA inhibitor concentrations | Liquid and agar cultures, CA imaging and inhibition<br>Epifluorescence, ICP-OES, TIMS, SEM, XRD, | Induced | Carbonate precipitation is primarily caused by microbial metabolic activity. This is the result of microbial ammonification increasing the alkalinisation/pH. The location of crystal precipitation in a microbial biofilm was largely governed by the heterogenic presence of extracellular carbonic anhydrase, locally causing high | Krause et al. (2018) |

|                                                                                     |                     |                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                        |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
|                                                                                     |                     |                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                        |         | concentrations of $\text{HCO}_3^-$ . Due to the ammonification process, consuming $\text{H}^+$ ions, the conversion of $\text{HCO}_3^-$ to $\text{CO}_3^{2-}$ is facilitated, subsequently leading to carbonate precipitation                                                                                                                                                               |                   |
| <b><i>Chromohalobacter israelensis</i> LD532<br/>Yinjiashan<br/>Saltern, China.</b> | Aragonite & calcite | Formation of magnesium calcite and aragonite. Different sources of $\text{Mg}^{2+}$ can affect the surface micromorphology, elemental composition, and mineral phase of the minerals induced by LD532. | Isolation and cultivation in various media, 16S sequencing, CA activity measurement, SEM, EDS, FTIR XRD, HTREM, ultra-thin slices, TEM | Induced | The carbonic anhydrase and ammonia released from the cells increased pH of the medium and promoted the carbonate precipitation. CA participates in the process of converting $\text{CO}_2$ into $\text{HCO}_3^-$ , transportation of acid and ion, and cellular pH regulation. CA enzyme catalyzes the reversible hydration of $\text{CO}_2$ , $\text{HCO}_3^-$ can be released in alkaline | Han et al. (2017) |

|                                                                        |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                        |         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
|                                                                        |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                        |         | condition under the catalysis of this enzyme, then react with Ca <sup>2+</sup> to produce calcium carbonate precipitates                                                                                                                                                                                                                                                               |                           |
| <b><i>Chromohalobacter marismortui</i><br/>ATCC 17056<br/>Dead Sea</b> | Aragonite | After 3 days of cultivation the pH of the culture increased. SEM and XRD examinations indicated that protocrystalline carbonate phases precursory of aragonite started to develop after 3 days of incubation. After 40 days of incubation, aragonite and sturvite precipitates were formed although amorphous phases were still very abundant. | Laboratory cultivation, SEM, TEM, XRD, | Induced | There are two phases in the formation of aragonite. The nucleation of amorphous Ca phosphate (ACP) phases is a transient stage in the precipitation of aragonite in liquid medium. The dissolution of the amorphous phosphate phase that formed on cell surfaces was followed by in situ precipitation of globular to subangular Ca-carbonate nanoparticles that attached to bacterial | Rivadeneira et al. (2010) |

|                                                                                                                                                                      |          |                                                                                                                           |                                                       |         |                                                                                                                       |                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
|                                                                                                                                                                      |          |                                                                                                                           |                                                       |         | cell walls and gels related to them. The later aggregation of mineralized bacterial cells finally produced aragonite. |                         |
| <b><i>Desulfovibrio brasiliensis</i> strain LVform1</b><br><b>Sediments of a dolomite-forming hypersaline coastal lagoon, Lagoa Vermelha, Rio de Janeiro, Brazil</b> | Dolomite | Dolomite precipitated after 4–8 weeks incubation in the range of 25–45°C. The dolomite has a composition of 40–52 mol% Mg | Laboratory cultivation, 16S rDNA sequencing, XRD, SEM | Induced |                                                                                                                       | Whartmann et al. (2005) |

|                                                                                                                                                                                                                                 |                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                     |                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <p><b>Diaphorobacter nitroreducens</b><br/> <b>TPSY</b><br/> <b>Other name:</b><br/> <i>Acidovorax ebreus</i><br/> <b>TPSY</b><br/> <b>(groundwater DOE Integrated , US Field Research Challenge site at Oak Ridge, TN)</b></p> | <p>Aragonite &amp; calcite monohydrocalcite crystals</p> | <p>CaCO<sub>3</sub> crystals immediately form around the cell. After 5 days a decrease in bacterial activity is observed due to the accumulation of precipitates around the cells. It prefers to use NO<sub>3</sub><sup>-</sup> therefore NO<sub>2</sub><sup>-</sup> accumulated in the anaerobic cultures</p> | <p>Cultivation in various media;<br/> Atomic absorption spectroscopy (AAS); flow cytometry, SEM</p> | <p>Induced</p> | <p>Anoxic oxidation of organic matter through NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduction (denitrification) produced less biomass yield, thus higher CO<sub>2</sub> production and CaCO<sub>3</sub> yield. Denitrification process has higher CaCO<sub>3</sub> precipitation yield for Ca<sup>2+</sup> removal from water than ureolysis</p>                                                         | <p>Ersan et al. (2015)</p>       |
| <p><i>Deleya halophila</i> strain CCM3662 (also known as <i>Halomonas halophila</i>)<br/> <b>Haplic solochack soils from a saltern near Alicante, Spain</b></p>                                                                 | <p>Aragonite</p>                                         | <p>At least four stages of crystal formation could be distinguished, from the aggregation of a few calcified bacteria (3- to 5-µm) to the final formation of a spherical carbonate biolith (50 µm in diameter).</p>                                                                                            | <p>Laboratory cultivation, EDX, SEM, XRD</p>                                                        | <p>Induced</p> | <p>Hypothesis: the mechanism of precipitation of carbonates involves the adsorption of Ca<sup>2+</sup> cations and a subsequent local increase in the concentration of these ions, in conjunction with the release of CO<sub>2</sub> produced during the breakdown of organic matter, may lead to the local supersaturation and precipitation of calcium carbonate. The precipitation was</p> | <p>Rivadeneira et al. (1996)</p> |

|  |  |  |  |  |                                                                                           |  |
|--|--|--|--|--|-------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  |  |  |  |  | induced by the presence of charged surfaces (the cell wall, and possibly the EPS capsule) |  |
|--|--|--|--|--|-------------------------------------------------------------------------------------------|--|

|                                                                                                                                                                                                                                 |                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                       |                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <p><b><i>Halomonas anticariencis</i> FP35T (LMG 22089T=CECT 5854T)</b><br/> <b>Soil samples from the temporarily emerged banks of the Laguna Redonda, Fuente de Piedrasaline-wetland wildfowl reserve, Antequera, Spain</b></p> | <p>Magnesium Calcite and Calcium Dolomite</p> | <p>It produced spherulitic and dumbbell-shaped bioliths constituted by Ca-Mg carbonates. At low salinity, it precipitates magnesium calcite whereas a non-stoichiometric calcium- rich dolomite is formed at high salinity.<br/> A decrease in the pH of the culture media (about 5) was observed at the beginning of the experiences, Later, pH value was increased up to 9. It harbors a weak carbonic anhydrase activity.</p> | <p>Cultivation in liquid and in solid media with various salt concentrations; XRD, SEM, CA assays</p> | <p>Induced</p> | <p>Dolomite formation is a multistep process. First the metabolization of acetate, peptone, and yeast extract present in the media produces the <math>\text{CO}_3^{2+}</math> and <math>\text{NH}_4^+</math> ionsdecreases the pH of the culture. Later, pH value increases up to 9, due to the degradation of the nitrogenous organic matter: yeast extract and pepton present in the media. Hypothesis: calcium-rich dolomite produced by biological activity is a precursory phase of dolomite through its transformation into calcite and dolomite, which occurs after a long period of time.The bacterial precipitation of calcium dolomite at different seawater salinities supports the hypothesis of its bacterially mediated massive precipitation</p> | <p>Rivadeneira et al. (2016)</p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|

|  |  |  |  |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |
|--|--|--|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  |  |  |  |  | <p>in certain periods of the geological time. The scarcity of calcium dolomite in Nature could be more closely related to its subsequent transformation into other more stable minerals rather than to its lack of precipitation in these environments. Studies of other calcium dolomite produced by bacterial mediation could further lead to a better understanding of dolomite formation as well as that of carbonate precipitation processes.</p> |  |
|--|--|--|--|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

|                                                                                                                                                                                  |                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <p><b><i>Halomonas eurihalina</i> F-9-6, ATCC 49336)</b><br/> <b>Other name</b><br/> <b><i>Volcaniella eurihalina</i>.</b><br/> <b>Hypersaline soil near Alicente, Spain</b></p> | <p>Magnesium calcite, aragonite and monhydrocalcite</p> | <p>In both solid and liquid media, magnesium calcite and aragonite were formed. In liquid medium, monhydrocalcite was also formed.<br/> More aragonite was produced in liquid media than in solid. The Mg content of the magnesium calcites increased with increasing salinity. 3 morphologies: calcified filaments or chains, discs and spherulites.</p> | <p>Culture in liquid and solid media; XRD, SEM, XDE</p> | <p>Hypothesis: the mechanism of carbonate crystal formation by <i>H. eurihalina</i> involves the adsorption of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> and a subsequent local increase in the concentration of these ions.<br/> The accumulation of metal ions probably occurs in the cell wall and capsule. CO<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (which increases pH) are produced during the metabolization of the nitrogenated organic materials. This could lead to the creation of a local supersaturation of carbonates which induces their precipitation</p> | <p>Rivadeneira et al. (1998)</p> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|

|                                                                                                                                                           |                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                             |                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b><i>Halomonas maura</i> strain S-30</b><br/> <b><i>Saline soil bordering a solar saltern in Asilah, Morocco</i></b></p>                              | <p>Magnesium kutnohorite<br/> Manganese kutnohorite<br/> Calcium dolomite</p> | <p>In the presence of Mn, dolomite and rhodochrosite are formed. In the presence of lower concentrations of Mn<sup>2+</sup>, small amounts of kutnohorite are formed. Absence of bioprecipitation in controls inoculated with heat-killed cells</p> | <p>Laboratory cultivation, SEM, XRD, TEM</p>                                                                                                | <p>Induced</p>            | <p>H. Maura has an active role in the biomineralisation process as well as geochemical conditions. (The manganese concentrations clearly influence the formation of the minerals). Further experiments are necessary to identify the key factors involved.</p>                                                                                                                                                                                                            | <p>Rivadeneira et al. (2017)</p>                                                             |
| <p><b><i>Mixococcus xanthus</i> strain 142</b><br/> <b>spanish collection</b><br/> <b>Other name</b><br/> <b><i>Myxococcus xanthus</i> Beebe 1941</b></p> | <p>Calcite<br/> rombohedra<br/> Small quantity of vaterite</p>                | <p>Both living and dead bacteria play a passive role in calcium carbonate precipitation by acting as a template for heterogeneous nucleation</p>                                                                                                    | <p>Cultivation in laboratory UV treatment for dead cells production; Conservation treatment for ornamental stone; Cultivation, XRD, SEM</p> | <p>Influenced/induced</p> | <p><i>M. xanthus</i> metabolic activity involves production of NH<sub>3</sub> by means of oxidative deamination of amino acids. NH<sub>3</sub> creates an alkaline microenvironment around the calcarenite. CO<sub>2</sub> produced by the bacterium is dissolved and transforms into either HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> or CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> depending on the pH. Once sufficient supersaturation is reached, calcium carbonate formation by heterogeneous</p> | <p>Gonzalez-Muñoz et al. (1996); Rodriguez-Navarro et al. (2003); Chekroun et al. (2004)</p> |

|                                       |                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                        |         |                                                                                                                          |                     |
|---------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
|                                       |                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                        |         | nucleation occurs on the bacterial cell walls,                                                                           |                     |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 f2 | Aragonite & calcite | Increasing initial cell concentration increased the CaCO <sub>3</sub> precipitation rate. The CaCO <sub>3</sub> precipitation in fresh cultures stopped after day 6. However, due to the ongoing NO <sub>3</sub> and NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> reduction until day 10, the old cells continued to precipitate CaCO <sub>3</sub> with a lower rate. CaCO <sub>3</sub> crystals immediately form around the cell. After 5 days a decrease in bacterial activity is observed due to the accumulation of precipitates around the cells. | Cultivation in various media; AAS, flow cytometry, SEM | Induced | The denitrification process induced the removing of Ca <sup>2+</sup> from water through CaCO <sub>3</sub> precipitation. | Ersan et al. (2015) |

|                                                                                                                                                                     |                |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                    |                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| <p><b><i>Serratia</i> sp. ISTD04</b><br/> <b>Marble rock of the Palaeoproterozoic metasediments of the Aravali Supergroup, at Alwar area, Rajasthan, India,</b></p> | <p>Calcite</p> | <p>Recombinant carbonic anhydrase enzyme (produced in <i>E.coli</i>) was used for biomineralization-based conversion of atmospheric CO<sub>2</sub> into calcite.</p>                                                                                                                | <p>16S sequencing, SEM, XRD, FTIR, EDX</p>                                         | <p>Induced</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <p>Srivastava et al. (2015)</p> |
| <p><b><i>Variovorax</i> sp. isolate 110AD</b><br/> <b>Aquifer underlying Eastern Snake River Plain Idaho, US</b></p>                                                | <p>Calcite</p> | <p>The pH increase and the ammonium production after inoculation of the culture confirmed the ureolytic activity of the isolate. This activity is lower than those of <i>B. pasteurii</i>. The rate of calcite precipitation is directly linked to the rate of urea hydrolysis.</p> | <p>Isolation, laboratory cultures, 16S rDNA sequencing, FAME profil, XRD, SEM,</p> | <p>Induced</p> | <p>The rate of calcite precipitation is directly linked to the rate of urea hydrolysis. This is in contrast to the findings reported by Stocks-Fischer et al. (1999), who concluded that the rate of calcite precipitation by <i>B. pasteurii</i> was correlated to cell growth but was only indirectly linked to ammonia production from urea hydrolysis. Necessary to perform experiments under conditions more closely simulating natural groundwater to determine the</p> | <p>Fujita et al. (2000)</p>     |

|                                             |  |                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                  |         |                                                                                                                                                                                                                                                             |                     |
|---------------------------------------------|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
|                                             |  |                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                  |         | relevance to environmental conditions of the observations obtained in this study.                                                                                                                                                                           |                     |
| <b><i>Salmonella S. typhimurium</i> LT2</b> |  | Killed cells were unable to precipitate CaCO <sub>3</sub> crystals in liquid medium. The knock-out mutant of the <i>chaA</i> gene encoding a Ca <sup>2+</sup> /2H <sup>+</sup> antiporter loses its capability to grow on media containing Ca. | Laboratory cultivation, generation of deletion mutant, SEM , XRD | Induced | Cells must be metabolically active for calcification. Denitrification Hypothesis: calcification might be involved in Ca detoxification. Ca <sup>2+</sup> ions are detoxified by calcification, which allows cells to survive an immediate metabolic insult. | Banks et al. (2010) |

|                                                                                                       |                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                       |                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <p><b><i>Shewanella piezotolerans</i> WP3</b><br/> <b>West Pacific deep-sea (1914 m) sediment</b></p> | <p>Vaterite &amp; calcite</p> | <p><i>S. piezotolerans</i> WP3 is able to facilitate calcium carbonate precipitation. The pH increases and the NH<sub>3</sub> concentration in the medium increased by a factor of 10 is able to produce CaCO<sub>3</sub> by bacterial metabolism and to mediate vaterite formation. In contrast, bundle-like aragonite and rhombohedral calcite are crystallized from the mineralization solution with the Soluble EPS four kinds of amino acids are responsible for vaterite formation and stabilization<sup>5</sup> Bare cells and bound EPS can facilitate calcite erosion, and bound EPS is more effective a voir</p> | <p>Laboratory cultivation, EPS extraction, Biomimetic mineralization experiments, FESEM, FT-IR, TG-DTA, TEM, SAED</p> | <p>Induced</p> | <p>This reveals that bacterial metabolism on nitrogenous organics releases NH<sub>3</sub>, resulting in the pH increase in the liquid culture. This further leads to an increase in CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> activity and ion activity product of calcium carbonate, thus facilitating calcium carbonate precipitation. four amino acids, especially carboxyl-enriched glutamic acid and aspartic acid, should be predominantly responsible for the vaterite mineralization, EPS and EPS-free cells can facilitate calcite erosion over time</p> | <p>Li et al. (2019)</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|

|                                                                                                            |                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                         |                |  |                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--|----------------------------------|
| <p><b><i>Vibrio</i> spp (A-11 and type strain A-32)<br/>Inland saltern in La Mala, Granada (Spain)</b></p> | <p>Magnesium calcite</p> | <p>The precipitation takes place in a microenvironment provided by bacterial growth. The concentration for optimum carbonate precipitation does not appear to coincide with that for optimum growth. The Mg<sup>2+</sup> content of magnesium calcites increased concomitantly with an increase in total salinity and the Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> ratio. The incubation temperature had no effect upon the composition of the crystal. No aragonite was detected, even in a media with high Mg contents.</p> | <p>Culture in solid media containing various salt concentrations, XRD, FS, EDX, SEM</p> | <p>Induced</p> |  | <p>Rivadeneira et al. (1994)</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--|----------------------------------|



# Résumé

La biominéralisation des carbonates de calcium est un processus répandu chez les bactéries. Cependant les mécanismes moléculaires sous-jacents restent mal compris. Récemment, la biominéralisation intracellulaire de phases amorphes de carbonate de calcium (iACC) a été découverte chez des cyanobactéries répandues environnementalement et phylogénétiquement. Un gène orphelin de fonction inconnue, nommé *ccyA* et codant pour une protéine nommée Calcyanine, a été identifié uniquement chez ces cyanobactéries.

Ainsi mon travail de thèse a consisté à développer une approche génétique pour analyser la fonction *in vivo* du gène *ccyA* et déterminer si la protéine qu'il code est impliquée ou non dans la formation des iACC. L'échec des tentatives de délétion de *ccyA* chez *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 suggère que ce gène leur est essentiel. Nous avons donc construit une expression hétérologue de *ccyA* dans des cyanobactéries modèles ne formant pas naturellement des iACC. L'expression constitutive de diverses séquences du gène *ccyA* a montré que la croissance de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 est ralentie par rapport à celle de la souche sauvage. En accord, les mutants exprimant le *ccyA* présentent plus de cellules mortes que la souche sauvage. Enfin, ces mutants possèdent plus de calcium intracellulaire que la souche sauvage, suggérant une modification de l'homéostasie du calcium. Enfin, j'ai introduit des plasmides par conjugaison chez *Cyanothece* sp. PCC 7425 et *Synechococcus* sp. PCC 6312 leur permettant de surproduire *ccyA*. La Calcyanine fusionnée avec la eGFP se localise à la membrane et aux pôles des cellules chez la souche *Synechococcus* sp. PCC 6312.

Mots clés : Cyanobactéries, iACC, génétique, Délétion, expression, localisation, STXM, CLSM, MEB, CEMOVIS

# Abstract

The biomineralization of calcium carbonates is a common process in bacteria, however, the underlying molecular mechanisms remain poorly understood. Recently, intracellular biomineralization of amorphous calcium carbonate phases (iACC) has been discovered in environmentally and phylogenetically widespread cyanobacteria. An orphan gene of unknown function, named *ccyA* and coding for a protein named Calcyanin, has been identified only in these cyanobacteria.

My thesis work consisted in developing a genetic approach to analyze the *in vivo* function of the *ccyA* gene and determine whether or not the encoded protein is involved in the formation of iACCs. The failure of *ccyA* deletion attempts in *Cyanothece* sp. PCC 7425 and *Synechococcus* sp. PCC 6312 suggests that this gene could be essential to cells viability. We have therefore introduced a plasmid allowing heterologous expression of *ccyA* in model cyanobacteria that do not naturally form iACC. The constitutive expression of various *ccyA* sequences in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 is slowed down compared to that of the wild strain. In agreement, *ccyA*-expressing mutants have more dead cells than the wild-type strain. Finally, these mutants have more intracellular calcium than the wild strain, suggesting a modification of calcium homeostasis. Finally, I introduced plasmids by conjugation in *Cyanothece* sp. PCC 7425 and *Synechococcus* sp. PCC 6312 allowing them to overproduce *ccyA*. Calcyanin fused with eGFP is localized to the membrane and poles of cells in *Synechococcus* sp. PCC 6312.

Keywords: Cyanobacteria, iACC, *ccyA*, Calcyanin, genetic, deletion, expression, localization, STXM, MEB, CEMOVIS